

# Увеличение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в стромальных клетках эндометрия при гипоксии зависит от активности системы деметилирования ДНК

М.А. Кулебякина<sup>1</sup>, А.С. Смирнова<sup>1</sup>, В.С. Попов<sup>1,2</sup>, Р.Ю. Еремичев<sup>2</sup>, П.И. Макаревич<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: [coolebyakina@gmail.com](mailto:coolebyakina@gmail.com)

## Аннотация

**Целью** работы было проверить, изменяется ли уровень экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11*, специфичных для эндометрия, в матке мыши после родового повреждения эндометрия, а также предположить механизм, по которому экспрессия данных генов может возрастать в стромальных клетках эндометрия в результате повреждения.

**Методы.** В исследовании использовали молодых (возрастом 8–10 недель) мышей дикого типа инбредной линии C57BL/6; экспрессию генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки оценивали до родов, а также спустя 4 и 24 ч после родов. Гипоксию моделировали *in vitro* в первичных культурах стромальных клеток эндометрия человека добавлением 200 мМ  $\text{CoCl}_2$ . Ингибирование системы активного деметилирования ДНК проводили с использованием ингибитора Vobcat339. Оценку уровня экспрессии генов *Hoxa10* (*HOXA10*) и *Hoxa11* (*HOXA11*) проводили методом ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, а также методом вестерн-блоттинга.

**Результаты.** В течение первых суток после родов в тканях матки мыши возрастает экспрессия генов *Hoxa10* и *Hoxa11*. В стромальных клетках человеческого эндометрия при моделировании гипоксии возрастает экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11*, а ингибирование системы активного деметилирования ДНК препятствует возрастанию экспрессии данных генов в модели гипоксии.

**Заключение.** Впервые получены данные о том, что экспрессия генов *Hoxa10* и *Hoxa11* возрастает в матке мыши после повреждения эндометрия в модели *in vivo*. Кроме того, в экспериментах *in vitro* показано, что апрегуляция данных генов в результате повреждения может обуславливаться изменением их экспрессии в стромальных клетках эндометрия, которая, в свою очередь, может быть вызвана гипоксией и вызываемыми ей эпигенетическими изменениями, связанными с работой системы активного деметилирования ДНК.

**Ключевые слова:** эндометрий, гомеостатические гены, эпигенетика, регенерация, гипоксия

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Кулебякина М.А., Смирнова А.С., Попов В.С., Еремичев Р.Ю., Макаревич П.И. Увеличение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в стромальных клетках эндометрия при гипоксии зависит от активности системы деметилирования ДНК. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(1):42–52. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-42-52>

Поступила 20.04.2023

Обработана 29.06.2023

Принята к публикации 25.07.2023

# Increased expression of *HOXA10* u *HOXA11* in endometrial stroma cells under hypoxia depends on activity of the DNA demethylation system

Maria A. Kulebyakina<sup>1</sup>, Anastasia S. Smirnova<sup>1</sup>, Vladimir S. Popov<sup>1,2</sup>,  
Roman Yu. Eremichev<sup>2</sup>, Pavel I. Makarevich<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Leninskiye Gory, 1, Russia

<sup>2</sup> Institute for Regenerative Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Leninskiye Gory, 1, Russia

Correspondence address: [coolebyakina@gmail.com](mailto:coolebyakina@gmail.com)

## Abstract

**Aim.** The work was aimed to test whether the expression levels of endometrial-specific *Hoxa10* and *Hoxa11* genes in the mouse uterus change after endometrial injury caused by giving birth, and to suggest a mechanism by which these genes can be upregulated in endometrial stromal cells after injury.

**Methods.** The study was performed using young (8–10 weeks old) wild-type mice of the C57BL6 line; *Hoxa10* and *Hoxa11* gene expression in uterine tissues was assessed before delivery, as well as 4 hours and 24 hours after delivery were also used in the work. Hypoxia was modeled *in vitro* using human endometrial stromal cells by adding 200 mM CoCl<sub>2</sub>. Inhibition of DNA active demethylation system was performed using the Bobcat339 inhibitor. The level of expression of the *Hoxa10* (*HOXA10*) and *Hoxa11* (*HOXA11*) genes was assessed by real-time PCR coupled with reverse transcription, as well as by Western blotting.

**Results.** During the first day after birth, both *Hoxa10* and *Hoxa11* gene expression increases in mouse uterine tissues. In the stromal cells of the human endometrium, during hypoxia modeling, *HOXA10* and *HOXA11* gene expression increases, and inhibition of the active DNA demethylation system prevents noted increase in the hypoxia model.

**Conclusion.** We have shown for the first time that the *Hoxa10* and *Hoxa11* gene expression increases *in vivo* in the mouse uterus after endometrial damage, and also demonstrated *in vitro* experiments that upregulation of these genes in endometrial stromal cells after damage can be caused by hypoxia-induced epigenetic changes associated with the operation of the active DNA demethylation system.

