

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕЦИДУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ МЫШИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ИМПЛАНТАЦИЕЙ ЭМБРИОНА *IN VITRO*<sup>1</sup>

© 2023 г. А. О. Гайдамака<sup>а, \*</sup>, А. В. Муромцев<sup>а</sup>, Л. Ш. Измайлова<sup>а</sup>,  
Г. А. Марченко<sup>б</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

<sup>б</sup>Luminex corporation, Het Zuiderkruis, 1 's-Hertogenbosch, The Netherlands, 5215 MV

\*e-mail: stadtrand@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 19.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Децидуализация клеток стромы – ключевой этап приобретения рецептивности эндометрия к эмбриону. Этот процесс регулируется половыми стероидными гормонами, а у мыши дополнительно индуцируется прикреплением эмбриона. В настоящее время существует множество протоколов индукции децидуализации стромы *in vitro*, однако большинство из них требует проверки соответствия процессов, происходящих в культуре клеток, таковым в живом организме. Эта работа посвящена изучению морфологии клеток стромы и экспрессионной активности генов, ответственных за прогрессирование децидуализации в 2D культуре с последующим прикреплением эмбриона. Также исследована целесообразность использования нескольких вариантов протоколов индукции децидуализации и возможность применения клеток стромы после криоконсервации.

**Ключевые слова:** эндометрий, строма, децидуализация, имплантация *in vitro*, половые стероидные гормоны

**DOI:** 10.31857/S0475145023010044, **EDN:** FQPSTI

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших начальных этапов беременности является имплантация – процесс прикрепления эмбриона к эндометрию матки. Успешность имплантации зависит от установления множества эндокринных, паракринных сигналов и контактных взаимодействий между клетками эмбриона, и эндометрия матки. Участие целого ряда факторов в этом процессе обеспечивает строгий пространственно-временной контроль прохождения имплантации как со стороны эндометрия, так и со стороны эмбриона.

Нарушения в ходе имплантации являются наиболее частыми причинами прерывания беременности на ранних сроках: несмотря на развитие вспомогательных репродуктивных технологий, эффективность прохождения беременности до этапа имплантации даже с использованием эмбрионов высокого качества остается низкой (Larsen et al., 2013). В связи с этим изучение имплантации остается актуальной задачей. Однако существует несколько

ограничений, препятствующих получению более глубокого понимания процесса имплантации. Например, этические ограничения не позволяют исследовать имплантацию человека *in vivo*, а материал биопсий не всегда доступен для моделирования имплантации *in vitro* и зачастую не однороден по возрасту доноров и фазе цикла. Поэтому для изучения имплантации *in vitro* часто используют модели на основе клеток эндометрия мыши, поскольку для мыши и человека обнаружено множество общих молекулярных механизмов, задействованных в имплантации.

Подготовка эндометрия к имплантации происходит за счет последовательного действия двух гормонов: эстрадиола (E2) и прогестерона (P4). E2 обеспечивает пролиферацию клеток стромы и эпителия эндометрия, а действие P4 направлено на их последующую дифференцировку. Это необходимо для приобретения эндометрием рецептивности, то есть способности воспринять эмбрион во время имплантации (Zhang et al., 2013).

Процесс, включающий терминальную дифференцировку клеток стромы эндометрия, ассоциированную с рецептивностью, называется децидуализацией. Дифференцировка заключается в приобре-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0475145023010044 для авторизованных пользователей.

тении клетками эпителиоподобной морфологии, полиплоидизации и изменении метаболизма. Децидуализация стромы человека происходит в каждом менструальном цикле во время секреторной фазы и зависит от половых стероидных гормонов. В то же время, у мыши децидуализация начинается в ответ на сигналы имплантирующейся бластоцисты, такие, как интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), однако дифференцировка клеток стромы также находится под контролем E2 и P4 (Ojosnegros et al., 2021).

Для прогрессирования децидуализации требуется гормон-опосредованная активация белков — компонентов сигнальных путей и факторов транскрипции, отвечающих за приобретение клетками стромы соответствующего фенотипа. Наиболее известными стромальными регуляторами децидуализации и поддержания рецептивности эндометрия являются NOXA10/11, BMP2, HAND2, FOXO1A, C/EBP $\beta$  и WNT4 (Ramathal et al., 2010). Данные факторы отвечают не только за дифференцировку стромы, но и за комплексное взаимодействие между всеми компартментами эндометрия, включая люминальный и железистый эпителий, кровеносные сосуды и иммунные клетки.

Несвоевременная или аномальная децидуализация клеток стромы может являться причиной излишней селективности эндометрия, что приводит к отсутствию имплантации или повышенной рецептивности, что связано с имплантацией потенциально нежизнеспособных эмбрионов (Macklon, Brosens, 2014). В связи со сложностями изучения децидуализации *in vivo*, необходимо разработать релевантную модель децидуализации стромы с последующей имплантацией эмбриона *in vitro* для исследования патологических состояний эндометрия. На настоящий момент исследователями применяется несколько вариантов протоколов индукции децидуализации *in vitro*, однако не существует общепризнанного стандарта, который с высокой точностью отражал бы дифференцировку стромы во время беременности (De Clercq et al., 2017; Hisamatsu et al., 2021; Yu et al., 2022).

Целью этой работы стало изучение двух моделей децидуализации стромы эндометрия мыши в 2D культуре, основанных на действии медроксипрогестерона (МРА) совместно с E2 и на действии P4 и E2. Также было уделено отдельное внимание сравнению полученных моделей при имплантации эмбриона *in vitro*. В дополнение к этому были получены данные о целесообразности использования клеток стромы после криоконсервации для дальнейшей индукции децидуализации *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Животные*

Работа была проведена на мышах линии Balb/C возрастом от 12 до 15 недель. Мышей содержали в стандартных условиях вивария ИБР РАН в клетках по 4–6 особей с неограниченным доступом к воде и корму. Все манипуляции с животными были одобрены этической комиссией ИБР РАН (Протокол № 40 от 17.09.2021).

Перед выделением клеток стромы эндометрия по стандартному протоколу самкам внутрибрюшинно вводили E2 (Sigma-Aldrich, США) для синхронизации животных в фазе эструса (De Clercq et al., 2017).

### *Получение культуры клеток стромы эндометрия*

Клетки стромы выделяли по протоколу, описанному ранее (Izmaylova et al., 2021). Самок выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Далее изолировали матки, разрезали рога маток продольно и промывали раствором Хенкса (ПанЭко, Россия), содержащем 4% гентамицина. Перед получением клеток стромы ферментативным способом удаляли эпителий: матки помещали в 0.1% раствор диспазы (Gibco, Ирландия) в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия) на 12 ч при 4°C. На следующий день матки в растворе диспазы инкубировали в течение 20 минут при 37°C с последующим интенсивным встряхиванием на вортексе. После этого удаляли среду с отделившимися эпителиальными пластами. Далее измельчали оставшуюся ткань до фрагментов 1–2 мм и помещали в 0.2% раствор коллагеназы II (Gibco, Ирландия) в среде ДМЕМ на 5 ч при 37°C. По истечении времени супернатант с клетками стромы отбирали, центрифугировали, а осадок клеток отмывали от фермента. Клетки переносили в культуральный флакон и культивировали в мультигазовом инкубаторе (5% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>) в полной среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% Glutamax (Gibco, Ирландия), 1% PenStrep (Gibco, Ирландия). Перед первым пассажем клетки культивировали минимум 3 дня.

### *Индукция суперовуляции у самок и получение датированной беременности*

Протокол рассчитан на 7 дней. В 1 день в 13–15 ч проводится внутрибрюшинная инъекция гонадотропного гормона сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) в физиологическом растворе в размере 5 МЕ на особь. На 3 день в 13–15 ч проводится инъекция хорионического гонадотропина человека в физиологическом растворе в размере 5 МЕ на особь (Sigma-Aldrich, США). После инъекции производится спадка самок с самцами. На 4 день

в 8 утра производится детектирование вагинальных пробок. Этот момент приравнивается к 0.5 сут эмбрионального развития (E0.5). Через 3 дня эмбрионы достигают возраста 3.5 дней (E3.5) и готовы к выделению из маток.

#### *Выделение эмбрионов мыши на стадии бластоцисты*

Выделение бластоцист происходит на стадии E3.5. Мышей выводили из эксперимента, матки изолировали и помещали в среду M2 (Gibco, Ирландия). Матки промывали и помещали на часовое стекло. Шприц, наполненный средой M2, помещали в шейку матки и вводили поочередно по 1–2 мл среды в каждый рог для вымывания эмбрионов из полости матки. Затем переносили эмбрионы при помощи держателя капилляров Stripper из часового стекла в 4-луночный планшет со средой M2 для их отмывки и дальнейшего использования.

#### *Децидуализация in vitro*

В работе использовали 2 наиболее распространенных варианта протоколов децидуализации: E2 (10 нМ) и P4 (1 мкМ), а также E2 (10 нМ) и 1 мкМ (MPA) (Okado et al., 1999; Berkhout et al., 2018). В полную среду DMEM добавляли гормоны, разведенные в диметилсульфоксиде (DMSO; SigmaAldrich, США). Концентрация DMSO в среде составляла 0.01%. Такая концентрация обладает минимальной токсичностью для клеток (Galvao et al., 2014). Гормональное воздействие заключалось либо в замене стандартной среды DMEM на среду с добавлением гормонов, либо пассирование клеток в среде с гормонами. В первом случае культивирование необходимо проводить 3-е сут для децидуализации *in vitro*, во втором случае – 3.5 сут.

#### *Криоконсервация клеток стромы эндометрия*

Клетки снимали с культурального флакона последовательной обработкой раствором Версена (ПанЭко, Россия) и 0.5% раствором трипсина (Gibco, Ирландия), после этого клетки центрифугировали и переносили в криопробирки, содержащие среду DMEM с 20% FBS и 10% DMSO. Криопробирки помещали в изопропанол и ставили на ночь на  $-70^{\circ}\text{C}$ , после чего переносили в пары жидкого азота. Размораживание проводили быстрым способом, нагревая клетки теплом рук.

