

Выделение и культивирование клеток эпителия эндометрия человека

И.В. Кожухарова, И.К. Кунеев, М.А. Шорохова, М.В. Харченко,
Е.С. Корнилова, А.П. Домнина

ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, Россия,
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

Адрес для корреспонденции: aldomnina@mail.ru

Аннотация

Целью данной работы была разработка и оптимизация методов получения и культивирования клеток эпителия эндометрия человека из неинвазивного источника — менструальной крови. Исследование направлено на создание персонализированных моделей эндометрия *in vitro* для изучения механизмов имплантации эмбриона, поиска маркеров рецептивности эндометрия и разработки новых подходов к лечению гинекологических заболеваний, включая бесплодие. **Методы.** Для получения клеток эндометрия использовалась менструальная кровь, собранная от здоровых доноров. Фрагменты эндометрия выделялись с помощью фильтрации и ферментативной обработки. Культивирование клеток проводилось в различных условиях: в виде монослоя (2D), тканевой культуры и органоидов (3D). Для подтверждения эпителиального фенотипа использовалось иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры цитокератин и Е-кадгерин. Для исследования эндцитоза рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в тканевой культуре использовался флуоресцентно-меченный эпидермальный фактора роста (EGF). **Результаты.** Было показано, что менструальная кровь является доступным источником для получения жизнеспособных клеток эндометрия. Полученная тканевая культура эндометрия сохраняет архитектуру ткани и может служить моделью для исследования эндцитоза рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Культивирование клеток эпителия эндометрия в виде органоидов позволило сохранить эпителиальный фенотип и пролиферативную активность клеток в течение длительного времени. Органоиды демонстрировали способность к самоорганизации и формированию однослойных клеточных структур, что подтверждает их пригодность для моделирования процессов, происходящих в эндометрии *in vivo*. В то же время культивирование в 2D-условиях приводило к быстрому старению клеток и потере их функциональных свойств. **Заключение.** Разработанные методы культивирования клеток эпителия эндометрия в виде тканевой культуры и органоидов открывают новые возможности для изучения механизмов имплантации эмбриона и поиска маркеров рецептивности эндометрия. Полученные результаты имеют большое значение для развития персонализированной медицины, в частности для повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и разработки новых терапевтических подходов к лечению гинекологических заболеваний.

Ключевые слова: персонализированная медицина, эндометрий, эпителий эндометрия, органоиды, менструальная кровь, имплантация эмбриона, рецептивность эндометрия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование исследования: исследование по выделению, культивированию и анализу клеток эпителия эндометрия человека выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10126. Исследование стимуляции эндцитоза EGFR и выявление его

локализации в клетках кокультуры эпителия и стромальных клеток эндометрия выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00335.

Для цитирования: Кожухарова И.В., Кунеев И.К., Шорохова М.А., Харченко М.В., Корнилова Е.С., Домнина А.П. Выделение и культивирование клеток эпителия эндометрия человека. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(4):49–67. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-49-67>

Поступила 10.12.2024

Обработана 18.12.2024

Принята к публикации 21.12.2024

Isolation and cultivation of human endometrial epithelial cells

Irina V. Kozhukharova, Ivan K. Kuneev, Maria A. Shorokhova,
Marianna V. Kharchenko, Elena S. Kornilova, Alisa P. Domnina

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Russia, 194064, St. Petersburg, Tikhoretsky ave., 4

Correspondence address: aldomnina@mail.ru

Abstract

The **aim** of this work was to develop and optimize methods for obtaining and culturing human endometrial epithelial cells from a non-invasive source — menstrual blood. The study aims to create personalized in vitro endometrial models to study embryo implantation mechanisms, search for markers of endometrial receptivity, and develop new approaches to treat gynecological diseases, including infertility. **Methods.** Menstrual blood collected from healthy donors was used to obtain endometrial cells. Endometrial fragments were isolated by filtration and enzymatic treatment. Cell culture was carried out under various conditions: as a monolayer (2D), tissue culture and organoids (3D). Immunocytochemical staining for the markers cytokeratin and E-cadherin was used to confirm the epithelial phenotype. To investigate endocytosis of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in tissue culture, fluorescence-labeled EGF was used. **Results.** Menstrual blood has been shown to be an affordable source for producing viable endometrial cells. The resulting endometrial tissue culture preserves tissue architecture and can serve as a model for the study of endocytosis of the epidermal growth factor receptor (EGFR). Cultivation of endometrial epithelium cells in the form of organoids made it possible to preserve the epithelial phenotype and proliferative activity of cells for a long time. Organoids demonstrated the ability to self-organize and form single-layer cell structures, which confirms their suitability for modeling the processes occurring in the endometrium *in vivo*. At the same time, cultivation under 2D conditions led to rapid aging of cells and loss of their functional properties. **Conclusion.** The developed methods for culturing endometrial epithelial cells in the form of tissue culture and organoids open up new possibilities for studying the mechanisms of embryo implantation and searching for markers of endometrial receptivity. The findings have important implications for the development of personalized medicine, in particular for improving the effectiveness of assisted reproductive technology (ART) programs and developing new therapeutic approaches for the treatment of gynecological diseases.

Keywords: personalized medicine, endometrium, endometrial epithelium, organoids, menstrual blood, embryo implantation, endometrial receptivity

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

Funding: The study on the isolation, cultivation and analysis of human endometrial epithelial cells was supported by Russian Science Foundation (grant No. 22-74-10126). The study of stimulation of endocytosis of EGFR and the identification of its localization in cells of co-culture of epithelium and stromal cells of the endometrium was supported by Russian Science Foundation (grant No. 23-14-00335).

For citation: Kozhukharova I.V., Kuneev I.K., Shorokhova M.A., Kharchenko M.V., Kornilova E.S., Domnina A.P. Isolation and cultivation of human endometrial epithelial cells. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(4):49–67. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-49-67>

Received 10.12.2024

Revised 18.12.2024

Accepted 21.12.2024

Список сокращений:

ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение

ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии

LIF — Leukemia inhibitory factor (фактор, ингибирующий лейкемию)

PBS — Phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

DMEM/F12 — Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (среда для культивирования клеток)

EGF — Epidermal Growth Factor (эпидермальный фактор роста)

EGFR — Epidermal Growth Factor Receptor (рецептор эпидермального фактора роста)

bFGF — basic Fibroblast Growth Factor (основной фактор роста фибробластов)

TGF-β — transforming Growth Factor beta (трансформирующий фактор роста бета)

BMP — bone Morphogenetic Protein (костный морфогенетический белок).

MAPK — mitogen-Activated Protein Kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)

GSK-3 — glycogen Synthase Kinase-3 (киназа гликогенсинтазы-3)

DAPI — 4',6-diamidino-2-phenylindole (флуоресцентный краситель для окрашивания ядер клеток)

BSA — bovine serum albumin (бычий сывороточный альбумин)

ЭпК — эпителиальные клетки

ВКМ — внеклеточный матрикс

NAD — nicotinamide adenine dinucleotide (никотинамид-аденин-динуклеотид)

PARP — poly (ADP-ribose) polymerase (поли-АДФ-рибоз-полимераза)

ROCK — rho-associated protein kinase (Rho-ассоциированная протеинкиназа)

CK1 — casein kinase 1 (казеинкиназа 1)

ALK — activin receptor-like kinase (киназа, подобная рецептору активина)

Smad — small mothers against decapentaplegic (семейство белков, участвующих в передаче сигналов TGF-β)

HB-EGF — heparin-binding EGF-like growth factor (гепарин-связывающий фактор роста, подобный EGF)

c-ErbB — семейство рецепторов тирозинкиназ, включая EGFR

DKK1 — dickkopf-related protein 1 (белок, ингибирующий путь Wnt)

LRP6 — low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (рецептор, связанный с липопротеинами низкой плотности 6)

Wnt — сигнальный путь, регулирующий клеточную пролиферацию и дифференцировку

TGF-β1 — transforming growth factor beta 1 (трансформирующий фактор роста бета 1)

A83-01 — ингибитор рецептора TGF- β 1

NOGGIN — антагонист BMP-4

CHIR99021 — ингибитор киназы GSK-3

R-spondin 1 — белок, активирующий путь Wnt

Ki67 — маркер пролиферации клеток

β -галактозидаза — фермент, используемый для определения клеточного старения

МСК — мезенхимные стволовые клетки

ЭнМСК — эндометриальные мезенхимные стволовые клетки

Введение

Достижения в области биотехнологии открывают новые возможности для диагностики и терапии многих заболеваний, а также для развития персонализированной медицины, которая предполагает индивидуальное лечение с учетом биологической информации о пациенте [1–5]. Данный подход повышает безопасность и эффективность терапии при одновременном снижении побочных эффектов, что востребовано во многих областях медицины, в том числе в гинекологии и репродуктологии [6–10]. Однако переход к персонализированной медицине невозможен без разработки релевантных моделей тканей на основе биологического материала пациента для индивидуального подбора методов лечения *in vitro*. Разработка функциональных моделей тканей женской репродуктивной системы является особо актуальной в силу специфического строения и функционирования этой системы у человека [10–13].