**Keywords:** endometrium, homeotic genes, epigenetics, regeneration, hypoxia

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Kulebyakina M.A., Smirnova A.S., Popov V.S., Eremichev R.Yu., Makarevich P.I. Increased expression of *HOXA10* u *HOXA11* in endometrial stroma cells under hypoxia depends on activity of the DNA demethylation system. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(1):42–52. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-1-42-52>

Received 20.04.2023

Revised 29.06.2023

Accepted 25.07.2023

**Список сокращений:**

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН — додецилсульфат натрия

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция в реальном времени, совмещенная с обратной транскрипцией

СК — стромальные клетки

ТБСТ — трис-буферный раствор с добавлением детергента Твин 20 (tris-buffered saline tween-20)

Трис (TRIS) — трис(гидроксиметил)аминометан (tris(hydroxymethyl)aminomethane)

ПВДФ — поливинилиденфторид

ПМСФ — фенилметилсульфонилфторид

BSA (БСА) — бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) — культуральная среда Игла, модифицированная Дульбекко

HIF — фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia inducible factor)

*HOX* — *HOX*-гены человека*Hox* — *Hox*-гены мыши $\beta$ -МЭ —  $\beta$ -меркаптоэтанол**Введение**

Эндометрий — ткань, обладающая способностью к многократной регенерации после повреждения в ходе менструального цикла, родов или хирургических вмешательств. Заживление эндометрия требует строгой последовательности таких событий, как дифференцировка стромальных и эпителиальных прогениторов, миграция клеток, прорастание и стабилизация сосудистых структур, накопление межклеточного матрикса и его ремоделирование. Все перечисленные процессы регулируются и координируются стромальными клетками, которые, таким образом, являются ключевыми участниками процесса регенерации эндометрия.

Ранее нами была выдвинута гипотеза о том, что для успешной регенерации важна активность тканеспецифичных генов *Hox*, а конкретно в эндометрии — *Hoxa10* и *Hoxa11* [1]. Семейство *Hox* — группа транскрипционных факторов, регулирующих в эмбриогенезе формирование паттерна тела многоклеточных животных. В ходе эмбрионального развития экспрессия генов *Hox* активируется при сегментации мезодермы и строго соответствует пространственному расположению данной части тела [2–4]. Аналогичные эмбриональным тканеспецифические паттерны экспрессии генов *Hox* сохраняются на протяжении всей жизни в клетках взрослого организма [5–7], однако функциональная роль постнатальной экспрессии генов *Hox* в стро-

мальных клетках пока остается неясной. Долгое время считалось, что роль ее сводится к сохранению «позиционной» информации в клетках той или иной ткани или части тела. Тем не менее в последние годы накапливаются данные о важности тканеспецифичной экспрессии генов *Hox* в постнатальный период для успешного заживления и регенерации тканей [8–11].

Известно, что у человека и мыши экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11* (*Hoxa10* и *Hoxa11* у мыши) сохраняется в стромальных клетках эндометрия и регулируется стероидными гормонами (эстрадиолом и прогестероном) в течение менструального/эстрального цикла [12]. Тем не менее данных относительно изменения экспрессии генов *Hox* в эндометрии, вызванного повреждением, на данный момент нет. В настоящей работе было проверено, изменяется ли экспрессия генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в матке мыши *in vivo* (на модели родового повреждения эндометрия) и *in vitro* в стромальных клетках эндометрия человека в модели гипоксии, а также показано существование эпигенетического механизма, регулирующего экспрессию генов *HOX* в стромальных клетках эндометрия при повреждении.

**Материалы и методы исследования****Работа с животными**

В работе использованы мыши дикого типа инбредной линии C57BL6. При проведении экспериментов соблюдали «Правила проведения работ

с использованием экспериментальных животных», приказ Министерства среднего и высшего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984 и нормы, утвержденные Комиссией по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова. В работе использовали самок в возрасте 8–10 недель. Датируемую беременность получали, ссаживая двух самок с одним самцом на трое суток; самок, имеющих вагинальные пробки, отсаживали и судили о развитии беременности у них по прибавке в весе в течение недели. Далее на разных сроках после родов, а также до родов самок умерщвляли введением летальной дозы анестезии и забирали у них матки. Экспериментальной точке «до родов» соответствует начало 19 суток с момента обнаружения у самки вагинальной пробки (предполагаемая дата родов).

#### Ведение клеточных культур

Стромальные клетки (СК) эндометрия выделяли из менструального отделяемого молодых (20–35 лет) здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности (пример протокола приведен в работе [13]). В работе использовали клетки первичной культуры стромальных клеток эндометрия человека не позднее пятого пассажа. Клетки культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37 °C и 7%  $\text{CO}_2$ , в качестве среды культивирования использовали DMEM Low glucose (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 1% раствора глутамина (GlutaMax, Thermo Fischer Scientific, США) и 1% коммерческого раствора пенициллина и стрептомицина (PenStrep, Thermo Fisher Scientific, США). Каждые 2–3 дня среду культивирования полностью заменяли на свежую. При пересеве оценивали ко-

личество клеток и их выживаемость методом подсчета в камере Горяева с окрашиванием трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Для проведения экспериментов клетки растили до 80% конfluence.