#### *Проточная цитометрия с визуализацией на проточном цитометре AMNIS*

Клетки стромы эндометрия (до 4 пассажа) сажали в культуральный флакон и подвергали раз-

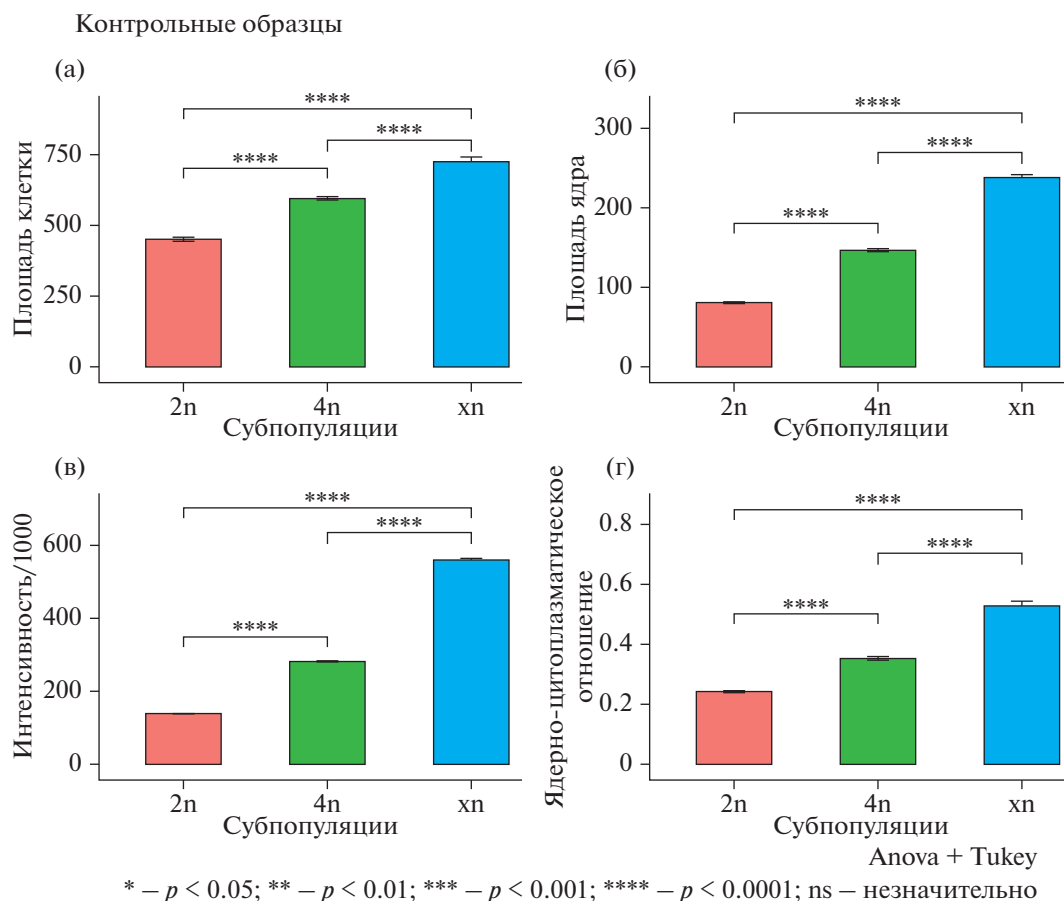
личным вариантам воздействий: контроль без гормонов, E2 + P4, E2 + MPA. Децидуализация *in vitro* проводилась методом пассирования клеток в среде с гормонами. По окончании культивирования клетки снимали с культуральных флаконов при помощи раствора Версена и 0.5% трипсина, центрифугировали 5 минут при 1200 g и отмывали 3 раза DPBS (ПанЭко, Россия) с последующим центрифугированием. После отмывок производилась фиксация в 4% растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин при комнатной температуре с последующим центрифугированием и 2 отмывками в DPBS. В конце образцы окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США) и отмывали DPBS 1 раз. Полученную суспензию клеток анализировали, используя проточный цитометр с визуализацией Amnis ImageStreamX Mark II, Luminex. Анализ производился на приборе ImageStream<sup>®</sup>X MarkII при помощи программного обеспечения IDEAS (Amnis, США) версии 6.2.187.0. В каждом образце собирали по 5000 клеток целевого диапазона: площадь клеток в фазовом контрасте: от 147.44 до 1073.94, отношение длина-ширина: от 1.038 до 0.749 (рис. 1).

Последовательность обработки полученных данных была одинаковой для всех образцов, ниже продемонстрирован процесс анализа на примере одного из образцов (рис. 2).

На начальном этапе отбираются клетки, попавшие в фокус камеры прибора (рис. 2а) и затем в диапазон площади и соотношения сторон (рис. 2б), что позволяет отфильтровать клеточный дебрис и ассоциаты клеток. Гистограмма распределения интенсивности позволяет определить структуру субпопуляций клеток, где пик интенсивности “2n” соответствует диплоидным клеткам, “4n” – тетраплоидным, “xn” – полиплоидным (рис. 2в). Дальнейший анализ отфильтровывает деформированные ядра клеток, оставляя только округлые ядра (рис. 2г). Полученные таким образом данные использовали для построения двумерных диаграмм рассеяния в координатах площадь ядра и интенсивность сигнала в канале DAPI, где вручную удаляли непригодные для анализа клетки.

#### *Исследование влияния различных концентраций E2 и P4 на среднюю площадь ядер*

В 96 луночный планшет вносили по 30000 клеток на лунку. В качестве негативного контроля брали образцы без гормонального воздействия, положительный контроль составили образцы с концентрацией гормонов 10 нМ E2 и 1 мкМ P4. Остальные образцы подвергались воздействию гормонов E2 и P4, отличающихся в 0.25 (2.5 нМ E2 и 0.25 мкМ P4), 0.5 (5 нМ E2 и 0.5 мкМ P4), 1.5 (15 нМ E2 и 1.5 мкМ P4) и 2 (20 нМ E2 и 2 мкМ P4) раз от положительного контроля. Гормональное воздействие проводилось в течение 3 дней в соот-



**Рис. 1.** Сравнение характеристик субпопуляций в контрольных образцах под воздействием гормонов (без дополнительных условий культивирования). Контроль – без обработки гормонами, PE – E2 + P4, MPA – E2 + MPA. (а) Площадь клетки, (б) площадь ядра, (в) интенсивность флуоресценции DAPI/1000 (от изначальных значений, для удобства визуализации), (г) ядерно-цитоплазматическое отношение. На каждом графике 2n – диплоидная субпопуляция, 4n – тетраплоидная субпопуляция, xp – полиплоидная субпопуляция.

ветствии с протоколом децидуализации. На третий день ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen, США). Затем клетки фотографировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IX73. Фотографии были обработаны в программе Cell Profiler v.4.2 (CellProfiler, США). После подсчета значений площадей и их сортировки по возрастанию было выбрано 1000 наибольших значений, которые соответствуют самым крупным ядрам.

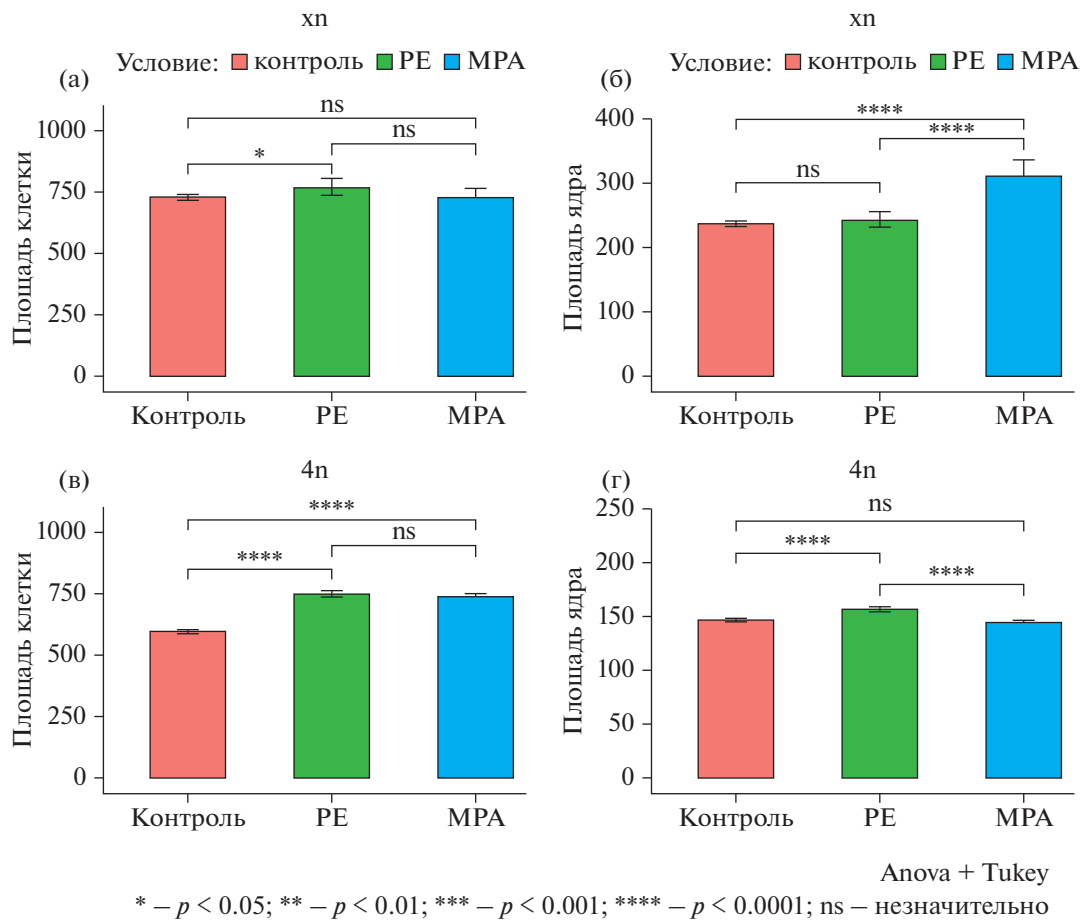
#### Культивирование стромы с эмбрионами

Строма была разделена на 3 группы: без воздействия гормонов, под воздействием E2 + P4, под воздействием E2 + MPA. Каждая группа была представлена 3 биологическими повторами. На опытных образцах стромы проводили 3-х дневный протокол децидуализации. Затем в образцы переносили свежесывленные эмбрионы мыши (по 6 штук на лунку 12 луночного планшета) на стадии бластоцисты, заменив при этом среду для децидуализации на полную среду ДМЕМ. Перед

переносом эмбрионы помещались в среду, содержащую флуоресцентный краситель Calcein (ThermoFisher Scientific, США). Прикрепление и площадь инвазии эмбрионов проверяли каждые 24 ч. По прошествии 96 ч совместного культивирования образцы лизировали при помощи Trizol Reagent (ThermoFisher Scientific, США) для последующего анализа экспрессии генов.

#### ПЦР в реальном времени

Измерение экспрессии проводилось для следующих генов: *Prl* (пролактин), *Vmp2*, *Hand2*, *Hoxa11*, *Rac1*, *RhoA*, *Mmp2*. В качестве референсных генов использовали *Actb* и *Tbp*. Праймеры для указанных генов подбирали с помощью программ PrimerBlast (NCBI), PrimerSelect (“DNASTAR”, США) и онлайн сервиса Oligoanalyzer. Праймеры были синтезированы в компании “Евроген” (Россия). Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Выделение тотальной РНК из клеток стромы проводили, используя коммерче-



**Рис. 2.** Характеристики субпопуляций в контрольных образцах под воздействием гормонов (без дополнительных условий культивирования). Контроль – без обработки гормонами, PE – E2 + P4, MPA – E2 + MPA. (а) Площадь клетки субпопуляции полиплоидных клеток, (б) площадь ядра субпопуляции полиплоидных клеток, (в) площадь клетки субпопуляции тетраплоидных клеток, (г) площадь ядра субпопуляции тетраплоидных клеток.

ский протокол для Trizol Reagent (Thermofisher, США). Затем проводили обработку образцов ДНКазой I (Thermofisher, США) с последующим переосаждением РНК в 8 М растворе LiCl. Обратную транскрипцию проводили коммерческим набором компании “Евроген” MMLV RT Kit. Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе Roche LightCycler 96 SW 1.1c использованием набора компании “Евроген” qPCRmix-HS SYBR + LowRox.

*Статистическая обработка результатов*

Оценка средней площади ядер: фотографии обрабатывали в программе Cell Profiler v.4.2. В результате были получены значения площадей ядер каждой индивидуальной клетки. Результаты были обработаны при помощи дисперсионного анализа с последующим пост-хок тестом по методу Тьюки.

Анализ результатов ПЦР в реальном времени: значения Ct были преобразованы в dCt по референсным генам. Между разными группами (ин-

тактная строма, строма после криоконсервации, строма после культивирования с эмбрионами) и воздействиями (без гормонов, воздействие E2 + P4, воздействие E2 + MPA) проводились попарные сравнения с помощью дисперсионного анализа с последующим пост хок тестом по методу Тьюки. В ряде случаев при нарушении условий дисперсионного анализа применялся критерий Краскела–Уоллиса с последующим пост хок тестом по методу dunn (с поправкой Бонферрони). Визуализация результатов проводилась в значениях  $2^{(-dct)}$  для более легкой читаемости графиков.