Одним из основных компонентов женской репродуктивной системы является матка, внутренняя поверхность которой покрыта эндометрием — слизистой оболочкой, преимущественно состоящей из стромы, покрытой однослойным призматическим эпителием [14–16]. Именно эндометрий играет ключевую роль в наступлении и развитии беременности. Под воздействием стероидных гормонов эстрогена и прогестерона на протяжении менструального цикла в эндометрии происходят характерные изменения, необходимые для имплантации эмбриона, возможной только в период «окна имплантации», продолжительность которого у человека в среднем составляет 4 дня (обычно — с 20-го по 24-й день менструального цикла при 28-дневном цикле) [14–17]. Ключевое значение в процессе имплантации имеет так называемая рецептивность эндометрия — способность эндометрия

воспринять бластоцисту и обеспечить необходимые этапы имплантации [18, 19]. В этот период в эндометрии появляются характерные маркеры рецептивности, такие как образование эпителиальными клетками пиноподий, на поверхности которых располагаются основные рецепторы для прикрепления бластоцисты [20–22]. Экспрессируются белки клеточной адгезии, в частности интегрины, начинается секреция цитокинов, таких как LIF (Leukemia inhibitory factor, фактор, ингибирующий лейкемию) [23–26].

Считается, что рецептивный эндометрий также оказывает влияние на развитие бластоцисты. Было показано, что культивирование эмбрионов в среде, полученной от эпителиальных клеток эндометрия, повышает частоту имплантации в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) за счет активации паракринных факторов, влияющих на функциональное созревание эмбриона [27, 28]. Несмотря на то что благодаря вспомогательным репродуктивным технологиям (ВРТ) удалось преодолеть многие репродуктивные дисфункции, до 70% неудач в программах ВРТ до сих пор связаны с нарушением имплантации эмбриона в связи с нерецептивностью эндометрия [29–33].

В настоящее время продолжается поиск маркеров рецептивности эндометрия, которые позволили бы прогнозировать успех программ ВРТ и давали бы в случае необходимости возможность оценить степень повреждения эндометрия и эффективность лечения бесплодия [30–32].

Кроме того, одной из проблем ВРТ является отсутствие способов терапевтического воздействия на нерецептивный эндометрий. Гормонотерапия нерецептивного эндометрия может быть недостаточно эффективна в связи с отсутствием полноценного рецепторного аппарата эндометрия,

низким уровнем синтеза рецепторных белков, молекул адгезии, структурными перестройками эндометриальных желез и стромальным фиброзом в эндометрии [31, 34]. Поэтому актуальным является поиск новых способов воздействия на нерецептивный эндометрий с целью активации пролиферации и повышения уровня экспрессии рецепторов к гормонам. Однако проводимые исследования ограничены отсутствием релевантной лабораторной модели, поскольку, несмотря на то что репродуктивная система млекопитающих устроена единообразно, между человеком и лабораторными животными все же есть существенные отличия [35, 36]. В отличие от распространенных лабораторных животных, эндометрий у человека подвергается морфологическим изменениям и частичной десквамации в ходе каждого менструального цикла [14–17].

Вследствие отсутствия релевантных моделей роль эпителия в имплантации у человека изучена мало. Первый контакт между организмом матери и бластоцистой опосредован именно эпителием эндометрия, но все исследования ранних этапов имплантации эмбриона проводились с использованием доступных животных моделей (мышей) и экстраполировались на человека из-за ограниченных возможностей наблюдения [35–37]. Таким образом, получение, культивирование и последующее исследование свойств клеток эпителия эндометрия имеет большое значение для лучшего понимания механизмов имплантации, а также механизмов, регулирующих «окно имплантации» у человека. Получение этих клеточных культур важно для создания пациент-специфичных моделей эндометрия человека *in vitro* для разработки персонализированных методов лечения.

В основном для получения клеточных культур эпителия эндометрия человека используют образцы эндометрия, полученные в результате биопсии или гистерэктомии. Данные процедуры являются травматичными для пациентов и ограничивают возможности повторного взятия материала. Несмотря на то что участки эндометрия могут быть получены и не инвазивным путем — из менструальной крови доноров, в литературе описаны лишь единичные исследования по использованию данного источника для выделения эпителиальных клеток эндометрия. В основном в опубликованных работах представлены только методики получения клеток. Настоящее исследование было направлено на выделение клеток

эпителия эндометрия человека из менструальной крови, разработку протоколов культивирования этих клеток как в 2D-, так и в 3D-системе, а также разработку протоколов кокультивирования совместно со стромальными клетками эндометрия в виде тканевой культуры.

Материалы и методы

Получение биологического материала

Менструальная кровь была получена от 3-х здоровых доноров в возрасте 32, 36 и 38 лет, не принимающих гормональные препараты, в рамках совместных исследований с ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. От всех доноров было получено информированное согласие на использование биологического материала, исследования были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии РАН (№ протокола КБЭ 04/24 от 06.06.2024). Сбор менструальной крови доноры проводили самостоятельно с использованием менструальных чаш с 20-го по 24-й час после начала менструального кровотечения. Перед каждым использованием менструальные чаши стерилизовали кипячением. Сбор образцов осуществляли в течение 4-х часов затем образцы менструальной крови (2–10 мл) переносили в пробирки с транспортировочным раствором, состоящим из раствора PBS (Росмедбио 2.1.1), 10% смеси антибиотиков (пенициллина/стрептомицина) (Gibco 15070-063), 4 мкг/мл антимикотика Амфотерицина («Биолот», Россия), цитрата натрия, и в течение 2 ч транспортировали для дальнейших манипуляций. От каждого донора таким способом производили сбор менструальной крови в течение 3-х менструальных циклов.

Выделение клеток эпителия эндометрия человека

Полученные образцы менструальной крови разводили стерильным раствором PBS в 6 раз и фильтровали через сетчатый фильтр с размером пор 40 мкм (Biofil CSS013040). Оставшиеся на сетке фильтра фрагменты эндометрия промывали раствором PBS несколько раз для удаления оставшихся клеток крови, затем сетчатый фильтр переворачивали и участки эндометрия вымывали в 50 мл центрифужные пробирки раствором PBS (Росмедбио 2.1.1). Далее образцы центрифугировали при ускорении 400 g в течение 5 мин. После этого сливали супернатант, осадок ресуспензировали в 2 мл среды DMEM/F12 (Gibco, 42400010), содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки (HyClone, SV30160),

1% антибиотика (пенициллина/стрептомицина), 30 ед. диспазы (Worthington LS01209) и 0,5% коллагеназы типа 1 (Gibco 17100-017), и инкубировали в течение 30 мин при температуре +37 °C.

После инкубации в пробирку добавляли 10 мл среды DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки, 1% смеси антибиотиков (пенициллина/стрептомицина), и повторно фильтровали через сетчатый фильтр с размером пор 40 мкм. В результате крупные фрагменты эпителия эндометрия задерживались сеткой фильтра, в то время как суспензия единичных клеток стромы эндометрия проходила через ячейки сетчатого фильтра. Полученные кусочки вымывали в 50 мл центрифужную пробирку раствором PBS. Далее образцы центрифугировали при 400 g в течение 5 мин. Супернатант заменяли на соответствующую культуральную среду либо на Матригель (BD Bioscience 354234).

Сокультивирование стромальных и эпителиальных клеток эндометрия человека

Для получения кокультуры собранные по протоколу, описанному выше, образцы эндометрия из менструальной крови без последующей обработки ферментами помещали на чашки Петри и культивировали со сменой среды каждые 3 дня и анализировали. Для культивирования использовали среду DMEM/F12, содержащую 10% эмбриональной коровьей сыворотки, 1% смеси антибиотиков (пенициллина/стрептомицина).

Культивирование клеток эпителия эндометрия человека в виде монослоя

Для культивирования клеток эпителия в виде монослоя полученные по протоколу, описанному выше, фрагменты эпителия эндометрия высевали на лунки четырехлуночных культуральных планшетов, предварительно покрытых Матригелем или коллагеном типа I. Для этого Матригель или коллаген типа I разбавляли средой DMEM/F12 до концентрации 100 мкг/см², наносили по 300 мкл/лунку и инкубировали при +37 °C в течение 30 мин, затем раствор сливали, а лунки использовали для культивирования клеток в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки, 1% смеси антибиотиков (пенициллина/стрептомицина) или культуральную среду для кератиноцитов Keratinocyte-SFM (Gibco 10724-011), дополненную экстрактом BPE 50 мкг/мл (Solarbio E0050) и рекомбинантным эпидермальным фактором роста (epidermal growth factor, EGF) 5 нг/мл (Cal-

biochem 324831). Клетки пересевали раствором TrypLe E (Gibco 12563-011). Культивирование проводилось в течение 2–3 пассажей.