#### Моделирование гипоксии *in vitro*

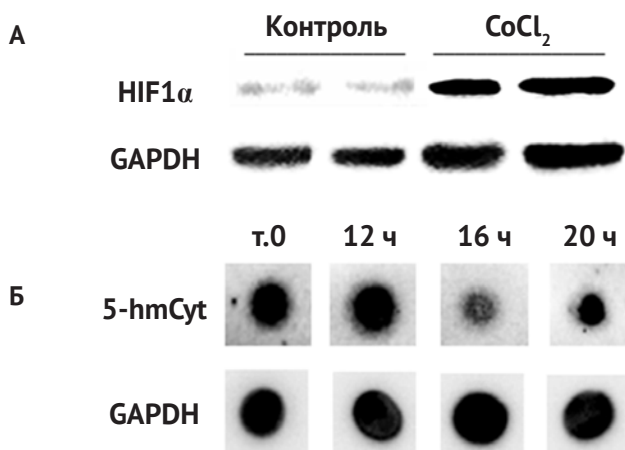
Для моделирования гипоксии *in vitro* использовали хлорид кобальта (II) ( $\text{CoCl}_2$ ).  $\text{CoCl}_2$  стабилизирует транскрипционные факторы HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$ , индуцируемые при гипоксии и активирующие экспрессию генов, отвечающих за выживание клеток, их пролиферацию, контроль метаболических процессов [14]. К клеткам добавляли  $\text{CoCl}_2$  до концентрации 200 мкМ, после чего клетки культивировали в течение 12, 16, 20 либо 24 ч. Об успешности активации HIF судили на основании вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к HIF-1 $\alpha$  (рис. 1А).

#### Ингибирование ферментов семейства Tet

В работе использовали селективный ингибитор ферментов семейства TET — Bobcat339 (SML2611, Sigma-Aldrich, США) [15, 16]. К культуре клеток добавляли Bobcat339 до концентрации 80 мкМ, после чего клетки культивировали в течение 12, 16, 20 либо 24 ч. Для оценки эффективности ингибирования TET проводили дот-блоттинг клеточных лизатов с использованием антител (Abcam, Великобритания), специфичных к продукту реакции, катализируемой ферментами семейства TET, — 5-гидроксиметилцитозину (рис. 1Б).

#### Иммуноблоттинг

Вестерн-блоттинг проводили по методу Тоубина [17]. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в течение часа



**Рис. 1.** Результаты иммуноблоттинга образцов СК эндометрия. А — оценка эффективности стабилизации HIF1 $\alpha$  в стромальных клетках эндометрия человека под действием  $\text{CoCl}_2$ . Иммуноблоттинг. Контроль — образцы СК эндометрия, культивированных без добавления  $\text{CoCl}_2$ ;  $\text{CoCl}_2$  — образцы СК эндометрия, культивированных в присутствии  $\text{CoCl}_2$  в течение суток; Б — оценка успешности ингибирования ферментов TET под действием Bobcat339. Дот-блоттинг. 5-hmCyt — 5-гидроксиметилцитозин; т.0 — начальная точка эксперимента (клетки без добавления ингибитора); 12 ч, 16 ч и 20 ч — клетки после инкубирования с Bobcat339 в течение 12, 16 и 20 часов соответственно

при постоянном напряжении 100 В в 25 мМ Трис-НСI буфере, рН 8,3, содержащем 192 мМ глицина и 20% этанола (по объему). Перед проведением иммунохимического окрашивания осуществляли блокировку мест неспецифического связывания белков на мембране в 5% растворе сухого обезжиренного молока на ТБСТ (20 мМ Трис-НСI, рН 7,6, содержащий 150 мМ NaCl и 0,1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 30 минут, постоянно перемешивая. Затем мембрану инкубировали при +4 °С в течение ночи в растворе антител, специфичных к *Ноха10* (sc-271428, Santa Cruz Biotech, США; разведение антител 1:500), к *Ноха11* (ab72591, Abcam, Великобритания; разведение 1:1000), к *Hif1a* (ab2185, Abcam, Великобритания; разведение 1:2000), а также к *Gapdh* (2118, Cell Signaling Technology, США; разведение 1:1000). Далее мембрану отмывали в растворе ТБСТ и инкубировали в растворе антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (анти-мышинные антитела — A9044, Sigma-Aldrich, США; разведение 1:20 000; антикроличьи антитела — A16096, Invitrogen, США; разведение 1:5000), на 5% молоке в ТБСТ в течение 1 часа при комнатной температуре. От несвязавшихся вторичных антител мембраны также отмывали раствором ТБСТ. Для детекции сигнала использовали хемилюминесцентный субстрат Clarity либо Clarity Max (Bio-Rad, США), измеряли хемилюминесценцию мембраны на приборе Chemidoc Touch (Bio-Rad, США). При проявке мембран ориентировались на положение белковых полос относительно маркеров и убеждались, что они соответствуют ожидаемым (*Gapdh* — 37 кДа, *Hif1a* — 120 кДа, *Ноха10* — 38 кДа, *Ноха11* — 40 кДа, по данным производителей антител).

#### ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР)

Выделение РНК из образцов маток мышей проводили с использованием реагента Extract RNA («Евроген», РФ). Выход и чистоту препарата РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора MMLV RT Kit (Евроген, РФ) на амплификаторе Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Германия). Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческого реактива qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», РФ) на амплификаторе Bio-Rad Real-Time

CFX96 Touch (BioRad, США). Последовательности праймеров, использованные в работе:

- для гена *36b4* мыши прямой праймер 5'-GCTC-CAAGCAGATGCAGCA-3', обратный праймер 5'-CCGGATGTGAGGCAGCA-3';
- для гена *Ноха10* мыши прямой праймер 5'-CT-GCCGCGAACTCCTTTTGTG-3', обратный праймер 5'-GCTTCATTACGCTTGCTGCC-3';
- для гена *Ноха11* мыши прямой праймер 5'-AATGGCTGTGGAGTGTGG-3', обратный праймер 5'-CTCTCAGGCTCTTGAAGG-3';
- для гена *36B4* человека прямой праймер 5'-CGACCTGGAAGTCCAACAC-3', обратный праймер 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3';
- для гена *HOXA10* человека прямой праймер 5'-GGTTTGTCTGACTTTTTGTTTCT-3', обратный праймер 5'-TGACACTTAGGACAATATCTATCTCTA-3';
- для гена *HOXA11* человека прямой праймер 5'-AGTTCTTTCTTCAGCGTCTACATT-3', обратный праймер 5'-TTTTTCCTTCATTCTCCTGTTCTG-3'.

#### Статистическая обработка данных

В статье приведены репрезентативные результаты, воспроизводящиеся в трех независимых экспериментах ( $n = 3$ ). Для проверки значимости различий нормированной экспрессии генов, измеренной методом ПЦР в реальном времени, использовали критерий Манна — Уитни. Различия результатов считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты

##### Экспрессия генов *Ноха10* и *Ноха11* возрастает в матке мыши после родов

Впервые получены данные о том, что в течение первых суток после родов в тканях матки мыши возрастает экспрессия генов *Ноха10* и *Ноха11* (рис. 2). Согласно полученным результатам, уровень транскрипции гена *Ноха10* возрастает в течение первых четырех часов после родов, а накопление белкового продукта *Ноха10* в тканях матки мыши происходит позднее — к 24 часам после родов. Сравнительно высокое содержание белка *Ноха10* в матке в предродовой период объясняется присутствием в лизате матки до родов значительного количества плаценты, для которой характерна высокая экспрессия *Ноха10* [18].

В случае *Ноха11* уже к первым четырем часам после родов в тканях матки возрастает содержание как транскриптов, так и белкового продукта.



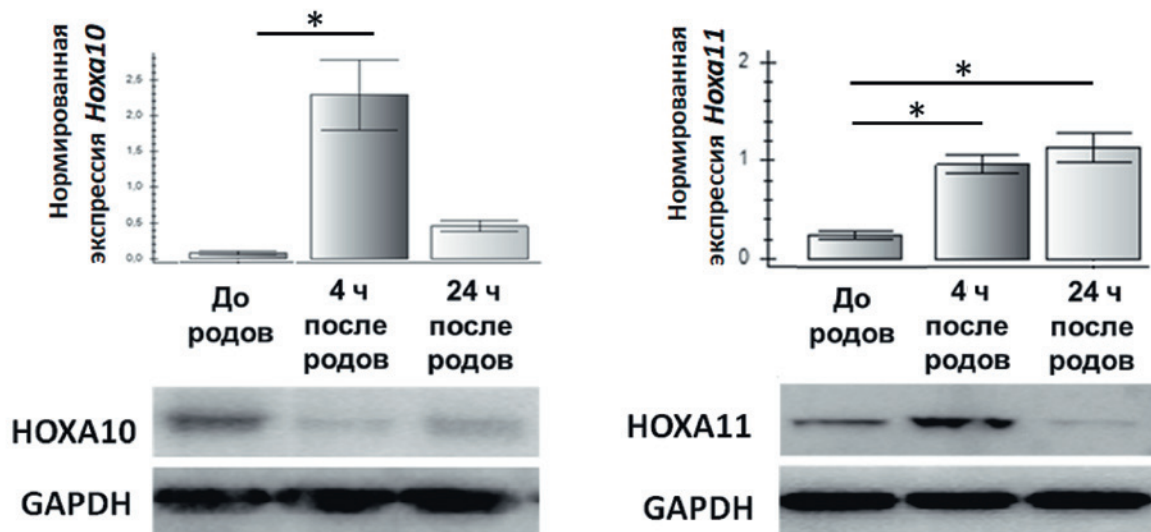


Рис. 2. Экспрессия Ноха10 и Ноха11 на уровне мРНК и белка в тканях матки мыши в день предполагаемой даты родов, а также спустя 4 ч и спустя 24 ч после родов. Результаты ОТ-ПЦР (гистограммы) и иммуноблоттинга. \* $p < 0,05$