Обработка данных проточного цитометра с визуализацией Amnis: значения интенсивностей флуоресценции DAPI, площадей клеток и ядер для каждого образца были экспортированы в виде .txt файлов и подвергнуты кластерному анализу методом k\_средних в среде программирования python 3.8.12 (numpy: 1.21.0, pandas: 1.4.1, scikit-learn: 1.0.2). Кластеризация проводилась в предположении существования 3 субпопуляций, в ка-

Таблица 1. Последовательности праймеров

Название гена, прямой или обратный праймер	Последовательность	Производитель, страна
<i>Prl</i> , fw	AGCCTCTGCCAATCTGTTCC	Евроген, Россия
<i>Prl</i> , rv	ATCCCATTTTCCTTTGGCTTCA	
<i>Bmp2</i> , fw	CGGGAACAGATACAGGAAGC	
<i>Bmp2</i> , rv	GCTGTTTGTGTTTGGCTTGA	
<i>Hand2</i> , fw	CCGACACCAAACCTCTCCAAG	
<i>Hand2</i> , rv	TCTTGTCTGTTGCTGCTCACT	
<i>Hoxa11</i> , fw	CGGCCACACTGAGGACAAGGC	
<i>Hoxa11</i> , rv	GACGCTGAAGAAGAACTCTCGC	
<i>Rac1</i> , fw	ATGCAGGCCATCAAGTGTG	
<i>Rac1</i> , rv	TAGGAGAGGGGACGCAATCT	
<i>RhoA</i> , fw	TGAAGCAGGAGCCGGTAAA	
<i>RhoA</i> , rv	CAAAAGCGCCAATCCTGTTT	
$\beta$ - <i>actin</i> , fw	CGTGCGTGACATCAAAGAGAA	
$\beta$ - <i>actin</i> , rv	GGCCATCTCCTGCTCGAA	
<i>Tbp</i> , fw	CTACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC	
<i>Tbp</i> , rv	AATCAACGCAGTTGTCCGTGGC	
<i>Mmp2</i> , fw	CAAGGATGGACTCCTGGCACAT	
<i>Mmp2</i> , rv	TACTCGCCATCAGCGTTCCCAT	

честве метрики кластеризации использовался силуэт. Точность кластеризации составила 0.71–0.75. Полученные субпопуляции были подвергнуты дисперсионному анализу с последующим сравнением групп по методу Тьюки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Влияние дозы гормонов на площадь ядра (флуоресцентная микроскопия)*

На первом этапе работы была исследована модель децидуализации стромы, где в качестве индукторов выступают половые стероидные гормоны, участвующие в дифференцировке стромальных клеток *in vivo*. Клетки обрабатывали E2 и P4 в нескольких вариантах дозирования, при этом сохраняя одно и то же соотношение концентраций гормонов: P4/E2 = 100. Соотношение было взято из работы Окада с соавторами, где был предложен протокол моделирования децидуализации с использованием P4 в концентрации 1 мкМ и E2 – в 10 нМ (Okada et al., 1999). Данный протокол широко используется в настоящее время, поэтому мы решили выяснить, каким образом будут влиять кратно измененные концентрации гормонов на процесс децидуализации (см. материалы и методы).

Клетки стромы в ходе децидуализации становятся полиплоидными. Поэтому для качественной оценки ответа клеток стромы на гормональное воз-

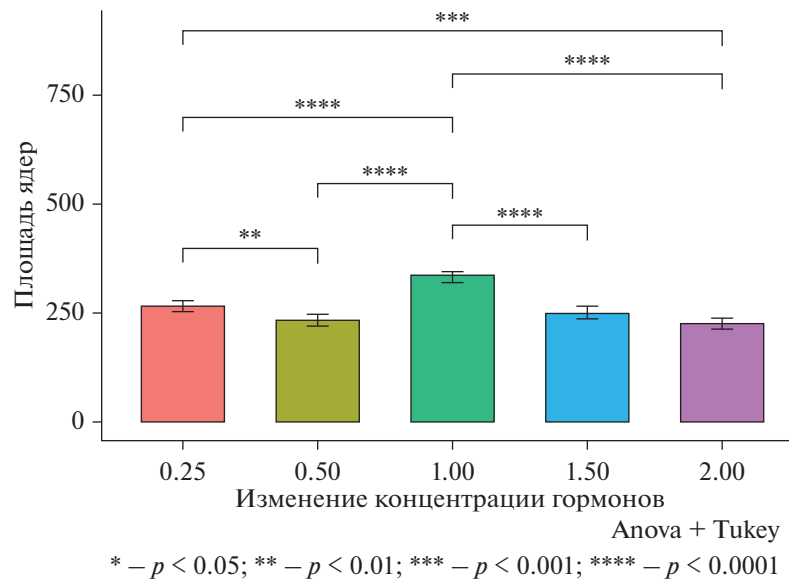
действие была использована морфологическая характеристика – площадь ядра, отражающая увеличение содержания ДНК в клетке (Gregory, 2001). Концентрация из работы Окада была принята нами за исходную точку (группа 1), в то время как остальные концентрации отличались в 0.25, 0.5, 1.5 и 2 раз от группы 1.

Ядра в группе 1 в среднем имеют значимо большую площадь по сравнению с остальными группами, группа 0.25 значимо отличается от групп 0.5 и 2 в большую сторону (рис. 3). В соответствии с этим результатом мы взяли концентрации гормонов из группы 1 для обработки стромы в последующих экспериментах.

### *Определение субпопуляционного состава клеток стромы эндометрия*

Клетки стромы как без обработки гормонами, так и поле обработки E2 + P4 или E2 + МРА формируют 3 субпопуляции, соответствующие диплоидным (2n), тетраплоидным (4n) и полиплоидным клеткам (xn) (рис. 4).

Выявленные субпопуляции в контрольной группе значимо отличаются друг от друга по значениям площадей клетки и ядра, интенсивности флуоресценции DAPI и ядерно-цитоплазматическому отношению. При этом в тетраплоидной популяции (4n) в среднем значения всех указанных показателей больше относительно диплоид-



**Рис. 3.** Изменение площади ядер в мкм в зависимости от дозы гормонов E2 и P4. По оси  $x$  отложены значения, которые отображают, во сколько раз в каждой экспериментальной группе концентрации гормонов отличаются от стандартной концентрации: 1 – 1 мкМ P4 и 10 нМ E2, 0.5 – 0.5 мкМ P4 и 5 нМ E2, 0.25 – 0.25 мкМ P4 и 2.5 нМ E2, 1.5 – 1.5 мкМ P4 и 15 нМ E2, 2 – 2 мкМ P4 и 20 нМ E2.

ной популяции, но меньше, чем в полиплоидной (см. дополнительные материалы, рис. 1, 2). Образцы стромальных клеток, подвергшихся воздействию гормонов для децидуализации *in vitro* (E2 + P4 и E2 + MPA) демонстрируют аналогичное распределение всех показателей между субпопуляциями.

Тетраплоидные клетки демонстрируют уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения в обработанных гормонами образцах по сравнению с контролем без обработки. В то же время ядерно-цитоплазматическое отношение полиплоидных клеток при воздействии E2 + P4 значительно больше, чем в контроле, образцы E2 + P4 и E2 + MPA также значительно отличаются друг от друга. В группе E2 + P4 на уровне тенденции растет площадь ядра по сравнению с контролем, в группе E2 + MPA площадь ядра значительно больше, чем в контроле и E2 + P4 (см. дополнительные материалы, рис. 1, 2).

#### Экспрессия генов децидуализации в клетках стромы в различных условиях

Для того чтобы выяснить, каким образом влияют различные способы обработки гормонами на дифференцировку клеток стромы, был проведен анализ экспрессии генов, ассоциированных с децидуализацией. Кроме того, была исследована роль эмбриона в процессе децидуализации *in vitro*, а также способность стромы отвечать на гормональные воздействия и эмбрион после криоконсервации.

#### Пролактин (*Prl*)

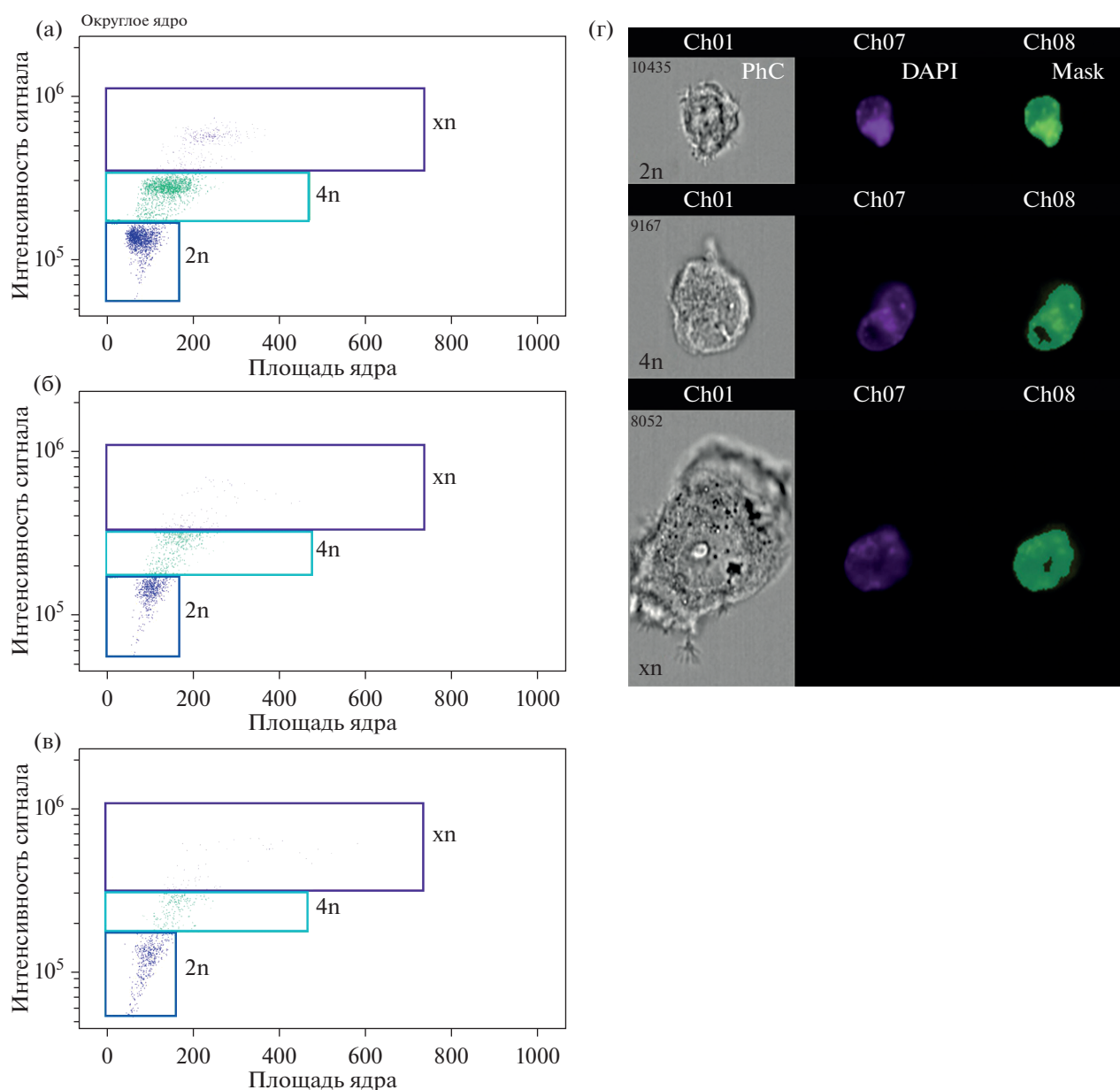
При любом типе гормонального воздействия уровень экспрессии *Prl*, кодирующего гормон пролактин, достоверно растет относительно стромы без обработки гормонами (б/г). Такая зависимость наблюдается для всех состояний стромы, как для интактной, так и подвергшейся криоконсервации и культивированию с эмбрионом (рис. 6а–6в).