Культивирование клеток эпителия эндометрия человека в виде органоидов

Для культивирования клеток эпителия в виде органоидов фрагменты эпителия эндометрия (рис. 1в), полученные по протоколу, описанному выше, переносили в чашку Петри в растворе PBS и под микроскопом разделяли на группы по 20 фрагментов, после чего каждую из групп переносили в отдельную центрифужную пробирку и центрифугировали в растворе PBS при 400 g в течение 5 мин. Затем тщательно удаляли супернатант и осадок ресуспензировали в концентрированном Матригеле на льду, затем помещали в виде капель по 30 мкл в 48-луночные планшеты. Далее планшеты помещали в инкубатор (5% CO₂, +37 °C) на 15 мин для полимеризации Матригеля, затем добавляли 300 мкл культуральной среды (табл. 1). Культивирование проводили в течение 16 дней с заменой среды каждые 3 дня. Затем клетки пересевали следующим образом: из лунок отбирали культуральную среду и добавляли холодный раствор Cell Recovery Solution (Corning, 354253), в котором инкубировали при +4 °C в течение 1 ч для деполимеризации Матригеля. После этого содержимое лунок пипетировали 2–3 раза с помощью дозатора с наконечником на 1 мл и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин при температуре +40 °C. Супернатант отбирали, а к осадку добавляли 150 мкл среды DMEM/F12, в которой пипетировали органоиды с помощью дозатора с наконечником на 200 мкл для разделения на агрегаты клеток. Затем доводили объем до 1 мл и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин, осадок клеток смешивали с Матригелем 1:20 на льду, далее культивировали, как указано выше.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Кокультуры клеток эпителиальных и стромальных клеток эндометрия и клетки эпителия культивировали в монослое на предметных стеклах, затем промывали раствором PBS и фиксировали в 10%-ном формалине (Biovitrum, Россия) в течение 15 мин, после чего промывали раствором PBS 3 раза по 5 мин. Органоиды перед фиксацией вымывали из Матригеля с помощью охлажденного до +4 °C раствора Cell Recovery Solution, собирали в микро пробирку 1,5 мл, осаждали при 250 об/мин +4 °C, а затем фиксировали в течение 1 ч в 10%-ном формалине. Далее обработку

клеток и органоидов на стеклах проводили одинаковым образом по ранее описанной стандартной методике [38]. Для окрашивания использовали первичные кроличьи антитела против ki67 (Abcam ab15580), vimentin (Abclonal A19607) и мышинные антитела против pan-cytokeratin (C11, Abcam ab7753), E-cadherin (Abcam ab76055) в разведении 1:100, вторичные антитела козы к IgG кролика и мыши, конъюгированные с AlexaFluor™ 488 (Invitrogen A11008) или DiLaight 594 (Invitrogen A11005) в разведении 1:1000. Для визуализации ядер клеток последнюю промывку производили в присутствии 0,5 мкг/мл DAPI (Invitrogen D1306). После окрашивания стекла с клетками заключали в среду Fluoromount-G (SouthernBiotech 0100-01). Результаты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония).

Стимуляция эндоцитоза EGFR и выявление его локализации в стромальных и эпителиальных клетках эндометрия человека при сокультивировании

Смешанную культуру эпителиальных и стромальных клеток после выделения культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки, 1% смеси антибиотиков (пенициллина/стрептомицина) без добавления EGF. В культуральную среду добавляли флуоресцентно-меченный EGF в концентрации 10 нМ на 30 минут согласно ранее описанной методике [39]. Затем клетки фиксировали в 10%-ном формалине в течение 15 мин и проводили иммуноцитохимическое окрашивание по описанной выше методике. Для окрашивания использовали первичные кроличьи антитела против EGFR (Cell Signaling 4267) и мышинные антитела против pan-cytokeratin (Abcam ab7753) в разведении 1:100, вторичные антитела козы к IgG кролика и мыши, конъюгированными с AlexaFluor 568 (Invitrogen A-11011) и AlexaFluor 488 (Invitrogen A-11008) соответственно в разведении 1:200. Для визуализации ядер клеток последнюю промывку производили в присутствии 0,5 мкг/мл DAPI. После окрашивания стекла с клетками заключали в среду Fluoromount-G (SouthernBiotech, США). Результаты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония).

Определение экспрессии, ассоциированной со старением β-галактозидазы

Клеточное старение оценивали с помощью окрашивания на активность β-галактозидазы, ис-

пользуя Senescence beta-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, 9860S) согласно рекомендациям производителя. Оценка проводилась путем подсчета доли позитивных клеток на изображениях, полученных с помощью светового микроскопа. На серии изображений для каждого образца анализировалось не менее 50 клеток.

Результаты

Выделение фрагментов эндометрия человека из менструальной крови и их характеристика

Образцы эндометрия получали наименее инвазивным способом — проводили сбор из менструальной крови фрагментов ткани, десквамированных естественным путем. Согласно полученным нами ранее собственным данным [38], а также литературным данным [40] сбор менструальной крови для получения фрагментов эндометрия оптимально проводить на 1–2-й день от начала менструального цикла. В данной работе для определения наиболее подходящего времени для сбора наибольшего количества эндометрия доноры проводили забор менструальной крови в нескольких менструальных циклах в разные сроки от начала менструального кровотечения. Для получения фрагментов ткани собранные образцы менструальной крови освобождали от клеток крови путем фильтрации и промывок раствором PBS согласно методике, описанной в методическом разделе работы. В результате визуальной оценки объема получаемой в результате фильтрации ткани было определено, что в протестированной группе доноров наиболее подходящим сроком для получения клеток эпителия эндометрия является срок с 20-го по 24-й час от начала менструального кровотечения.

Для определения возможности использования фрагментов эндометрия из менструальной крови в качестве трехмерной модели эндометриальной ткани *in vitro* проводили культивирование участков эндометрия, полученных после фильтрации крови, в виде тканевой культуры. Идентификацию эпителиальных и стромальных клеток в тканевой культуре осуществляли с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами против маркера эпителиальных клеток цитокератина и маркера стромальных клеток виментина. На рисунке 1 представлены микрофотографии тканевой культуры эндометрия в 2D-условиях, окрашенной антителами против цитокератина и виментина. С помощью конфокального сканирования по оси, перпендикулярной поверхности

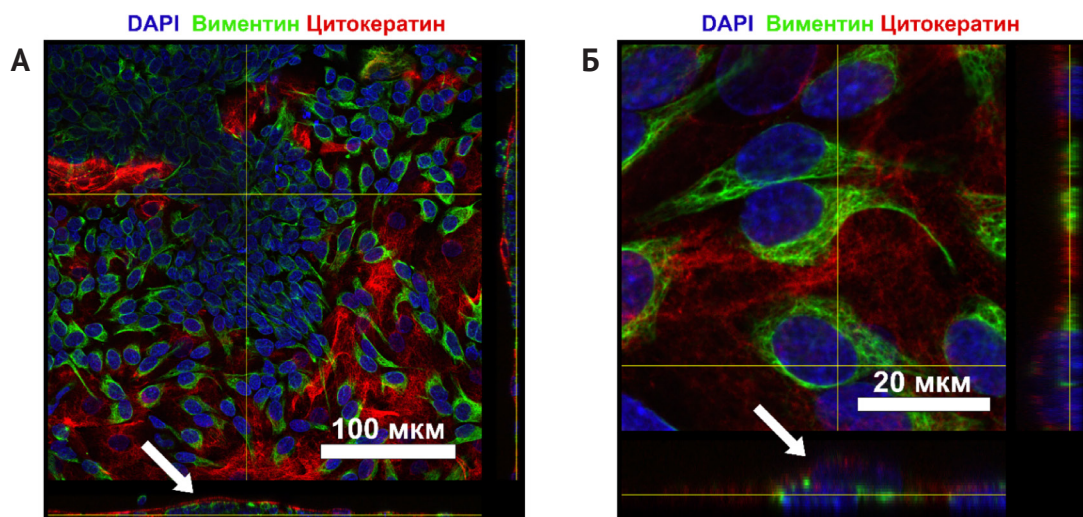


Рис. 1. Тканевая культура стромальных и эпителиальных клеток эндометрия человека на пластике. Эпителиальные клетки окрашены антителами к цитокератину (красный), стромальные клетки окрашены антителами к виментину (зеленый). Конфокальное сканирование по трем осям. Стрелками отмечено расположение эпителиальных клеток над стромальными. А — Об. 20х; Б — Об. 100х. Конфокальная микроскопия, микроскоп OLYMPUS FV3000

Fig. 1. Tissue culture of human endometrial stromal and epithelial cells on plastic. Epithelial cells are stained with anti-cytokeratin antibodies (red), stromal cells are stained with anti-vimentin antibodies (green). Three-axis confocal scanning. Arrows indicate the location of epithelial cells above stromal cells. A — Ob. 20x; Б — Ob. 100x. Confocal microscopy, OLYMPUS FV3000 microscope