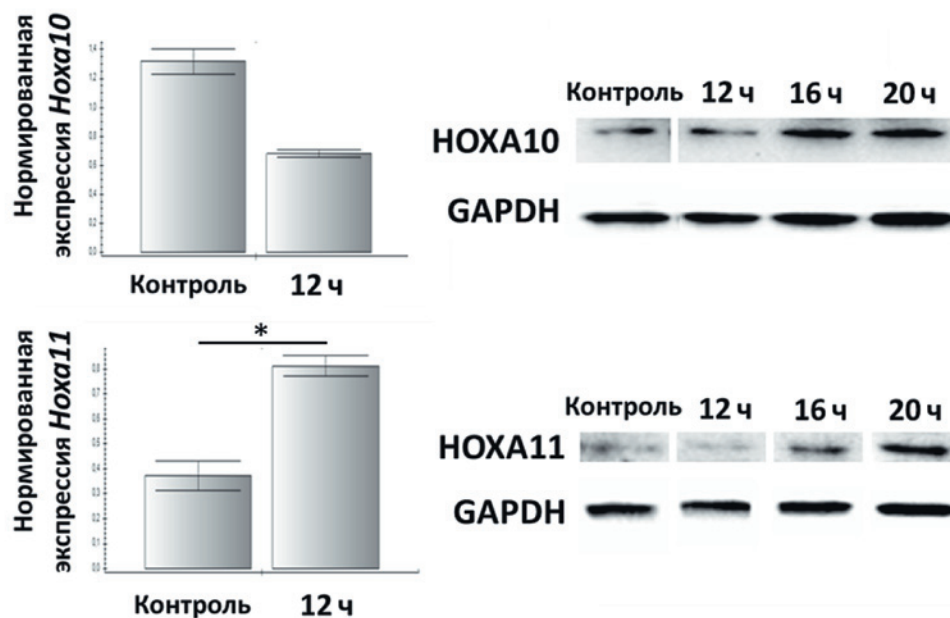


Рис. 3. Влияние активации HIF с использованием  $\text{CoCl}_2$  на экспрессию HOXA10 и HOXA11 на уровне мРНК и белка в СК эндометрия. Результаты ОТ-ПЦР (гистограммы) и иммуноблоттинга. \* $p < 0,05$

### Экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11* возрастает в стромальных клетках эндометрия в модели гипоксии

Гипоксию моделировали *in vitro*, взяв за основу широко распространенную методику с использованием хлорида кобальта (II) ( $\text{CoCl}_2$ ). К клеткам добавляли  $\text{CoCl}_2$  до концентрации 200 мкМ и спустя 12 часов измеряли в них экспрессию генов *HOXA10* и *HOXA11* методом ОТ-ПЦР. Кроме того, спустя 12, 16 либо 20 ч после

добавления  $\text{CoCl}_2$  оценивали содержание белков HOXA10 и HOXA11 в клеточных лизатах. Результаты приведены на рисунке 3.

По полученным данным можно заключить, что влияние  $\text{CoCl}_2$  на экспрессию генов HOXA10 и HOXA11 различается. Так, для HOXA10 через 12 часов после добавления  $\text{CoCl}_2$  количество белкового продукта оставалось практически неизменным и увеличивалось спустя 16 часов

(рис. 3, верхний ряд). В случае с *НОХА11* по истечении 12 часов после добавления  $\text{CoCl}_2$  уровень мРНК возрастал, а спустя 16 и 20 часов в клетках возрастало и содержание белка *НОХА11* (рис. 3, нижний ряд).

**Активность ферментов семейства ТЕТ необходима для возрастания экспрессии генов *НОХА10* и *НОХА11* в стромальных клетках эндометрия в модели гипоксии**