После криоконсервации клеток происходит значимое увеличение экспрессии *Prl* по сравнению с интактной стромой для всех типов гормональных воздействий (рис. 6г–6е). Аналогичные эффекты вызывает влияние эмбриона в группе образцов без обработки (рис. 6г) и образцов под воздействием E2 + P4 (рис. 6д), однако в гормональном режиме E2 + MPA (рис. 6е) влияние эмбриона не вызывает значимого повышения экспрессии *Prl*.

#### *Bmp2*

Вне зависимости от типа гормонального воздействия уровень экспрессии *Bone Morphogenetic Protein 2 (Bmp2)* в целом уменьшался относительно контроля без обработки гормонами (рис. 7а–7в). Однако, стоит отметить, что гормональное воздействие E2 + P4 влияло незначительно в случае культивирования стромы с эмбрионом (рис. 7в).

Криоконсервация клеток достоверно приводит к снижению экспрессии *Bmp2* по сравнению с интактной стромой и культивированием совместно с эмбрионом для всех типов гормональ-



**Рис. 4.** Распределение клеток по площади ядра и интенсивности сигнала (двухмерная гистограмма). (а) Контрольные образцы, без обработки гормонами (9416 клеток), (б) обработка гормонами 1  $\mu$ М Р4 и 10 нМ Е2 (4366 клеток), (в) обработка гормонами 10 нМ Е2 и 1  $\mu$ М МРА (3795 клеток). На каждом графике 2n – диплоидные клетки, 4n – тетраплоидные клетки, xn – полиплоидные клетки. (г) Изображение клеток, относящихся к представленным субпопуляциям, PhC – фазовый контраст, Mask – маскирование участка, соответствующего ядру клетки.

ных воздействий (рис. 7г–7е). Присутствие эмбриона не влияет на экспрессию *Vmp2* в строме по сравнению с интактной стромой для всех типов режимов культивирования (рис. 7г–7е).

### *Hand2*

При всех типах гормональных воздействий экспрессия *Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2 (Hand2)* значимо увеличивается по

сравнению с контролем без гормонов для любых состояний стромы (рис. 8а–8в).

Криоконсервация клеток не оказывает влияния на экспрессию *Hand2* по сравнению с интактной стромой в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 8г) и обработки Е2 + Р4 (рис. 8д), однако значимо снижает экспрессию *Hand2* по сравнению с интактной стромой в случае гормонального воздействия Е2 + МРА (рис. 8е). Культивирование стромы с эмбрионом достоверно повышает экспрессию *Hand2* по сравнению с ин-



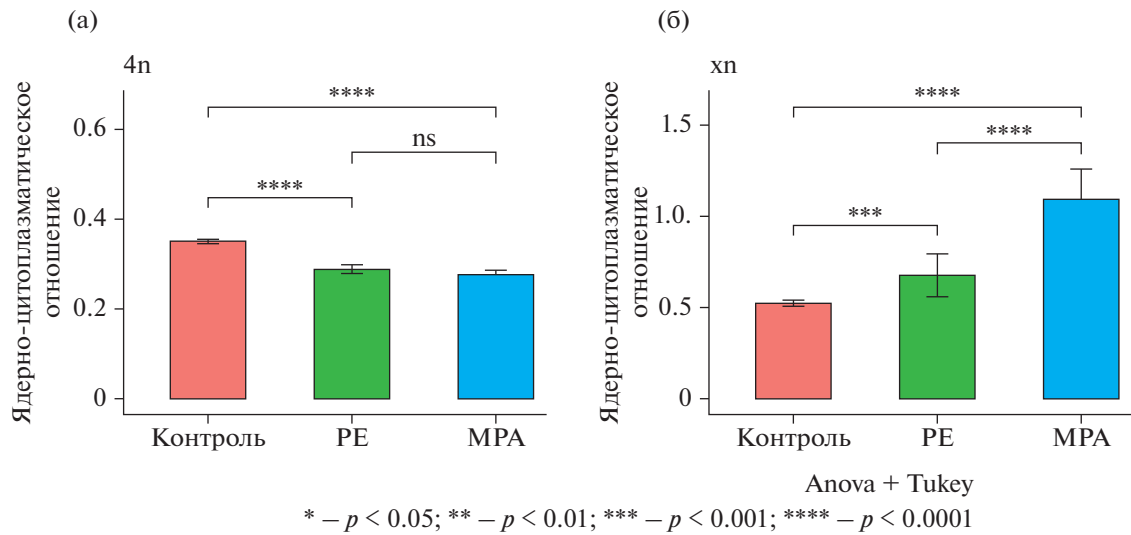


Рис. 5. Ядерно-цитоплазматическое отношение клеток в зависимости от типа гормонального воздействия (без обработки – контроль, E2 + P4 – PE, E2 + MPA – MPA). (a) Тетраплоидные клетки, (б) полиплоидные клетки.

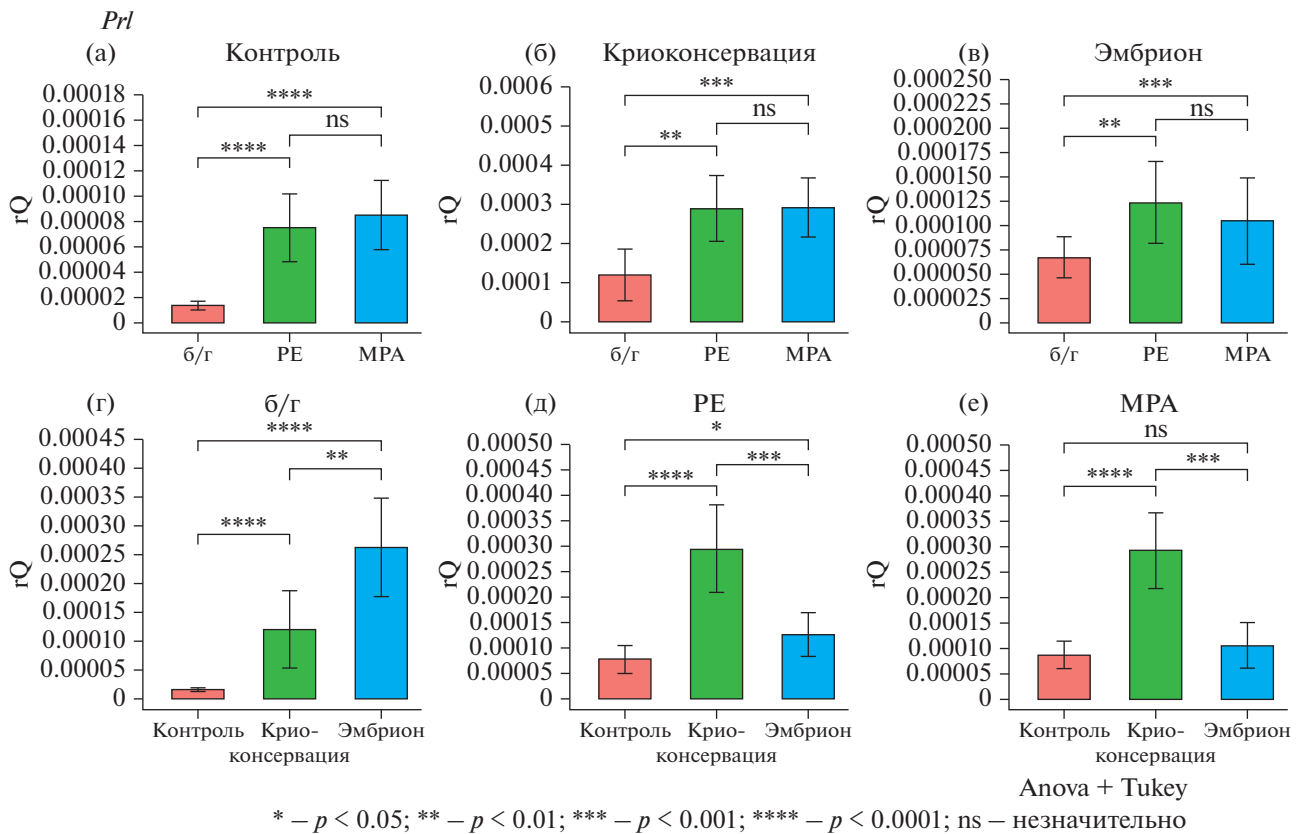
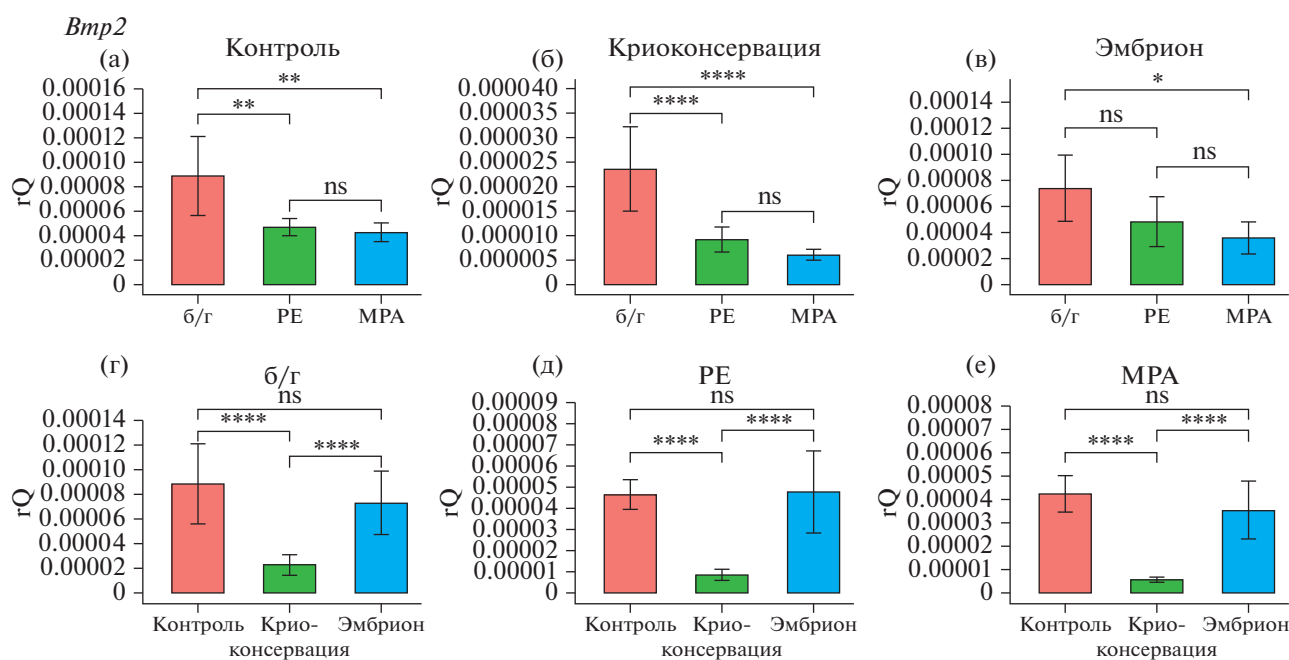


Рис. 6. Экспрессия гена пролактина (*Prl*). rQ – уровень экспрессии *Prl* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строма (а), строма после криоконсервации (б), строма после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).