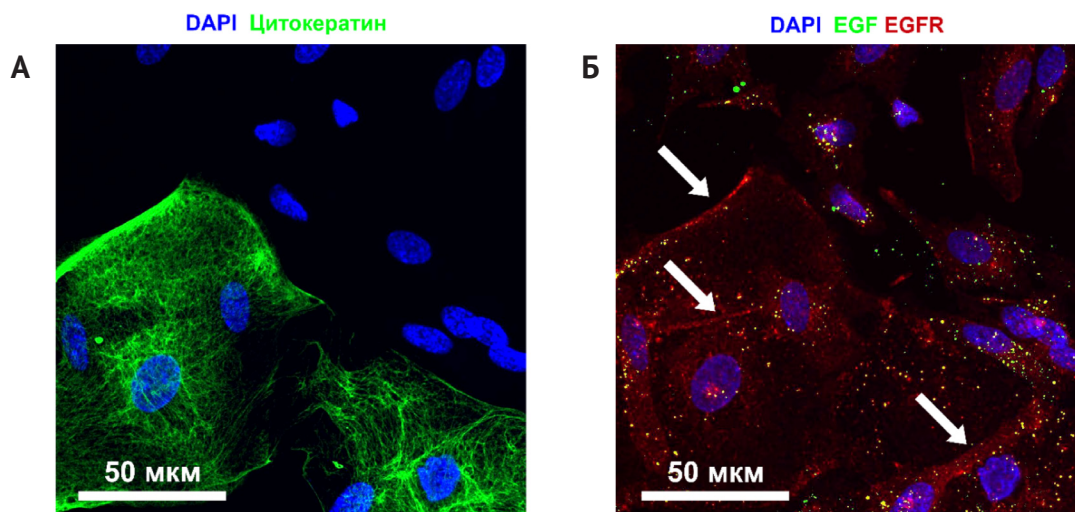


Рис. 2. Выявление рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в кокультуре стромальных и эпителиальных клеток эндометрия человека. Клетки одновременно окрашивали антителами на пан-цитокератин и EGFR, флуоресцентно-меченным Cy3 EGF и маркером ядер DAPI, и регистрировали флуоресценцию в отдельных каналах. Далее каналы объединяли попарно и искусственно окрашивали структуры для большей наглядности: А — окраска на пан-цитокератин (зеленый) и ядра (синий); Б — EGFR (красный) и флуоресцентно-меченный EGF (зеленый) в тех же клетках. Белые стрелки указывают на EGFR, локализованный на плазматической мембране эпителиальных клеток. Конфокальная микроскопия, микроскоп OLYMPUS FV3000

Fig. 2. Detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) in human endometrial stromal and epithelial cell co-culture. Cells were simultaneously stained with pan-cytokeratin antibodies and EGFR, fluorescently labeled EGF Cy3 and a marker of DAPI nuclei, and fluorescence was recorded in separate channels. Further, the channels were combined in pairs and artificially stained the structures for greater clarity: A — staining for pan-cytokeratin (green) and nuclei (blue); Б — EGFR (red) and fluorescently labeled EGF (green) in the same cells. White arrows indicate EGFR localized to the plasma membrane of epithelial cells. Confocal microscopy, OLYMPUS FV3000 microscope

субстрата, удалось показать, что при культивировании в тканевой модели сохраняется преимущественно поверхностное расположение эпителиальных клеток эндометрия над стромальными (отмечено на рисунке белыми стрелками), что свидетельствует о сохранении тканевой архитектуры, характерной для эндометрия при культивировании. В результате наблюдений было обнаружено, что подобная тканевая культура может сохранять стабильное состояние в течение 5 дней. Далее стромальные клетки адаптируются к условиям культивирования и начинают активно пролиферировать и мигрировать.

Для определения пригодности такой тканевой культуры в качестве многоклеточной модели эндометрия была проведена оценка возможности использования данной культуры для изучения в эндометриальных клетках сигнальных процессов, опосредованных ростовыми факторами — в частности, эпителиальным фактором роста (EGF). Ранее мы показали, что выделенные из десквамированного эндометрия человека культуры стромальных клеток экспрессируют рецептор EGF (EGFR) на уровне, сравнимом

с таковым в линиях эпителиальных клеток опухолевого происхождения, таких как HeLa и A549, а добавление EGF стимулирует быструю интернализацию рецептора [39]. В соответствии с этими наблюдениями при окрашивании препаратов фиксированной кокультуры стромальных и эпителиальных клеток эндометрия антителами к EGFR через 30 мин после стимуляции с помощью EGF (10 нМ) мы обнаружили (рис. 2), что эндосомы, содержащие EGF-EGFR комплексы, выявляются в значительном количестве как в стромальных, цитокератин-негативных, так и в эпителиальных клетках. Кроме того, EGFR был обнаружен на плазматической мембране эпителиальных клеток. Таким образом, совместная культура стромальных и эпителиальных клеток эндометрия может быть хорошей моделью для изучения роли компонентов EGF-рецепторной системы в норме и при ряде патологий эндометрия.

Получение и культивирование эпителиальных клеток эндометрия человека

Для получения культур эпителиальных клеток эндометрия (см. схему на рис. 3а) фрагменты



Рис. 3. Получение культуры клеток эпителия эндометрия человека из менструальной крови: А — этапы обработки образцов менструальной крови донора для получения культуры клеток эпителия эндометрия человека; Б — участки эндометрия, полученные после первой фильтрации; В — агрегаты эпителиальных клеток эндометрия, полученные после второй фильтрации. Создано с помощью <https://BioRender.com>

Fig. 3. Obtaining a culture of human endometrial epithelial cells from menstrual blood: А — stages of processing the donor's menstrual blood samples to obtain a culture of human endometrial epithelial cells; Б — endometrial tissue obtained after the first filtration; В — aggregates of endometrial epithelial cells obtained after the second filtration (created in <https://BioRender.com>)

ткани, выделенные из менструальной крови после фильтрации (рис. 3б), обрабатывали смесью ферментов диспазы и коллагеназы типа 1. Диспазу использовали для отделения эпителиальных клеток от базальной мембраны, а коллагеназу типа 1 — для разрушения внеклеточного матрикса стромы и получения единичной суспензии стромальных клеток эндометрия. В результате ферментативной обработки участки ткани разрушались с образованием суспензии стромальных клеток эндометрия, а также пластов эпителиальных клеток, которые сохранялись в составе агрегатов, поскольку плотные контакты между эпителиальными клетками не нарушались ферментами. Затем полученную смесь фильтровали через сетчатый фильтр с размером ячеек 40 мкм. При этом агрегаты эпителиальных клеток задерживались в фильтре (рис. 3в), а единичные стромальные клетки в клеточной суспензии проходили через ячейки. Агрегаты клеток с сетчатого фильтра культивировали либо в 2D-условиях, либо в каплях матригеля в 3D-конфигурации.

При культивировании агрегатов эпителиальных клеток в системе 2D (рис. 4а) эпителиальный статус полученных клеток был подтвержден иммуноцитохимическим окрашиванием на характерные эпителиальные маркеры цитокератин и Е-кадгерин. На рисунке 3 представлены микрофотографии 2D-культуры эпителиальных клеток с соответствующим окрашиванием клеточных структур. На ранних этапах культивирования (пассаж 1) культура сохраняла способность к пролиферации, что подтверждается позитивным окрашиванием на маркер пролиферации Ki67 (рис. 4г). Дальнейшее культивирование эпителиальных клеток в 2D-системе как в среде для роста МСК, так и в среде для эпителиальных клеток (кератиноцитов) в течение 14 дней приводило к остановке пролиферации и значительному изменению морфологии клеток (рис. 4д, е).

Тест на экспрессию ассоциированной со старением β -галактозидазы выявил окрашивание 100% клеток, в то время как после 4 дней культивирования позитивны были только 2% (рис. 4ж, з). Таким образом, полученные результаты свидетельствовали об индукции преждевременного старения эпителиальных клеток эндометрия уже через 14 дней культивирования в системе 2D. Для предотвращения этого

эффекта, был опробован прием культивирования агрегатов эпителиальных клеток в каплях концентрированного Матригеля в геометрии 3D с применением среды для культивирования органоидов. Данные условия позволили получить эпителиальные органоиды, представляющие из себя сферы из одного слоя эпителиальных клеток. В одной капле Матригеля образовывались множественные органоиды (рис. 5а). В течение 16 дней после помещения в капли органоиды увеличивались в размерах и достигали в диаметре 500 мкм (рис. 5б).

Эпителиальный фенотип полученных органоидов подтверждался иммуноцитохимическим окрашиванием на маркер эпителия Е-кадгерин (рис. 5д), а пролиферация клеток — обнаружением метафазных пластинок (рис. 5е). При конфокальном 3D-сканировании обнаружено, что органоид представляет собой однослойную полую сферу (рис. 5е). В процессе подготовки препарата для микроскопа с ограниченным фокусным расстоянием данные сферы не способны поддерживать форму и уплощаются под покровным стеклом, образуя двухслойный диск. Полученные органоиды могут культивироваться до 10 пассажей с пересевом каждые 14–16 дней и могут быть переведены в 2D-культуру при необходимости. При этом клетки приобретают морфологию, характерную для эпителиальных клеток, культивируемых в 2D (рис. 5б).