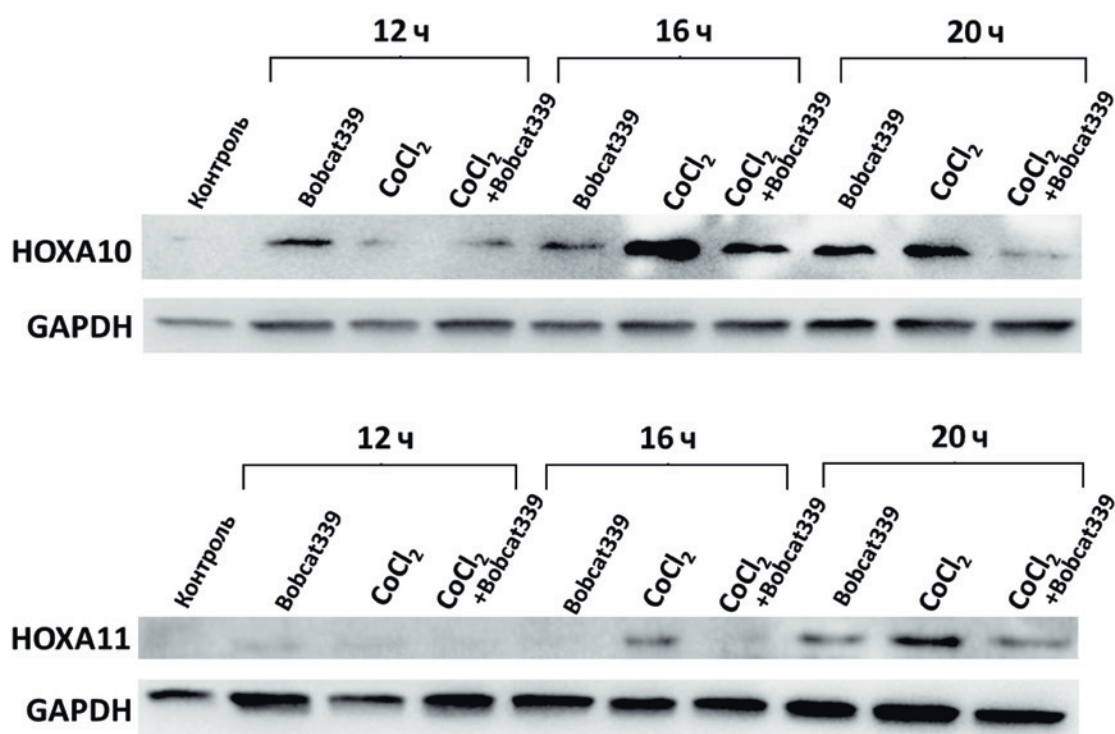
Чтобы проверить, участвуют ли ферменты семейства ТЕТ в процессе возрастания экспрессии *НОХА10* и *НОХА11* в *in vitro* модели гипоксии, одновременно с моделированием гипоксии добавляли к клеткам эндометрия селективный ингибитор ферментативной активности белков Tet (*Bobcat339*). Экспрессию генов *НОХА10* и *НОХА11* в клетках оценивали по накоплению белковых продуктов, которое измеряли методом иммуноблоттинга аналогично описанному ранее. Полученные результаты приведены на рисунке 4. По результатам иммуноблоттинга видно, что само по себе добавление *Bobcat339* к стромальным клеткам эндометрия приводит к увеличению количества белков *НОХА10* (на 12 часов) и *НОХА11* (на 16 и 20 часов). Однако при добавлении *Bobcat339* одновремен-

но с  $\text{CoCl}_2$  наблюдается снижение экспрессии *НОХА10* и *НОХА11*, вызываемое  $\text{CoCl}_2$ .

**Обсуждение**

Эндометрий человека и мыши — уникальный пример ткани, обладающей способностью к многократной регенерации. Изучение механизмов регенерации эндометрия необходимо для установления способов управлять заживлением других тканей и органов.

Данная работа посвящена вопросам заживления эндометрия после повреждения, а конкретно — возможной роли в этих процессах генов *Нох10* и *Нох11*, специфичных для эндометрия. Для понимания, изменяется ли экспрессия этих генов в тканях матки по механизмам, не связанным с действием половых гормонов, нами было предложено использовать модель родового повреждения эндометрия у мыши. Известно, что у мыши в течение первых суток после родов, когда идет активное заживление эндометрия, уровень прогестерона и эстрадиола остается стабильно низким [19], а следовательно, они мало влияют на экспрессию изучаемых генов *Нох*. Поэтому данная модель позволяет исключить влияние меняющегося гормонального фона и, та-

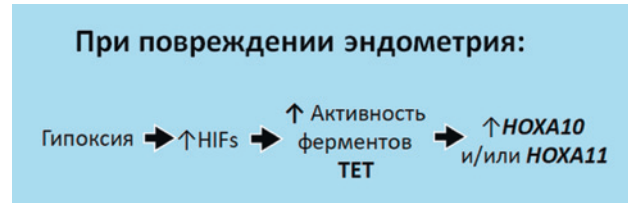


**Рис. 4.** Влияние добавления ингибитора ТЕТ на возрастание экспрессии белков *НОХА10* и *НОХА11*, вызванное добавлением  $\text{CoCl}_2$ , в стромальных клетках эндометрия человека. Иммуноблоттинг

ким образом, сосредоточиться на изменениях экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11*, вызванных именно повреждением эндометрия.

В работе впервые получены данные о том, что экспрессия специфических для эндометрия генов *Hoxa10* и *Hoxa11* активируется в тканях матки мыши в ответ на повреждение. Следует отметить, что накопление белка *Hoxa11* происходило раньше, чем *Hoxa10*. Это расхо­дится с хорошо известными данными о том, что при экспрессии смежных генов *Hox* одного локуса в первую очередь происходит экспрессия генов с меньшим номером [2]. В данной модели, по всей видимости, активация экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в матке происходит по различным механизмам. К 24 часам после родов в тканях матки мыши содержание белкового продукта *Hoxa11* снижается несмотря на то, что уровень транскрипции гена *Hoxa11* остается повышенным. Это можно объяснить вкладом механизмов регуляции экспрессии *Hoxa11* на уровне мРНК (например, микроРНК), или повышением уровня протеасомной деградации белка *Hoxa11*.