Anova + Tukey

\* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ ; ns – незначительно

**Рис. 7.** Экспрессия *Bmp2*. rQ – уровень экспрессии *Bmp2* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строма (а), строма после криоконсервации (б), строма после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

тактной стромой для всех режимов культивирования (рис. 8г–8е).

### *Hoxa11*

Гормональное воздействие (E2 + P4 и E2 + MPA) достоверно увеличивает уровень экспрессии *Hoxa11* относительно интактной стромы (рис. 9а) и стромы после криоконсервации (рис. 9б), но не оказывает влияния на экспрессию *Hoxa11* в случае культивирования совместно эмбрионами (рис. 9в).

Криоконсервация и присутствие эмбриона в культуре клеток стромы значимо уменьшает экспрессию *Hoxa11* по сравнению с интактной стромой для всех типов гормональной обработки (рис. 9г–9е). Однако влияние эмбриона оказалось незначимым только в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 9г).

### *Rac1*

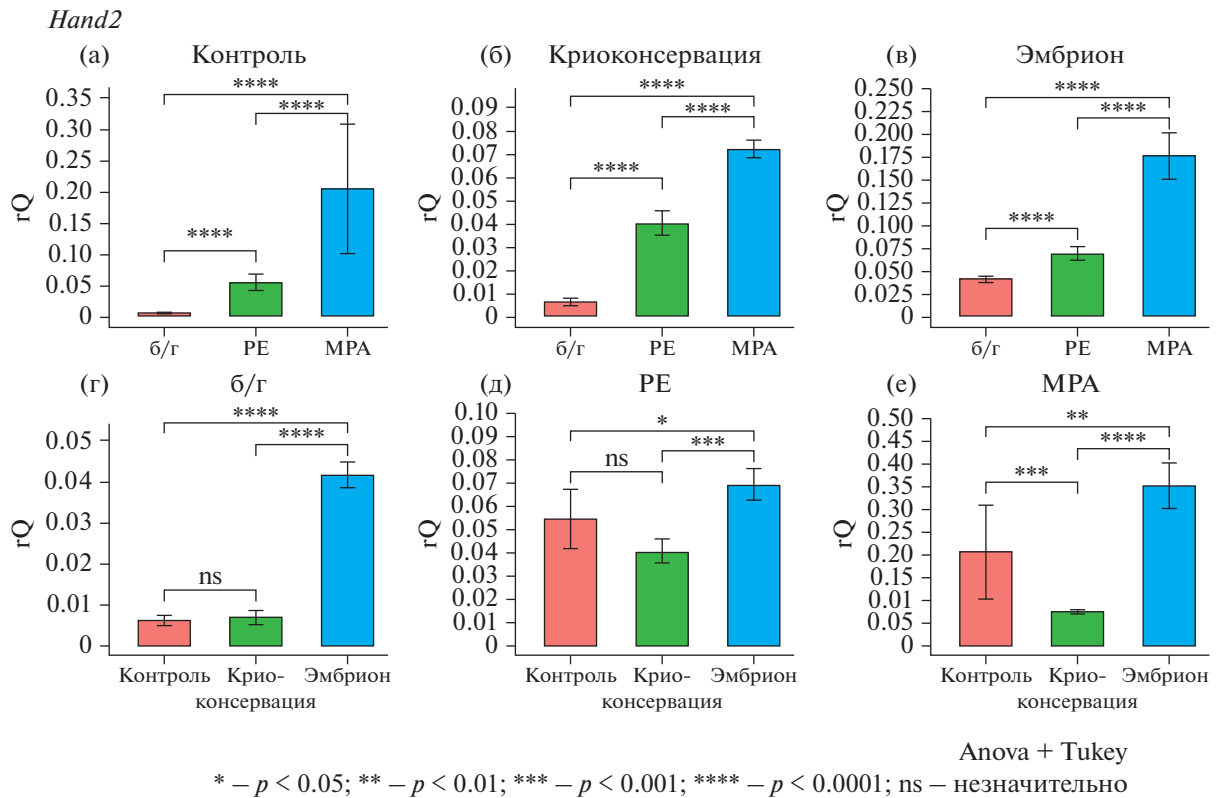
При всех типах гормонального воздействия экспрессия *Rac1* увеличивается по сравнению с контролем без обработки как для интактной стромы

(рис. 10а), так и для стромы после культивирования с эмбрионами (рис. 10в), однако не изменяется для стромы после криоконсервации (рис. 10б).

Криоконсервация стромы не значимо влияет на экспрессию *Rac1* по сравнению с интактной стромой без обработки гормонами (рис. 10г) и гормонального воздействия E2 + P4 (рис. 10д), однако значимо уменьшает экспрессию *Rac1* для воздействия E2 + MPA (рис. 10е). Воздействие эмбрионов значимо повышает экспрессию *Rac1* для всех режимов.

### *RhoA*

Воздействие E2 + P4 не оказывает влияния на экспрессию *RhoA* по сравнению с контролем (без гормонального воздействия) в случае интактной стромы (рис. 11а) и стромы после криоконсервации (рис. 11б), однако значимо повышает экспрессию *RhoA* в случае культивирования стромы с эмбрионами (рис. 11в). Гормональное воздействие на строма E2 + MPA не изменяет уровень экспрессии *RhoA* относительно режима культивирования



**Рис. 8.** Экспрессия *Hand2*. rQ – уровень экспрессии *Hand2* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

без гормонов в случае интактной стромы (рис. 11а), но значимо снижает экспрессию после криоконсервации (рис. 11б) и значимо увеличивает ее при культивировании стромы с эмбрионами (рис. 11в).

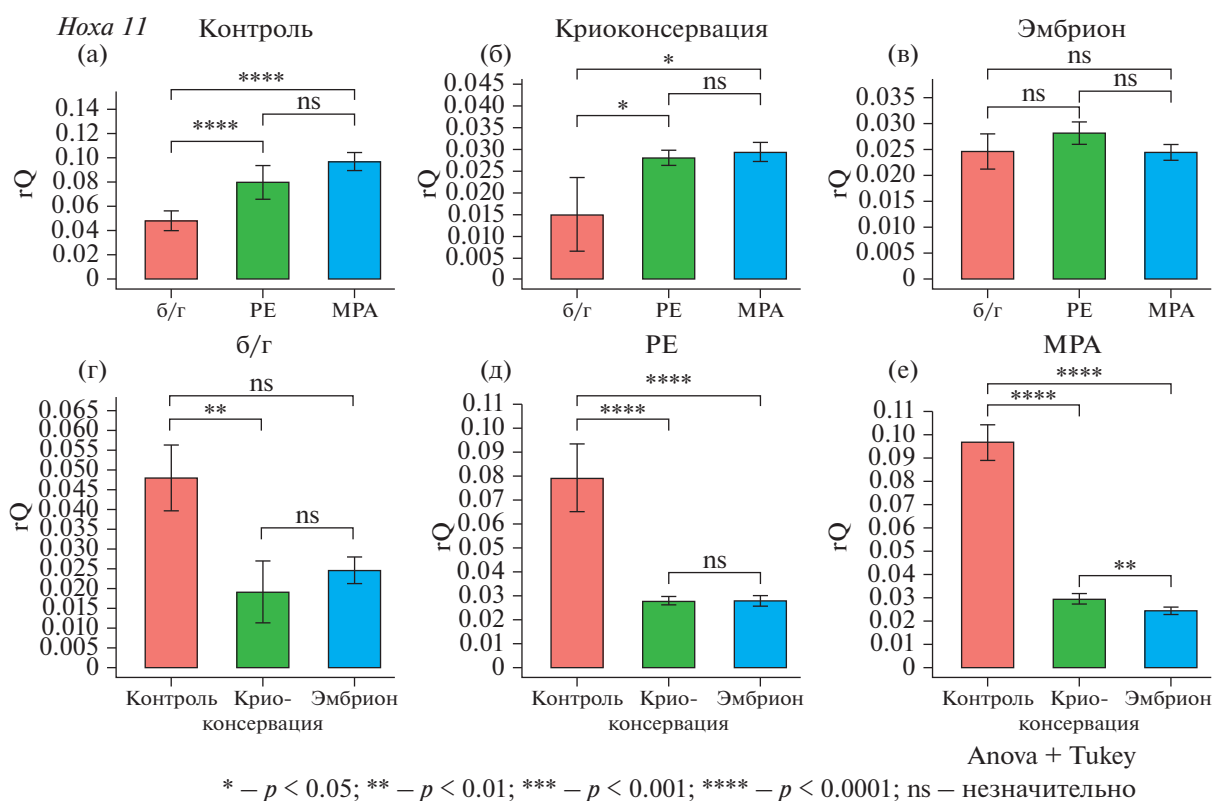
После криоконсервации стромы не наблюдается изменений в уровне экспрессии *RhoA* по сравнению с интактной стромой в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 11г), однако условие криоконсервации достоверно снижает экспрессию *RhoA* при всех типах гормонального воздействия (рис. 11д, 11е). Воздействие эмбриона значимо снижает экспрессию *RhoA* относительно интактной стромы только в случае режима культивирования без гормонов (рис. 11г), в то время как в случае гормональных воздействий (рис. 11д, 11е) уровень экспрессии *RhoA* увеличивается в виде тенденции.

### *Mmp2*

Гормональное воздействие E2 + P4 не оказывает влияния на экспрессию *Matrix Metalloproteinase 2*

(*Mmp2*) относительно стромы без обработки гормонами в случае интактной стромы (рис. 12а) и стромы после криоконсервации (рис. 12б), но значимо повышает экспрессию *Mmp2* при культивировании совместно с эмбрионами (рис. 12в). Гормональное воздействие E2 + MPA достоверно повышает экспрессию *Mmp2* по сравнению со стромой без гормонального воздействия в случае интактной стромы (рис. 12а) и стромы, культивированной с эмбрионами (рис. 12в), но не оказывает влияния на экспрессию *Mmp2* в строме после криоконсервации (рис. 12б).

Криоконсервация стромы вызывает повышение уровня экспрессии *Mmp2* по сравнению интактной стромой в отсутствие гормонального воздействия (рис. 12г), не оказывает влияния на экспрессию *Mmp2* в случае гормонального воздействия E2 + P4 (рис. 12д) и снижает экспрессию *Mmp2* при воздействии E2 + MPA. Присутствие эмбрионов значимо повышает экспрессию *Mmp2* по сравнению с интактной стромой в случае отсутствия гормонального воздействия (рис. 12г) и культивирова-



**Рис. 9.** Экспрессия *Hoxa11*. rQ — уровень экспрессии *Hoxa11* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г — строма без гормонального воздействия, PE — гормональное воздействие E2 + P4, МРА — гормональное воздействие E2 + МРА) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль — интактная строма, криоконсервация — строма после криоконсервации, эмбрион — культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + МРА (е).