Обсуждение

При разработке персонифицированных методов лечения и создании моделей ткани *in vitro* на основе клеток пациента важными аспектами являются доступность и наименьшая инвазивность получения биологического материала [10–13]. Известно, что клетки эндометрия могут быть получены из биопсийного материала [41]. Несмотря на то что в этом случае материал может быть отобран на разных сроках менструального цикла, эта процедура является хирургической и может иметь осложнения в виде кровотечения, болезненных ощущений, воспаления [42]. Однако недавно было показано, что клетки эндометрия для персонализированных моделей могут быть получены и неинвазивным путем из участков эндометрия, которые десквамируются естественным путем и выделяются вместе с менструальной кровью в начале каждого менструального цикла [38, 43–45].

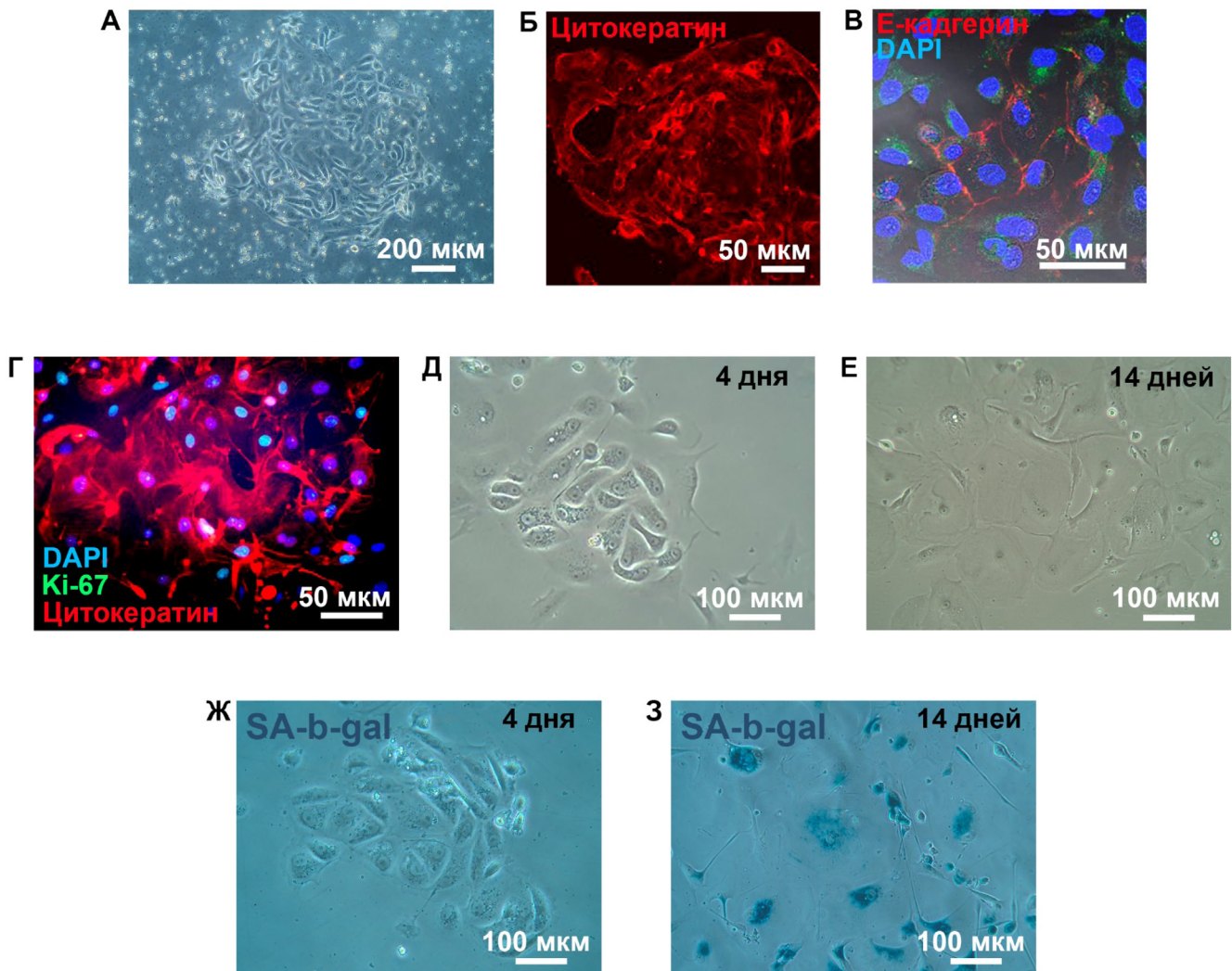


Рис. 4. Культивирование клеток эпителия эндометрия человека в 2D-культуре: А — клетки эпителия эндометрия человека в 2D-культуре; Б — иммуноцитохимическое окрашивание клеток эпителия эндометрия человека на пан-цитокератин; Б' — иммуноцитохимическое окрашивание клеток эпителия эндометрия человека на Е-кадгерин (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий); Г — иммуноцитохимическое окрашивание клеток эпителия эндометрия человека на пан-цитокератин (красный), Ki-67 (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий); Д — морфология клеток эпителия эндометрия человека в 2D-культуре через 4 дня культивирования; Е — морфология клеток эпителия эндометрия человека в 2D-культуре через 14 дней культивирования; Ж — отсутствие активности бета-галактозидазы, ассоциированной со старением, в клетках эпителия эндометрия человека в 2D-культуре через 4 дня культивирования; З — появление синего окрашивания, свидетельствующего о повышении активности ассоциированной со старением бета-галактозидазы в клетках эпителия эндометрия человека в 2D-культуре через 14 дней культивирования. Световая микроскопия, конфокальная микроскопия, микроскоп OLYMPUS FV3000

Fig. 4. Cultivation of human endometrial epithelial cells in 2D culture: А — human endometrial epithelial cells in 2D culture; Б — immunocytochemical staining of human endometrial epithelial cells for pan-cytokeratin; Б' — immunocytochemical staining of human endometrial epithelial cells for e-cadherin (green), nuclei stained with DAPI (blue); Г — immunocytochemical staining of human endometrial epithelial cells for pan-cytokeratin (red), Ki-67 (green), nuclei stained with DAPI (blue); Д — morphology of human endometrial epithelial cells in 2D culture after 4 days of cultivation; Е — morphology of human endometrial epithelial cells in 2D culture after 14 days of cultivation; Ж — absence of beta-galactosidase activity associated with aging in human endometrial epithelial cells in 2D culture after 4 days of cultivation; З — the appearance of blue staining, indicating an increase in the activity of aging-associated beta-galactosidase in human endometrial epithelial cells in 2D culture after 14 days of cultivation. Light microscopy, confocal microscopy, OLYMPUS FV3000 microscope