Какие стимулы способны активировать экспрессию *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки при ее повреждении? Из литературы известно, что родовое повреждение эндометрия сопровождается локальной гипоксией [20], которая приводит к значительному изменению экспрессионного профиля в клетках по механизму, связанному с активацией транскрипционного фактора *Hif1α*. Rytkonen и его коллеги в 2020 году методом транскриптомного анализа установили, что в иммортализованных стромальных клетках человеческого эндометрия при гипоксии наблюдается повышение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* [21]. На основе анализа литературы нами был предположен механизм, за счет которого активация транскрипционного фактора *HIF1α* может приводить к обнаруженному нами возрастанию экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* (рис. 5). Известно, что в постнатальный период экспрессия генов семейства *Hox* в стромальных клетках в значительной степени подавлена за счет работы комплекса *Polcomb* [22]. Данный комплекс способствует метилированию остатков цитозина в промоторных участках большого набора генов, что приводит к снижению экспрессии данных генов. Следовательно, для возрастания экспрессии генов семейства *Hox* в постнатальный период требуется работа системы деметилирования,



**Рис. 5.** Предполагаемый механизм возрастания экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* при гипоксии, вызванной повреждением эндометрия

которая приводит к удалению метильных групп с остатков цитозина в ДНК. Ключевыми ферментами системы деметилирования являются белки семейства ТЕТ. Показано, что возможна активация экспрессии ферментов семейства ТЕТ под действием фактора *HIF* [23, 24]. Исходя из этого, нами было выдвинуто предположение, что повышение уровня экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* при гипоксии может быть обусловлено влиянием ферментов ТЕТ, экспрессия которых, в свою очередь, активируется транскрипционными факторами *HIF*. Данная гипотеза была проверена нами в модели гипоксии *in vitro* на культуре стромальных клеток человеческого эндометрия.

Результаты, полученные в модели гипоксии *in vitro*, позволяют заключить, что возрастание экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в ответ на стабилизацию *HIF* под действием  $\text{CoCl}_2$  в стромальных клетках эндометрия опосредуется активацией ферментов ТЕТ. Следует отметить, что само по себе добавление *Bobcat339* к культуре стромальных клеток эндометрия приводит к противоположному эффекту — к возрастанию экспрессии генов *HOXA10* (на 12 часов; рис. 4, верхняя панель) и *HOXA11* (на 16 и 20 часов; рис. 4, нижняя панель). Это свидетельствует о том, что наблюдаемое снижение накопления *Hoxa10* и *Hoxa11* в клетках при одновременном добавлении  $\text{CoCl}_2$  и *Bobcat339* не является результатом двух независимых механизмов действия *Bobcat339* и  $\text{CoCl}_2$  на экспрессию данных генов.

Результаты, полученные в данной работе в *in vitro* модели гипоксии, во многом согласуются с нашими данными, полученными *in vivo*, относительно существования механизмов, приводящих к возрастанию экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в эндометрии в ответ на повреждение. Однако в случае моделирования гипоксии в культуре стромальных клеток человеческого эндометрия сначала наблюдалось возрастание



экспрессии *HOXA10*, а позднее — *HOXA11*. После родового повреждения, напротив, в тканях матки сначала повышается содержание белка *Hoxa11*. Это можно объяснить тем, что на экспрессию генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки наряду с гипоксией могут влиять и другие вызванные повреждением стимулы, такие как воспаление, которые в нашей *in vitro* модели не были учтены. Кроме того, поскольку в работе были использованы гомогенизированные образцы мышечных маток, полученные данные позволяют судить лишь об изменении усредненных значений экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в тканях матки, что является несомненным ограничением настоящей работы. В дальнейших исследованиях планируется изучить динамику изменения экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в разных слоях матки, а также в разных типах клеток, составляющих матку (в частности, в стромальных клетках эндометрия и в эпителии).

Стоит также отметить, что полученные результаты указывают на различие в регуляции генов *Hoxa10* и *Hoxa11*. Говоря об эндометрии, данные гены, как правило, рассматривают как функционально дублирующие друг друга. Обнаруженные нами различия в регуляции данных генов свидетельствуют в пользу того, что гены *Hoxa10* и *Hoxa11* существенно различаются по свойствам и роли в процессах регенерации эндометрия.

Результаты настоящего исследования открывают возможность изучения новых механизмов регуляции экспрессии генов *Hoxa10* и *Hoxa11* в эндометрии, связанных с действием стероидных гормонов, а с ответом ткани на повреждения, а также позволяют предположить, что данные гены могут участвовать в регуляции процессов заживления эндометрия после повреждения по различающимся механизмам.