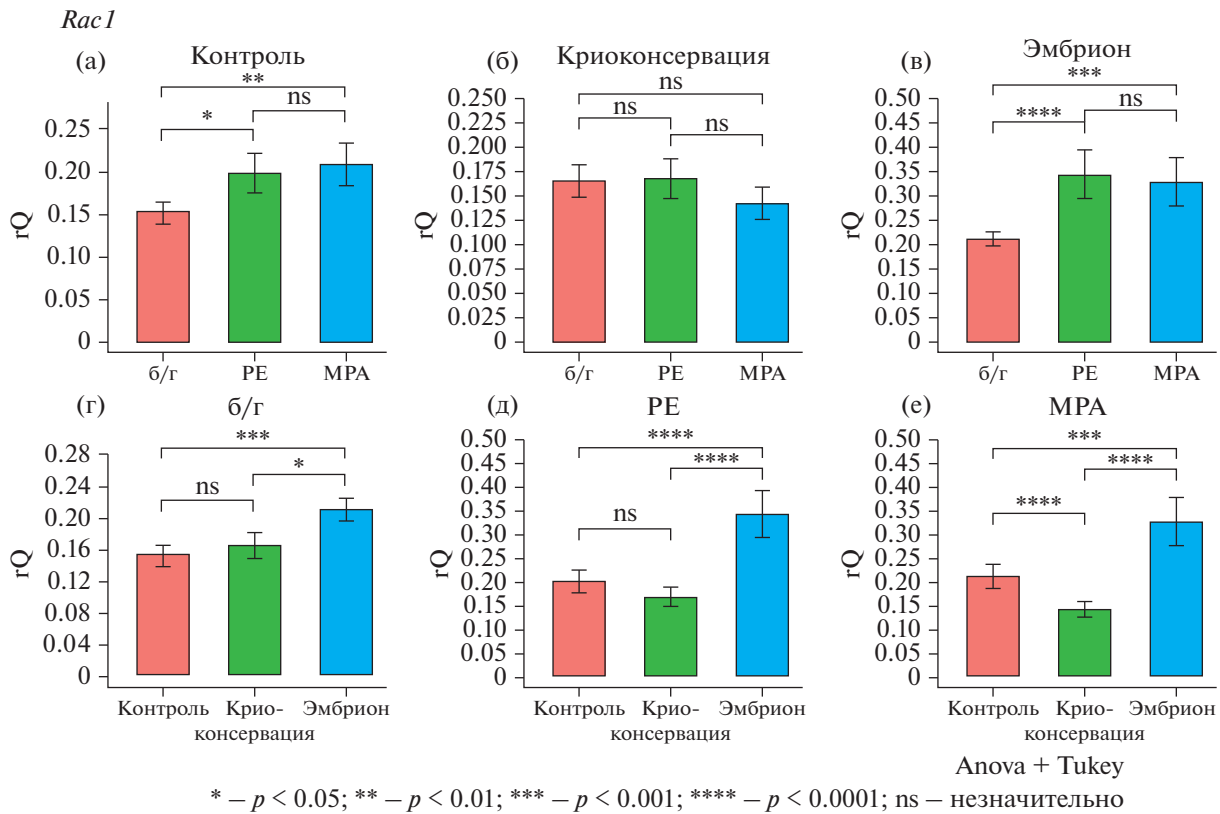
ния в условиях E2 + P4 (рис. 12д), а также снижает экспрессию *Mmp2* в случае воздействия E2 + МРА (рис. 12е).

#### Инвазия эмбрионов

Через 72 ч после начала культивирования стромы с эмбрионами площадь распластывания эмбрионов при гормональном воздействии E2 + P4 значительно увеличивается по сравнению со стромай без обработки гормонами и воздействием E2 + МРА, значимых отличий между группами без обработки гормонами и E2 + МРА нет (рис. 13а). Через 96 ч после начала культивирования группы не отличаются между собой (рис. 13б), при этом необходимо отметить, что в группе МРА большая часть эмбрионов дегенерировала ( $n = 2$ ). Фотографии распластывания эмбрионов при различных режимах культивирования представлены на рис. 14.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что модели имплантации эмбриона *in vitro* не могут в полной степени отразить процессы, происходящие на раннем этапе беременности, они широко используются, поскольку позволяют наблюдать взаимодействие клеток материнского организма и эмбриона напрямую. Кроме того, такие модели крайне удобны в варьировании условий имплантации, например, с целью выяснить причины возникновения того или иного нарушения. Обычно введение подобных модификаций вызывает технические сложности при изучении имплантации *in vivo*, что делает системы культивирования незаменимым инструментом для расширения понимания механизмов, обеспечивающих протекание данного процесса в норме и патологии. В связи с этим необходимо развивать существующие модели для того, чтобы с большей точностью интерпретировать полученные результаты. Целью этой работы было изучение известных и широко применяемых протоколов децидуализации клеток стромы в условиях 2D культу-



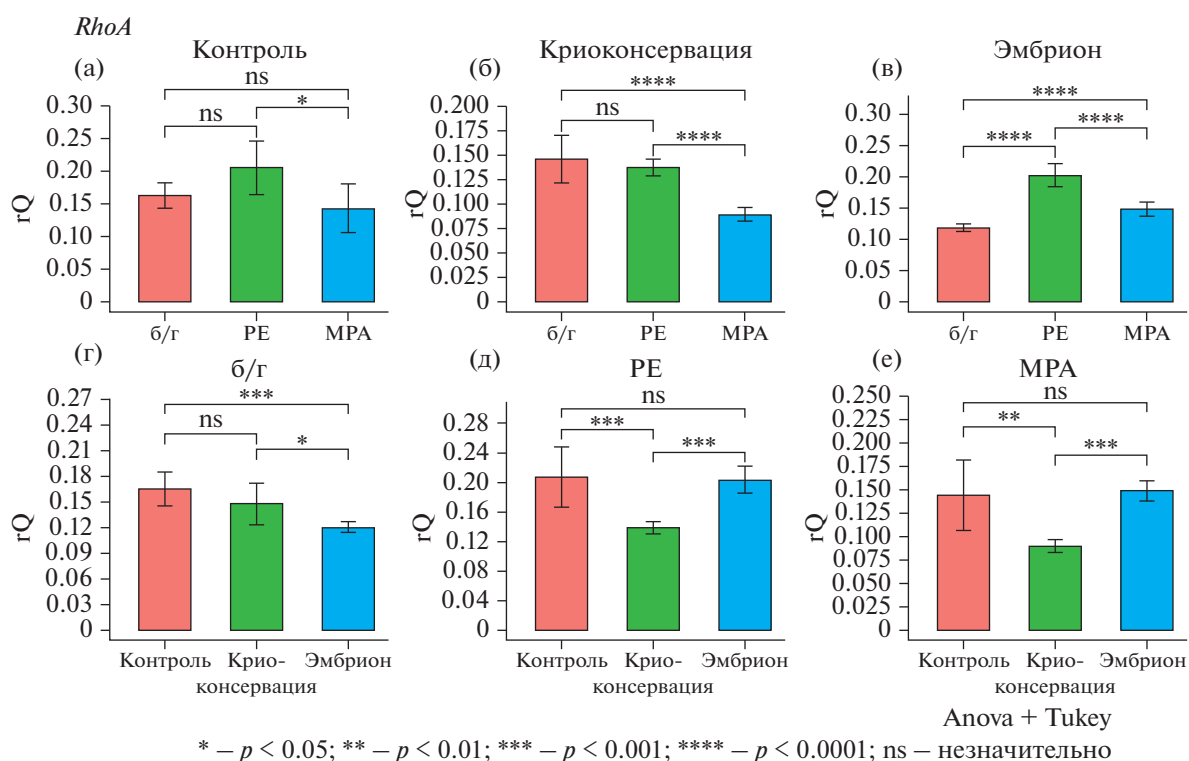
**Рис. 10.** Экспрессия *Rac1*. rQ – уровень экспрессии *Rac1* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

ры для оценки их соответствия процессу децидуализации с последующей имплантацией *in vitro*.

На настоящий момент известно целое множество протоколов децидуализации клеток стромы. Некоторые из них включают достаточно сложный состав гормонов для стимуляции дифференцировки клеток, например, дексаметазон, 5 $\alpha$ -дигидротестостерон, 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерон, 8-Br-cAMP и др. (Irwin et al., 1989; Nakamoto et al., 2005). Другие протоколы более простые: клетки стромы подвергаются исключительно обработке P4 (Karia et al., 1991; Das et al., 2012). Однако индукция синтеза пролактина, главного маркера децидуализации, зависит от E2 (Randolph et al., 1990). Поэтому в большинстве современных исследований для запуска дифференцировки стромальных клеток используют E2 в сочетании с P4 или MPA, которые, в свою очередь, необходимы для поддержания децидуализованного фенотипа стромы (Huang et al., 1987; Yang et al., 2017; Berkhout et al., 2018).

Во многих работах, посвященных оптимизации протоколов децидуализации, варьируют различными вариантами гормональных обработок, при этом информация о точной концентрации гормонов, которая принимается за оптимальную для дифференцировки, фактически отсутствует.

Известно, что в ходе децидуализации стромальные клетки приобретают эпителиоподобную морфологию и подвергаются полиплоидизации. Увеличение плоидности часто приводит к увеличению площади ядра в связи с ростом содержания ДНК (Gregory, 2001). Поэтому мы провели оценку такой морфологической характеристики, как площадь ядра клетки, для изучения влияния различных концентраций E2 и P4 на дифференцировку стромы. Анализ результатов показал, что наибольшее увеличение площади ядра наблюдается в клетках, обработанных P4 в концентрации 1 мкМ и E2 – в 10 нМ. Кроме того, нами было выявлено увеличение площади ядра при воздействии 0.25 мкМ P4 и 2.5 нМ E2. Мы предполагаем, что данные концентрации могут быть близки физиологиче-



**Рис. 11.** Экспрессия *RhoA*. rQ – уровень экспрессии *RhoA* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строма (а), строма после криоконсервации (б), строма после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).

ской концентрации гормонов при децидуализации во время беременности, однако это предположение требует дальнейшей проверки.

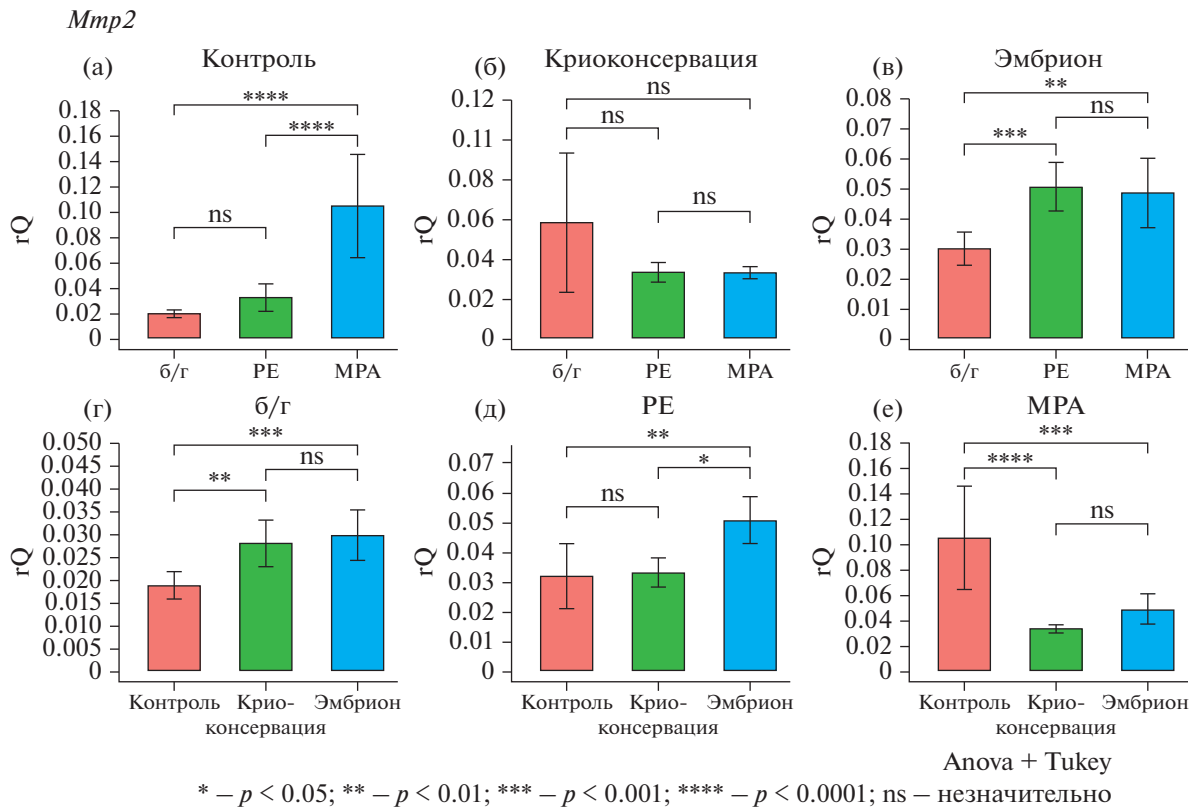
MPA является агонистом рецепторов к прогестерону, но также связывается с глюкокортикоидным рецептором (Andraschko et al., 2022). Существуют данные о том, что глюкокортикоидные и эстрогеновые рецепторы могут осуществлять совместную регуляцию экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, в эндометрии. Глюкокортикоиды оказывают влияние на децидуализацию клеток стромы в ходе менструального цикла человека (Whirledge et al., 2017). Исходя из этих данных, мы предполагаем, что MPA может оказывать неспецифическое действие на клетки стромы в ходе децидуализации *in vitro*. Поэтому мы задались вопросом о существовании различий в индукции децидуализации между протоколами, в которых используется MPA или P4 в сочетании с E2.