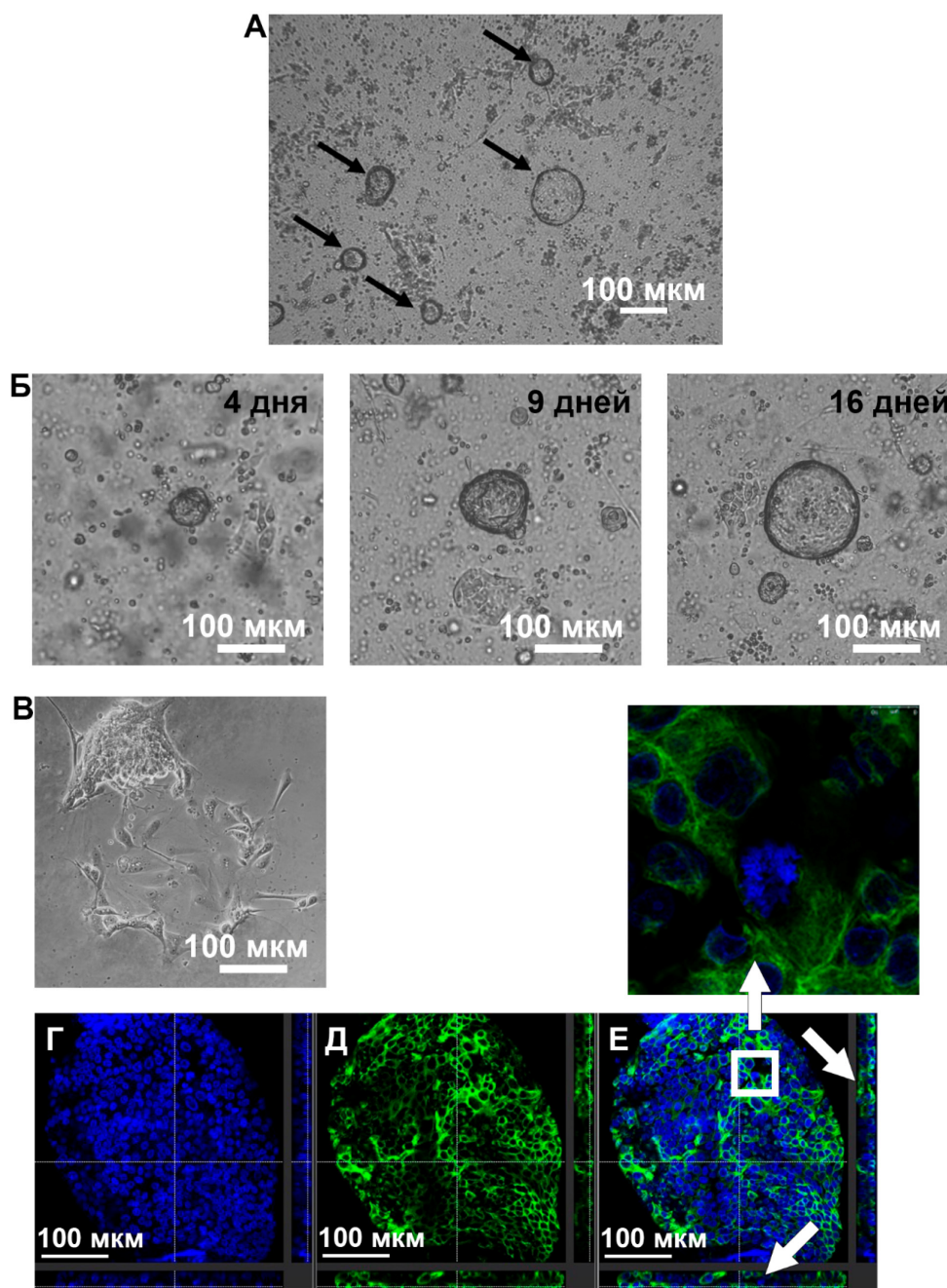


Рис. 5. Культивирование эпителиальных клеток эндометрия человека в виде органоидов в условиях 3D: А — образование множественных органоидов в капле Матригеля; Б — увеличение размера органоида по мере культивирования; В — органоиды из эпителия эндометрия человека через 4 дня после перевода из 3D-системы в 2D; Г–Е: иммуноцитохимическое окрашивание эпителиального органоида эндометрия человека: Г — ядра окрашены DAPI (синий), Д — характерное окрашивание маркера эпителиальных клеток Е-кадгерина (зеленый), Е — совмещение. Выделенный фрагмент показывает метафазу. На Г–Е представлены оптические срезы в трех плоскостях, выполненные на конфокальном микроскопе. Белые стрелки указывают на однослойную стенку органоида. Световая микроскопия, конфокальная микроскопия, микроскоп OLYMPUS FV3000

Fig. 5. Cultivation of human endometrial epithelial cells as organoids under 3D conditions: А — formation of multiple organoids in the Matrigel drop; Б — organoid size increase during cultivation; В — organoids from the human endometrial epithelium 4 days after transfer from the 3D system to 2D; Г–Е: immunocytochemical staining of human endometrial epithelial organoid: Г — nuclei stained with DAPI (blue), Д — characteristic staining of E-cadherin epithelial cell marker (green), Е — alignment. The selection shows metaphase. Г–Е shows characteristic sections in three planes made on a confocal microscope. White arrows indicate single layer organoid wall. Confocal microscopy, OLYMPUS FV3000 microscope

Менструации, помимо людей, присутствуют у узконосых обезьян (включая человекообразных обезьян), некоторых видов летучих мышей, слоновой землеройки и каирской иглистой мыши [35, 36]. У мышей вида *Mus musculus* и других распространенных лабораторных животных менструации не происходит, у них существует эстральный цикл, который состоит из четырех фаз: проэструс, эструс, метэструс и диэструс [35, 36]. Это обстоятельство делает такие животные модели нерелевантными и подчеркивает необходимость создания моделей эндометрия человека на основе человеческих клеток для фундаментальных исследований свойств этой ткани. Для чего именно нужна менструация *Homo sapiens*, остается предметом дискуссии. Предполагается, что это связано с децидуализацией эндометрия под воздействием прогестерона в секреторной фазе менструального цикла [46, 47]. Высказываются мнения, что менструация нужна для контроля за качеством имплантирующихся эмбрионов [48, 49]. Несмотря на важность процесса децидуализации эндометрия для имплантации эмбриона, имеется значительное количество клинических случаев, где имплантация эмбриона произошла вне эндометрия в другой ткани брюшной полости, что, однако, привело к развитию доношенной абдоминальной беременности и извлечению здорового плода в результате хирургической операции [50–53].

Ранее нами было показано, что менструальная кровь представляет собой неинвазивный источник получения жизнеспособных участков эндометрия, из которых могут быть выделены мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) эндометрия человека, обладающие характерными свойствами МСК и способные дифференцироваться в децидуальные клетки под действием гормональных стимулов [38, 54]. В настоящей работе нами было показано, что получаемые участки эндометрия могут в течение ограниченного срока (5–7 дней) поддерживаться в виде тканевой культуры, состоящей из клеток стромы и клеток эпителия, с сохранением характерного для эндометрия взаимного расположения эпителиальных клеток поверх стромальных. Поскольку данные тканевые фрагменты не подвергаются никаким ферментативным обработкам и клетки сохраняют свои нативные связи, получаемая тканевая культура может служить наиболее естественной персонифицированной моделью эндометрия человека в культуре для краткосрочных экспериментов.

В настоящей работе мы определили принципиальную возможность использования тканевой модели для изучения компонентов EGF-рецепторной системы. Данные тканевые культуры могут быть многократно получены от донора неинвазивным путем как в разные сроки менструации одного менструального цикла, так и в разные менструальные циклы, что имеет большое значение для получения биологического материала при подборе персонифицированных методов лечения.

Кроме стромальных клеток из участков эндометрия, содержащихся в менструальной крови, может быть также выделена популяция эпителиальных клеток эндометрия [55–57]. В основном в работах, посвященных культивированию эпителия эндометрия, источником биологического материала служил эндометрий, получаемый в результате полного удаления матки (гистерэктомии) либо в результате биопсии [55–58]. В нашем исследовании культивирование в 2D-условиях клеток, выделенных из менструальной крови, показало, что на начальных пассажах в культуре присутствуют два типа клеток: стромальные и эпителиальные (ЭпК), но при стандартном адгезивном культивировании в 2D на пластике стромальные клетки получают преимущества в размножении и после пересева преобладают в популяции эндометриальных клеток, а ЭпК быстро теряют способность к размножению и стареют через 14 дней, приобретая сенесцентный фенотип. Обработка Матригелем или коллагеном I типа культурального пластика не способствовала длительному размножению ЭпК на среде для кератиноцитов в условиях 2D. Поэтому для культивирования ЭпК мы протестировали технологию органоидной культуры [58–60].

Протокол создания органоидной культуры предполагает культивирование эпителиальных клеток на каркасе из внеклеточного матрикса (ВКМ) с использованием питательной среды, содержащей набор митогенов, морфогенов и цитокинов, которые управляют самообновлением и организованной дифференцировкой соматических стволовых клеток [61]. Стандартным субстратом для культивирования эпителиальных органоидов является Матригель — матрикс базальной мембраны, очищенный от клеток саркомы мышей Энглбрета — Холма — Роя [62]. Основными компонентами Матригеля являются коллаген IV типа, ламинин, перлекан (протеогликан сульфата гепарана) и нидоген/энтактин [63, 64].

Важным для культивирования органоидов эпителия является и состав питательной среды. Интересно, что культуральные среды для эпителиальных клеток из разных тканей имеют схожий состав в части добавляемых в среду растворимых факторов. В качестве факторов, поддерживающих самоорганизацию и самообновление эпителиальных органоидов, используют: R-спондин 1 (активатор канонического пути Wnt), факторы роста (эпидермальный EGF и фибробластный bFGF, активирующие пути митоген-активируемой протеинкиназы MAPK), ингибиторы костного морфогенетического белка BMP (Noggin) и трансформирующего фактора роста TGF- β (A83-01), а также никотинамид (амидная форма витамина B3) [65].

В настоящей работе мы использовали Матригель, а также вышеперечисленные факторы и модуляторы в составе питательной среды для получения и поддержания 3D-культур эпителиальных клеток эндометрия человека. Для усиления передачи сигналов Wnt нами был использован ингибитор киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) в виде малой молекулы CHIR99021, добавляемой в культуральную среду. Следует отметить, что только добавление CHIR99021 само по себе не обеспечивало возможность длительного культивирования как в наших экспериментах, так и в других аналогичных исследованиях [66],

а добавление R-spondin 1 было необходимым условием. Согласно литературным данным, эндогенная экспрессия R-spondin 1 не была обнаружена в культурах человеческих эндометриальных органоидов [58], что подтверждает необходимость добавления в среду R-spondin 1 при культивировании ЭпК. Весь набор использованных в настоящем исследовании факторов перечислен в таблице 1.