## Литература

1. Kulebyakina M, Makarevich P. Hox-Positive Adult Mesenchymal Stromal Cells: Beyond Positional Identity. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:624. DOI: 10.3389/fcell.2020.00624
2. Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science.* 2003;301:331–333. DOI: 10.1126/science.1085753
3. Lappin T, Grier D, Thompson A, Halliday H. HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J.* 2006 Jan;75(1):23–31. Erratum in: *Ulster Med J.* 2006 May;75(2):135. PMID: 16457401; PMCID: PMC1891803
4. Svingen T, Tonissen K. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity.* 2006;97:88–96. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800847
5. Chang H, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99: 2877–12882. DOI: 10.1073/pnas.162488599
6. Ackema K, Charité J. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev.* 2008;17:979–1091. DOI: 10.1089/scd.2007.0220
7. Picchi J, Trombi L, Spugnese L, Barachini S, Maroni G, Brodano G, et al. HOX and TALE signatures specify human stromal stem cell populations from different sources. *J Cell Physiol.* 2013;228:879–889. DOI: 10.1002/jcp.24239
8. Uyeno L, Newman-Keagle J, Cheung I., Hunt T, Young D, Boudreau N. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res.* 2001;100:46–56. DOI: 10.1006/jsre.2001.6174
9. Hansen S, Myers C, Charboneau A, Young D, Boudreau N. HoxD3 accelerates wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol.* 2003;163:2421–2431. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63597-3
10. Rux D, Song J, Pineault K, Mandair G, Swinehart I, Schlientz A et al. (2017). Hox11 function is required for region-specific fracture repair. *J Bone Miner Res.* 2017;32:1750–1760. DOI: 10.1002/jbmr.3166
11. Qu F, Palte I, Gontarz P, Zhang B, Guilak F. Transcriptomic analysis of bone and fibrous tissue morphogenesis during digit tip regeneration in the adult mouse. *FASEB J.* 2020; 34(7):9740–9754. DOI: 10.1096/fj.202000330R
12. Taylor H. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med.* 2000;18:81–89. DOI: 10.1055/s-2000-13478

13. Eremichev R, Kulebyakina M, Alexandrushkina N, Nimiritsky P, Basalova N, Grigorieva O, et al. Scar-free healing of endometrium: tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:212. DOI: 10.3389/fcell.2021.616893
14. Munoz-Sanchez J, Chanez-Cardenas M. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J App Toxicol.* 2019;39(4):556–570. DOI: 10.1002/jat.3749
15. Chua G, Wassarman K, Sun H, Alp J, Jarczyk E, Kuzio N, et al. Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2019;10(2):180–185. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00474
16. Zhang X, Yang J, Shi D, Cao Z. TET2 suppresses nasopharyngeal carcinoma progression by inhibiting glycolysis metabolism. *Canc Cell Int.* 2020;20(1):1–14. DOI: 10.1186/s12935-020-01456-9
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(9):4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350
18. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature.* 1995;374(6521):460–463. DOI: 10.1038/374460a0. PMID: 7700356
19. Decatanzaro D, Muir C, Beaton E, Jetha M. Non-invasive repeated measurement of urinary progesterone, 17 $\beta$ -estradiol, and testosterone in developing, cycling, pregnant, and postpartum female mice. *Steroids.* 2004;69(10):687–696.
20. Yoshii A, Kitahara S, Ueta H, Matsuno K, Ezaki T. Role of uterine contraction in regeneration of the murine postpartum endometrium. *Biol Reprod.* 2014;91:32. DOI: 10.1095/biol-reprod.114.117929
21. Rytönen K, Heinosaari T, Mahmoudian M, Ma X, Perheentupa A, Elo L, et al. Transcriptional responses to hypoxia in endometrial and decidual stromal cells. *Soc Reprod Fert.* 2020;160(1):39–51. DOI: 10.1530/REP-19-0615
22. Schumacher A, Magnuson T. Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet.* 1997;13(5):167–170. DOI: 10.1016/s0168-9525(97)01133-5
23. Zhu J, Wang K, Li T, Chen J, Xie D, Chang X, et al. Hypoxia-induced TET1 facilitates trophoblast cell migration and invasion through HIF1 $\alpha$  signaling pathway. *Sci Rep.* 2017;7:8077. DOI: 10.1038/s41598-017-07560-7
24. Tsai Y, Chen H, Chen S-Y, Cheng W-C, Wang H-W, Shen Z-J, et al. TET1 regulates hypoxia-induced epithelial–mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome Biol.* 2014;15:513. DOI: 10.1186/s13059-014-0513-0

## Об авторах

**Кулебякина Мария Александровна** — м.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий кафедры биохимии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Смирнова Анастасия Сергеевна** — студентка 2-го курса магистратуры по регенеративной биомедицине Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Попов Владимир Сергеевич** — к.б.н., заведующий лабораторией НИЛ трансляционной медицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; в.н.с. Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова.

**Еремичев Роман Юрьевич** — к.м.н., м.н.с. лаб. генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова.

**Макаревич Павел Игоревич** — к.м.н., зав. лаб. генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова.

М.А. Кулебякина, А.С. Смирнова, В.С. Попов, Р.Ю. Еремичев, П.И. Макаревич  
Экспрессия генов *HOXA* в стромальных клетках эндометрия

### Authors

**Maria A. Kulebyakina** — junior researcher at Gene and cellular technology research laboratory at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

**Anastasia S. Smirnova** — Master's student in Regenerative Biomedicine at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

**Vladimir S. Popov** — PhD, head of Translation medicine research laboratory at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.; lead researcher at Institute for regenerative medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

**Roman Y. Eremichev** — PhD, junior researcher at Gene and cell therapy laboratory, Institute for regenerative medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.

**Pavel I. Makarevich** — MD, PhD, head of Gene and cell therapy laboratory, Institute for regenerative medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University; assistant professor at Biochemistry and Regenerative Medicine department at Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University.