Проточная цитометрия с визуализацией позволила определить субпопуляционную структуру клеток стромы эндометрия при различных режи-

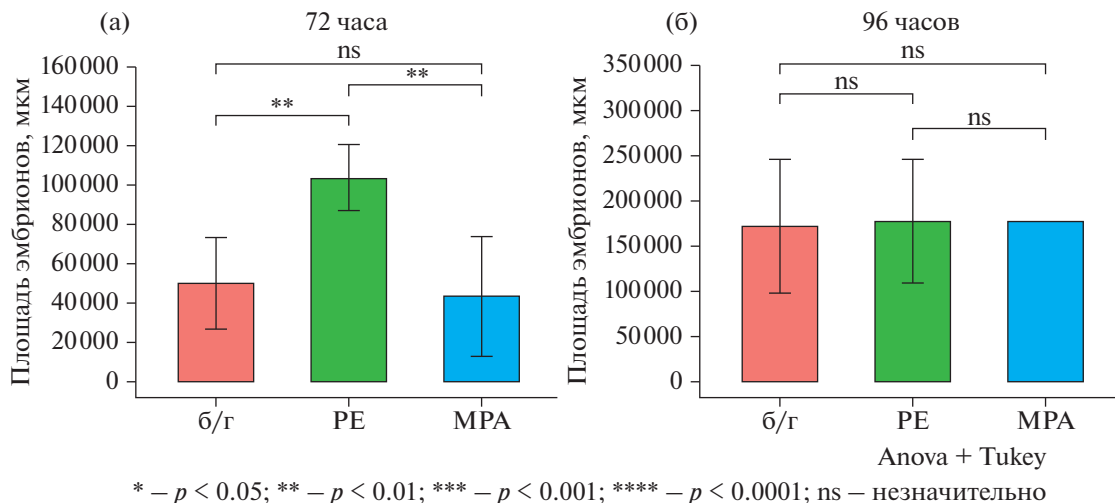
мах культивирования: вне зависимости от гормонального воздействия выявляются субпопуляции диплоидных, тетраплоидных и полиплоидных клеток. Ввиду небольшого количества образцов мы не можем сделать однозначные выводы об изменении соотношения субпопуляций при гормональном воздействии, однако мы полагаем, что количество полиплоидных клеток должно увеличиваться.

Гормональное воздействие E2 + P4 и E2 + MPA приводит к увеличению ядерно-цитоплазматического соотношения полиплоидных клеток. Возможно, это происходит за счет увеличения площади ядер, поскольку в эксперименте с варьированием дозировки гормонов также выявляется увеличение площади ядер при обработке аналогичными концентрациями E2 и P4.

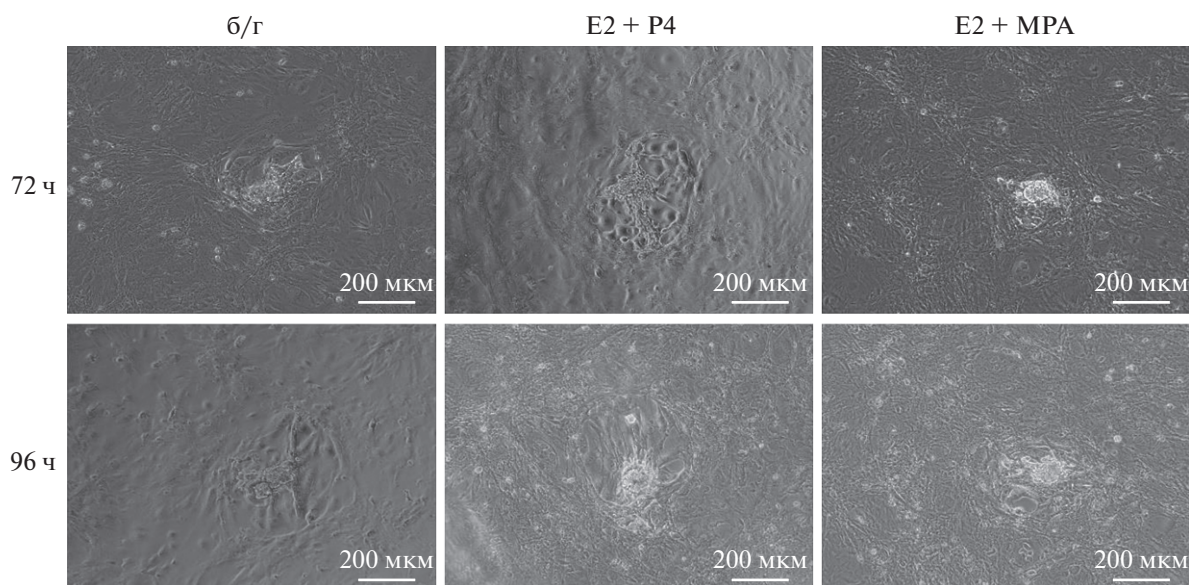
Далее мы исследовали экспрессию генов, продукты которых связаны с процессом децидуализации стромы. Для более наглядной демонстрации совокупности изменений в клетках стромы при любом воздействии качественные изменения экспрес-



**Рис. 12.** Экспрессия *Mmp2*. rQ – уровень экспрессии *Mmp2* относительно гена домашнего хозяйства *Actb*. (а, б, в) Влияние гормональных воздействий (б/г – строма без гормонального воздействия, PE – гормональное воздействие E2 + P4, MPA – гормональное воздействие E2 + MPA) на интактную строму (а), строму после криоконсервации (б), строму после культивирования с эмбрионом (в); (г, д, е) влияние состояния стромы (контроль – интактная строма, криоконсервация – строма после криоконсервации, эмбрион – культивирование стромы с эмбрионом) на контрольные образцы без гормонального воздействия (г), образцы при гормональном воздействии E2 + P4 (д), образцы при гормональном воздействии E2 + MPA (е).



**Рис. 13.** Площадь распластывания эмбрионов. б/г – без гормонального воздействия, PE – воздействие E2 + P4, MPA – воздействие E2 + MPA. (а) Через 72 ч после начала совместного культивирования со стромой (24 ч после прикрепления эмбрионов), (б) через 96 ч после совместного культивирования со стромой (48 ч после прикрепления эмбрионов).



**Рис. 14.** Фазовый контраст. Распластывание эмбрионов после 72 и 96 ч культивирования со стромой. б/г – Без гормонального воздействия, PE – воздействие E2 + P4, MPA – воздействие E2 + MPA.

сии генов представлены в виде суммирующих графиков (рис. 15).

Тип воздействия указан в заголовке графиков, изменение экспрессии указывается относительно образца, в котором данное воздействие не производилось.

По оси абсцисс отложены исследуемые гены, по оси ординат – качественное изменение экспрессии генов по сравнению с отсутствием воздействия. 1 – повышение экспрессии гена, –1 – снижение экспрессии гена, 0 – экспрессия гена значимо не меняется. При каждом гене представлены значения дополнительных воздействий. Дополнительное воздействие повышает (стрелка вверх) или снижает (стрелка вниз) экспрессию гена, если принимать за контроль указанное в заголовке воздействие.

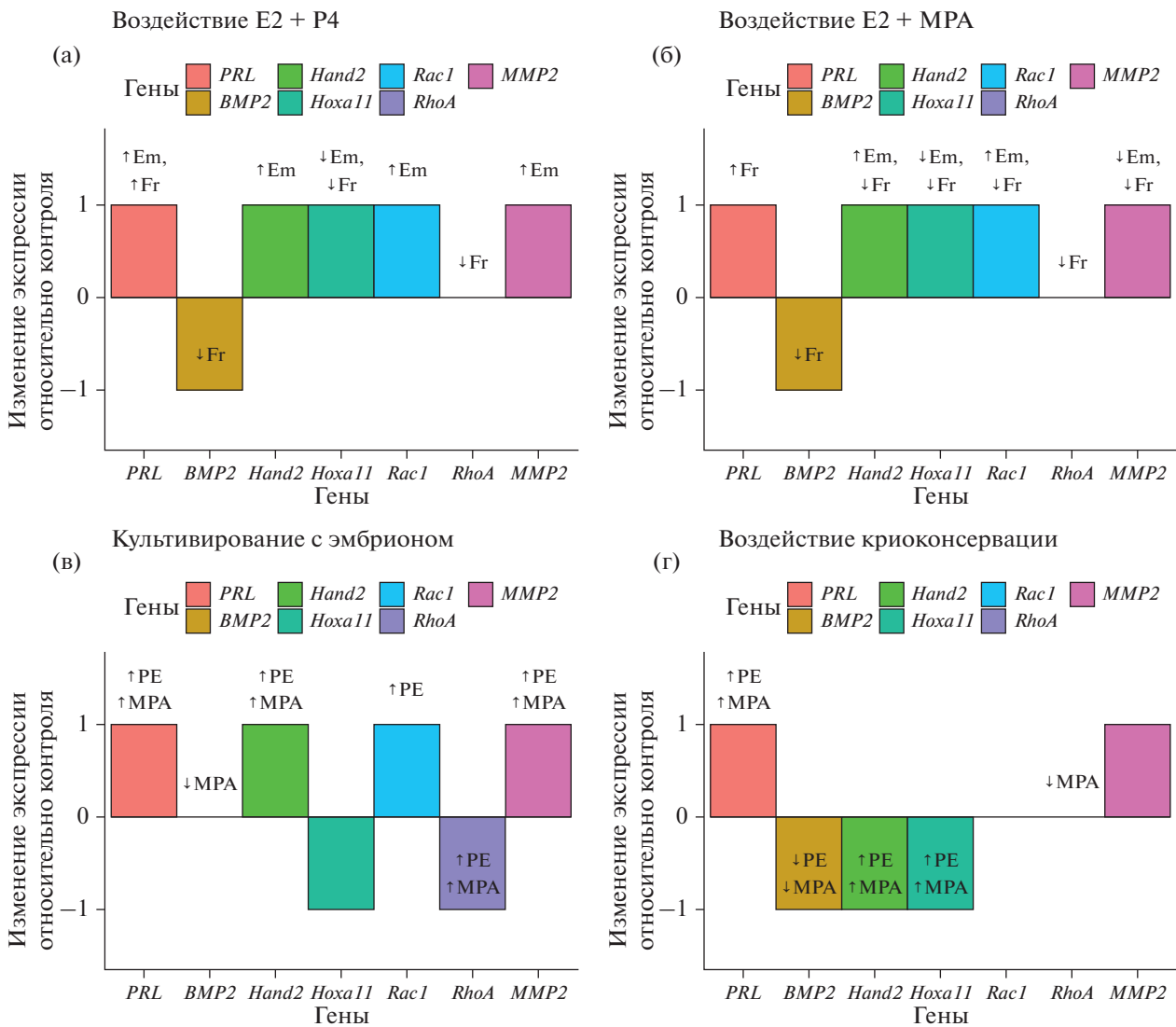
Экспрессия *Prl*, кодирующего пролактин, увеличивается как в ответ на гормональные воздействия (E2 + P4 и E2 + MPA), так и на присутствие эмбриона (рис. 15а, 15в). Это соотносится с более ранними работами, в которых изучались воздействия половых стероидных гормонов на процесс децидуализации стромы (Huang et al., 1987; Yang et al., 2017). Совместное культивирование стромы с эмбрионом также приводит к увеличению экспрессии *Prl*, причем даже без предварительной индукции децидуализации стромы. Мы предполагаем, что это может быть связано с секрецией эмбрионом факторов, паракринно действующих на клетки стромы. Одним из таких факторов является хорионический гонадотропин (ХГ). Известно, что его секреция вызывает выработку