Таким образом, в данной работе была показана принципиальная возможность получения и культивирования тканевых культур эндометрия человека, а также клеток эпителия эндометрия человека как в виде монослоя, так и в виде 3D-органоеидов, выделенных из неинвазивного источника — менструальной крови. Методом иммуоцитохимического окрашивания было подтверждено наличие характерных маркеров эпителиальных клеток, таких как цитокератин и Е-кадгерин. Был отработан протокол культивирования в виде 3D-органоеидов, который позволяет наращивать эпителиальные клетки эндометрия человека *in vitro*, пролиферативная активность была подтверждена наличием метафаз и окрашиванием на Ki67. Подтверждена возможность использования тканевых культур эндометрия человека в краткосрочных экспериментах, например при изучении компонентов EGF-рецепторной системы.

Таблица 1. Состав среды для культивирования органоидов из эпителия эндометрия человека

Table 1. Composition of Human Endometrial Epithelial Organoid Culture Medium

Компонент	Количество	Производитель / кат. номер
DMEM/F12	95%	Gibco / 42400010
N2	1%	Gibco / 17502-048
B27	1%	Gibco / 17504-044
ITS	1%	Sigma / 13146
Penicillin/Streptomycin	1%	Gibco / 15070063
GluMax	1%	Gibco / A12860-01
EGF	50 ng/ml	Calbiochem / 324831
FGF2	100 ng/ml	Millipore / GF003-AF
HGF	10 ng/ml	Sci-store, Россия
Nicotinamide	1 mM	Sigma / N0636
N-Acetyl-L-cysteine	1,25 mM	Sigma / A9165
Noggin	100 ng/ml	Sci-store, Россия
R-spondin1	200 ng/ml	Solarbio / P00147
A83-01	0,5 μ M	Abcam / ab142092
CHIR	3 μ M	Abcam / ab120890

В целом мы показали, что 3D-культивирование является необходимым условием для самоорганизации и размножения ЭпК-эндометрия. В будущем мы планируем подтвердить возможность спецификации клеток в люминальный (про-светный) и гранулярный (железистый) эпителий,

а также способность реагировать на гормональные стимулы. Полученные в настоящей работе результаты имеют большое значение для разработки персонифицированных подходов к лечению гинекологических заболеваний и поиска новых маркеров рецептивности эндометрия.

Литература

1. Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril*. 2018 Jun;109(6):952–963. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.006
2. Villalón-García I, Álvarez-Córdoba M, Suárez-Rivero JM, Povea-Cabello S, Talaverón-Rey M, Suárez-Carrillo A, et al. Precision Medicine in Rare Diseases. *Diseases*. 2020;8(4):42. DOI: 10.3390/diseases8040042
3. Wang H, Bocca S, Anderson S, Yu L, Rhavi BS, Horcajadas J, Oehninger S. Sex steroids regulate epithelial-stromal cell cross talk and trophoblast attachment invasion in a three-dimensional human endometrial culture system. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(9):676. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0616
4. Montin D, Santilli V, Beni A, Costagliola G, Martire B, Mastrototaro MF, et al. Towards personalized vaccines. *Front Immunol*. 2024;3:1436108. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1436108
5. Owen MC, Kopecky BJ. Targeting macrophages in organ transplantation: a step toward personalized medicine. *Transplantation*. 2024;108(12):2045. DOI: 10.1097/TP.0000000000004978
6. Zhang PY, Yu Y. Precise personalized medicine in gynecology cancer and infertility. *Front Cell Dev Biol*. 2020;7:382. DOI: 10.3389/fcell.2019.00382
7. Beim PY, Elashoff M, Hu-Seliger TT. Personalized reproductive medicine on the brink: progress, opportunities and challenges ahead. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(6):611–623. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.09.010
8. Collins SC. Precision reproductive medicine: multigene panel testing for infertility risk assessment. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(8):967–973. DOI: 10.1007/s10815-017-0938-y
9. Krawetz SA. Personalized precision reproductive medicine and diagnostics. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63(1):1. DOI: 10.1080/19396368.2017.1278984
10. Francés-Herrero E, Lopez R, Hellström M, de Miguel-Gómez L, Herraiz S, Brännström M, et al. Bioengineering trends in female reproduction: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2022;28(6):798–837. DOI: 10.1093/humupd/dmac025
11. Rodríguez-Eguren A, Bueno-Fernandez C, Gómez-Álvarez M, Francés-Herrero E, Peller A, Bellver J, et al. Evolution of biotechnological advances and regenerative therapies for endometrial disorders: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2024;30(5):584–613. DOI: 10.1093/humupd/dmae013
12. Zubizarreta ME, Xiao S. Bioengineering models of female reproduction. *Biodes Manuf*. 2020;3(3):237–251. DOI: 10.1007/s42242-020-00082-8
13. Sittadjody S, Criswell T, Jackson JD, Atala A, Yoo JJ. Regenerative medicine approaches in bioengineering female reproductive tissues. *Reprod Sci*. 2021;28(6):1573–1595. DOI: 10.1007/s43032-021-00548-9
14. Christian M, Mak I, White JO, Brosens JJ. Mechanisms of decidualization. *Reprod Biomed Online*. 2002;4(suppl 3):24–30. DOI: 10.1016/s1472-6483(12)60112-6
15. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med*. 2007;25(6):445–453. DOI: 10.1055/s-2007-991042
16. Muter J, Lynch VJ, McCoy RC, Brosens JJ. Human embryo implantation. *Development*. 2023;150(10):dev201507. DOI: 10.1242/dev.201507
17. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014;35(6):851–905. DOI: 10.1210/er.2014-1045

18. Lessey BA, Young SL. What exactly is endometrial receptivity? *Fertil Steril*. 2019;111(4):611–617. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.02.009
19. Aganezova NV, Aganezov SS, Gogichashvili KE. Characteristics of endometrial receptivity in women with different endometrial thickness. *Obstet Gynecol Reprod*. 2022;16(2):108–121. DOI: 10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2022.303
20. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod*. 1999;14(suppl 2):99–106. DOI: 10.1093/humrep/14.suppl_2.99
21. Nikas G, Makrigiannakis A. Endometrial pinopodes and uterine receptivity. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;997:120–123. DOI: 10.1196/annals.1290.042
22. Aunapuu M, Kibur P, Järveots T, Arend A. Changes in morphology and presence of pinopodes in endometrial cells during the luteal phase in women with infertility problems: a pilot study. *Medicina (Kaunas)*. 2018;54(5):69. DOI: 10.3390/medicina54050069
23. Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:201514. DOI: 10.1155/2014/201514
24. Aikawa S, Hiraoka T, Matsuo M, Fukui Y, Fujita H, Saito-Fujita T, et al. Spatiotemporal functions of leukemia inhibitory factor in embryo attachment and implantation chamber formation. *Cell Death Discov*. 2024;10:481. DOI: 10.1038/s41420-024-02228-4
25. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:56. DOI: 10.1186/1477-7827-3-56
26. Gauster M, Moser G, Wernitznig S, Kupper N, Huppertz B. Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(6):345. DOI: 10.1007/s00018-022-04377-0
27. Le Saint C, Crespo K, Bourdieu A, Bissonnette F, Buzaglo K, Couturier B, et al. Autologous endometrial cell co-culture improves human embryo development to high-quality blastocysts: a randomized controlled trial. *Reprod Biomed Online*. 2019;38(3):321–329. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.12.039
28. Айламазян ЭК, Дурнова АО, Полякова ВО, Судалина МН, Кветной ИМ. Ко-культивирование эмбриона человека с эндометрием: оптимизация экстракорпорального оплодотворения. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2012;61(4):16–22.
29. Koot YE, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(12):1943–1950. DOI: 10.1016/j.bbadv.2012.05.017
30. Кибанов МВ, Махмудова ГМ, Гохберг ЯА. Поиски идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов. *Альманах клинической медицины*. 2019;47(1):12–25. DOI: 10.18786/2072-0505-2019-47-005
31. Гохберг ЯА, Макарова НП, Бабаян АА, Калинина ЕА. Роль различных факторов воздействия на эндометрий в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2021;1:28–34. DOI: 10.18565/aig.2021.1.28-34
32. Гохберг ЯА, Тимофеева АВ, Калинина ЕА. Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2021;11:56–62. DOI: 10.18565/aig.2021.11.56-62
33. Корсак ВС, Смирнова АА, Шурыгина ОВ. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека. Отчет за 2017 год. *Проблемы репродукции*. 2019;25(6):9–21. DOI: 10.17116/repro2019250619
34. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Пальченко Н.А. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ. *Проблемы репродукции*. 2013;4:51–60.
35. Critchley HOD, Babayev E, Bulun SE, Clark S, Garcia-Grau I, Gregersen PK, et al. Menstruation: science and society. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(6):624–664. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.06.004
36. Critchley HOD, Maybin JA, Armstrong GM, Williams ARW. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation. *Physiol Rev*. 2020;100(3):1149–1179. DOI: 10.1152/physrev.00031.2019

37. Muter J, Kong CS, Brosens JJ. The role of decidual subpopulations in implantation, menstruation and miscarriage. *Front Reprod Health*. 2021;3:804921. DOI: 10.3389/frph.2021.804921
38. Земелько ВИ, Гринчук ТМ, Домнина АП, Арцыбашева ИВ, Зенин ВВ, Кирсанов АА и др. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. *Цитология*. 2011;53:919. DOI: 10.1134/S1990519X12010129
39. Kamentseva RS, Kharchenko MV, Gabdrahmanova GV, Kotov MA, Kosheverova VV, Kornilova ES. EGF, TGF- α and amphiregulin differently regulate endometrium-derived mesenchymal stromal/stem cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13408. DOI: 10.3390/ijms241713408
40. Tindala K, Filby CE, Cousins FL, Ellery SJ, Vollenhoven B, Palmer K, et al. The composition of menstrual fluid, its applications, and recent advances to understand the endometrial environment: a narrative review. *F&S Reviews*, 2024;5(3):100075. DOI: 10.1016/j.xfnr.2024.100075
41. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update*. 2016;22(2):137–163. DOI: 10.1093/humupd/dmv051
42. Ilavarasi CR, Jyothi GS, Alva NK. Study of the efficacy of Pipelle biopsy technique to diagnose endometrial diseases in abnormal uterine bleeding. *J Midlife Health*. 2019;10(2):75–80. DOI: 10.4103/jmh.JMH_109_18
43. Cindrova-Davies T, Zhao X, Elder K, Jones CJP, Moffett A, Burton GJ, Turco MY. Menstrual flow as a non-invasive source of endometrial organoids. *Commun Biol*. 2021;4:1. DOI: 10.1038/s42003-021-02194-y
44. Bozorgmehr M, Gurung S, Darzi S, Nikoo S, Kazemnejad S, Zarnani AH, Gargett CE. Endometrial and menstrual blood mesenchymal stem/stromal cells: biological properties and clinical application. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:497. DOI: 10.3389/fcell.2020.00497
45. Sanchez-Mata A, Gonzalez-Muñoz E. Understanding menstrual blood-derived stromal/stem cells: definition and properties. Are we rushing into their therapeutic applications? *iScience*. 2021;24(12):103501. DOI: 10.1016/j.isci.2021.103501
46. Quenby S, Brosens JJ. Human implantation: a tale of mutual maternal and fetal attraction. *Biol Reprod*. 2013;88(3):81. DOI: 10.1095/biolreprod.113.108886
47. Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(6):615.e1–6. DOI: 10.1016/j.ajog.2008.11.037
48. Macklon NS, Brosens JJ. The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Biol Reprod*. 2014;91(4):98. DOI: 10.1095/biolreprod.114.122846
49. Brosens JJ, Salter MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep*. 2014;4:3894. DOI: 10.1038/srep03894
50. Иванова НА, Гуменюк ЕГ. Брюшная беременность: что нового? Обзор литературы за 10 лет (2009–2019 гг.). *Проблемы репродукции*. 2021;27(4):142–149. DOI: 10.17116/repro202127041142
51. Буянова СН, Щукина НА, Чечнева МА. Брюшная беременность. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2014;14(5):71–74.
52. Корсак ВС. К вопросу о роли эндометрия в имплантации эмбрионов. *Проблемы репродукции*. 2016;22(2):33–36. DOI: 10.17116/repro201622233-36
53. Никитин АИ. Комментарий к статье В.С. Корсака «К вопросу о роли эндометрия в имплантации эмбрионов». *Проблемы репродукции*. 2016;22(3):127–128. DOI: 10.17116/repro2016223127-128
54. Домнина АП, Новикова ПВ, Фридлянская ИИ, Шилина МА, Зенин ВВ, Никольский НН. Индукция децидуальной дифференцировки в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках. *Цитология*. 2014;57(12):880–884.
55. Chen JC, Roan NR. Isolation and culture of human endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts. *Bio Protoc*. 2015;5:e1623. DOI: 10.21769/bioprotoc.1623
56. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. 2009;80(6):1136–1145. DOI: 10.1095/biolreprod.108.075226

57. Hewitt SC, Dickson MJ, Edwards N, Hampton K, Garantzotis S, DeMayo FJ. From cup to dish: how to make and use endometrial organoid and stromal cultures derived from menstrual fluid. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14(14):1220622. DOI: 10.3389/fendo.2023.1220622
58. Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development*. 2017;144(10):1775–1786. DOI: 10.1242/dev.148478
59. Murphy AR, Wiwatpanit T, Lu Z, Davaadelger B, Kim JJ. Generation of multicellular human primary endometrial organoids. *J Vis Exp*. 2019;(152):e60384. DOI: 10.3791/60384
60. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol*. 2017;19(5):568–577. DOI: 10.1038/ncb3516
61. Fitzgerald HC, Dhakal P, Behura SK, Schust DJ, Spencer TE. Self-renewing endometrial epithelial organoids of the human uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(46):23132–23142. DOI: 10.1073/pnas.1915389116
62. Kibbey MC. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *J Tissue Cult Methods*. 1994;16(3–4):227–230. DOI: 10.1007/BF01540656
63. Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, Giger S, Bragina ME, Ordóñez-Morán P, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*. 2016;539(7630):560–564. DOI: 10.1038/nature20168
64. Hernandez-Gordillo V, Robinton D, Griffith LG. Fully synthetic matrices for in vitro culture of primary human intestinal enteroids and endometrial organoids. *Biomaterials*. 2020;254:120125. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120125
65. Sugimoto S, Sato T. Establishment of 3D intestinal organoid cultures from intestinal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2017;1612:97–105. DOI: 10.1007/978-1-4939-7021-6_7
66. Hibaoui Y, Feki A. Organoid models of human endometrial development and disease. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:84. DOI: 10.3389/fcell.2020.00084

Об авторах

Кожухарова Ирина Викторовна — к.б.н., старший научный сотрудник Лаборатории внутриклеточной сигнализации Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук.

Кунеев Иван Константинович — аспирант, младший научный сотрудник Лаборатории внутриклеточной сигнализации Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук.

Шорохова Мария Александровна — к.б.н., научный сотрудник Лаборатории внутриклеточной сигнализации Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук.

Харченко Марианна Викторовна — к.б.н., старший научный сотрудник Лаборатории динамики внутриклеточных мембран Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук.

Корнилова Елена Сергеевна — д.б.н., заведующий Лаборатории динамики внутриклеточных мембран Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук.

Домнина Алиса Павловна — к.б.н., старший научный сотрудник Лаборатории внутриклеточной сигнализации Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук.

Authors

Irina V. Kozhukharova — Dr. Sci. (Biology), senior scientist of Laboratory of Intracellular Signaling, Department of Intracellular Signaling and Transport, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.

Ivan K. Kuneev — PhD student, junior scientist of Laboratory of Intracellular Signaling, Department of Intracellular Signaling and Transport, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.

Maria A. Shorokhova — Dr. Sci. (Biology), scientist of Laboratory of Intracellular Signaling, Department of Intracellular Signaling and Transport, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.

Marianna V. Kharchenko — Dr. Sci. (Biology), senior scientist of Laboratory of Intracellular Membranes Dynamics, Department of Intracellular Signaling and Transport, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.

Elena S. Kornilova — Dr. Sci. (Biology), head of Laboratory of Intracellular Membranes Dynamics, Department of Intracellular Signaling and Transport, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.

Alisa P. Domnina — Dr. Sci. (Biology), senior scientist of Laboratory of Intracellular Signaling, Department of Intracellular Signaling and Transport, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.

Вклад авторов

И. В. Кожухарова — выполняла эксперименты, обрабатывала данные, писала текст статьи.

И. К. Кунеев — выполнял эксперименты, обрабатывал данные.

М. А. Шорохова — выполняла эксперименты, обрабатывала данные.

М. В. Харченко — выполняла эксперименты, обрабатывала данные.

Е. С. Корнилова — участвовала в формулировании идеи, писала текст статьи.

А. П. Домнина — выполняла эксперименты, обрабатывала данные, участвовала в формулировании идеи, писала текст статьи, выполняла общее руководство работой.

Author contribution statement

Irina V. Kozhukharova — performing the experiments, experimental data processing, manuscript writing.

Ivan K. Kuneev — performing the experiments, experimental data processing.

Maria A. Shorokhova — performing the experiments, experimental data processing.

Marianna V. Kharchenko — performing the experiments, experimental data processing.

Elena S. Kornilova — conceptualization, manuscript writing.

Alisa P. Domnina — performing the experiments, experimental data processing, conceptualization, manuscript writing, supervision.