циклического АМФ (цАМФ) в строме, который в свою очередь активирует транскрипцию генов, отвечающих за синтез пролактина (Makieva et al., 2018). Кроме того, присутствие эмбрионов усиливало эффект гормональных воздействий, что может быть результатом синергии эмбриональных факторов и гормонов (рис. 15в). Увеличение уровня экспрессии *Prl* стромой после криоконсервации в ответ на гормоны относительно интактных клеток (рис. 15г) противоречит аналогичной работе на клетках человека (Bochev et al., 2016). Расхождение в результатах может быть объяснено различными источниками клеток, поскольку в данном исследовании анализ экспрессии проводился на клетках мыши.

Экспрессия *Vmp2*, ответственного за прогрессирование децидуализации, снижалась практически во всех образцах в отличие от стромы без добавления гормонов (рис. 15а, 15б, 15г). Значимых изменений в экспрессии *Vmp2* не выявлялось только в образцах стромы после культивирования с эмбрионами (рис. 15в). Считается, что синтез *VMP2* в стромальном компартменте зависит от установления диалога между стромой и люминальным эпителием эндометрия через белок Indian Hedgehog (ИИ) (Makieva et al., 2018). Этим может быть объяснено уменьшение уровня экспрессии *Vmp2* в нашем эксперименте, поскольку мы не использовали клетки эпителия для культивирования со стромой.

Стромальный транскрипционный фактор *HAND2* участвует в ингибировании синтеза факторов роста фибробластов (Fibroblast growth fac-





**Рис. 15.** Графики качественного изменения экспрессии генов, ассоциированных с децидуализацией для стромы: (а) обработанной E2 + P4, (б) обработанной E2 + MPA, (в) подвергшейся криоконсервации, (г) культивированной совместно с эмбрионами. Em – влияние культивирования с эмбрионом, Fr – воздействие криоконсервации, PE – воздействие E2 + P4, MPA – воздействие E2 + MPA.

tors; Fgfs) в строме, которые отвечают за поддержание E2-зависимой пролиферации эпителия эндометрия. Экспрессия гена, кодирующего этот фактор, повышается в ответ на оба варианта гормональных воздействий (рис. 15а, 15б), что соотносится с данными литературы об индукции HAND2 прогестероном (Makieva et al., 2018). Культивирование стромы с эмбрионами дополнительно увеличивает уровень экспрессии *Hand2* (рис. 15в), что говорит в пользу возможного паракринного влияния эмбриональных факторов на строму.

Белок *HOXA11* близок по своей функции более известному в контексте децидуализации стромы *HOXA10* (Ramathal et al., 2010). *HOXA10* имеет

большое значение в ходе подготовки к имплантации, поскольку необходим для полиплоидизации клеток стромы, экспрессии маркеров децидуализации и интегринов на поверхности просветного эпителия (Zhu et al., 2014; Makieva et al., 2018; Massimiani et al., 2019). В нашей работе экспрессия *Hoxa11* увеличивается в ответ на все типы гормональных режимов культивирования стромы, что соотносится с данными литературы об увеличении его экспрессии во время децидуализации. При дополнительном воздействии эмбриона экспрессия *Hoxa11* значительно снижается, что указывает на потенциальную роль эмбриона в процессе регуляции клеточного цикла клеток стромы.

Согласно исследованиям *in vitro*, миграция стромальных клеток в процессе имплантации эмбриона может облегчать его инвазию, а также участвовать в селекции жизнеспособных эмбрионов (Teklenburg et al., 2010; Berkhout et al., 2018). Основными регуляторами миграции стромы являются Rho ГТФазы – Rac1 и RhoA, которые отвечают за динамические клеточные процессы, модулируя динамику актина и микротрубочек, активность миозина и клеточную адгезию. Ранее было выявлено, что активность Rac1 увеличивается в децидуализированной строме в ответ на прикрепившийся эмбрион, а RhoA – уменьшается (Grewal et al., 2008). Мы также показали, что эмбрион в условиях децидуализации повышает экспрессию *Rac1* и снижает *RhoA* в клетках стромы, что потенциально способствует его инвазии за счет усиленной миграционной способности клеток. Важно отметить, что гормональное воздействие само по себе не оказывает такого влияния на экспрессию белков, ассоциированных с миграторным потенциалом клеток.

Наконец, экспрессия *Mmp2* в ответ на воздействие E2 + P4 увеличивается на уровне тенденции. Однако в данных условиях ее экспрессию достоверно повышает присутствие эмбриона, что предположительно способно облегчить инвазию за счет ремоделирования межклеточного матрикса. Эта гипотеза подтверждается функциональным тестом по измерению площадей инвазии эмбрионов, так как наличие эмбриона совместно с гормональным воздействием E2 + P4 дает наилучший результат инвазии (рис. 13).

Экспрессия *Mmp2* увеличивается при добавлении E2 + МРА, однако воздействие эмбриона ее значительно подавляет. Главное отличие воздействия E2 + МРА от E2 + P4 состоит в том, что при дополнительном воздействии эмбриона в случае E2 + P4 экспрессия *Mmp2* повышается, а в случае E2 + МРА, наоборот, понижается. Возможно, это связано с неспецифическим действием МРА, что также является причиной отставания распластывания эмбрионов в данных условиях и их деградации после 96 ч культивирования (рис. 13).

Криоконсервация, по-видимому, искажает фенотипическое преобразование клеток стромы после добавления гормонов, что выражается в снижении экспрессии *Hand2*, *Hoxa11* и отсутствии повышения экспрессии *Rac1* и *Mmp2* в ответ на гормоны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что модели децидуализации и имплантации *in vitro* требуют дальнейшей доработки, поскольку они не могут дать правильного пред-

ставления о процессе взаимодействия эмбриона и эндометрия. Так, проанализировав данные инвазии эмбрионов и экспрессии генов, ассоциированных с децидуализацией, мы видим, что исследуемые модели не могут в полной мере отразить процессы *in vivo*. В то же время, мы показали, что модель, в которой используются половые стероидные гормоны E2 и P4, является более релевантной, чем с добавлением МРА. Существующие протоколы индукции дифференцировки клеток стромы не могут считаться оптимальными, поскольку зачастую они включают такие соединения, как МРА, имеющие дополнительные непредсказуемые эффекты на стромальные клетки и эмбрион. В дополнение к этому мы пришли к заключению, что культивирование стромы после криоконсервации является нецелесообразным, поскольку снижет ответ клеток стромы на гормональное воздействие.

Мы полагаем, что развитие 2D моделей имплантации эмбрионов на клетки стромы должно идти в направлении индукции децидуализации гормонами, естественными для клеток эндометрия. Кроме того, необходима модификация системы культивирования клеток стромы: для полноценной дифференцировки важно учитывать воздействие эпителия эндометрия.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования (ЦКП) ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-74-30015).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Антон Муромцев выполнил эксперименты и написал текст статьи, Анна Гайдамака написала текст статьи, Любовь Измайлова планировала эксперименты и помогала в анализе результатов проточного цитометра

Amnis, Екатерина Воротеяк планировала работу и отредактировала текст, Григорий Марченко проводил исследование суспензии клеток стромы на Amnis.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

См. файл “Дополнительные материалы”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andraschko M., de Carvalho M.T., Cardoso Martins Pires H. et al.* Melatonin attenuates glucocorticoid effect induced by medroxyprogesterone acetate in rats // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2022. V. 316. P. 113959.
- Berkhout R.P., Lambalk C.B., Huirne J. et al.* High-quality human preimplantation embryos actively influence endometrial stromal cell migration // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018. V. 35 № 4. P. 659–667.
- Bochev I., Belemezova K., Shterev A. et al.* Effect of cryopreservation on the properties of human endometrial stromal cells used in embryo co-culture systems // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016. V. 33. № 4. P. 473–480.
- Clercq K. De, Hennes A., Vriens J.* Isolation of mouse endometrial epithelial and stromal cells for *in vitro* decidualization // *J. Vis. Exp.* 2017. V. 2017. № 121. P. 1–10.
- Das A., Li Q., Laws M.J., Kaya H et al.* Estrogen-induced expression of Fos-related antigen 1 (FRA-1) regulates uterine stromal differentiation and remodeling // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 23. P. 19622–19630.
- Galvao J., Davis B., Tilley M. et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO // *The FASEB J.* 2014. V. 28. № 3. P. 1317–1330.
- Gregory T.R.* Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 2001. V. 76. № 1. P. 65–101.
- Grewal S., Carver J.G., Ridley A.J. et al.* Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. № 42. P. 16189–16194.
- Hisamatsu Y., Murata H., Tsubokura H. et al.* Matrix metalloproteinases in human decidualized endometrial stromal cells // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021. V. 43. № 3. P. 2111–2123.
- Huang J.R., Tseng L., Bischof P. et al.* Regulation of prolactin production by progestin, estrogen and relaxin in human endometrial stromal cells // *Endocrinology.* 1987. V. 121. P. 2011–2017.
- Irwin J.C., Kirk D., King R.J. et al.* Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an *in vitro* model for decidualization // *Fertil. Steril.* 1989. V. 52. № 5. P. 761–8.
- Izmailova L.S., Gaidamaka A.O., Serbina O.O. et al.* Effect of hormonal background on the expression of sex hormone receptors and the migration potential of mouse endometrial epithelial and stromal cells *in vitro* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. № 6. P. 401–413.
- Kariya M., Kanazaki H., Takakura K. et al.* Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991. V. 73. № 6. P. 1170–1174.
- Larsen E.C., Christiansen O.B., Kolte A.M. et al.* New insights into mechanisms behind miscarriage // *BMC medicine.* 2013. V. 11. P. 154.
- Macklon N.S., Brosens J.J.* The human endometrium as a sensor of embryo quality // *Biol. Reprod.* 2014. V. 91. № 4. P. 98.
- Makieva S., Giacomini E., Ottolina J. et al.* Inside the endometrial cell signaling subway: Mind the gap(s) // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 9. P. 2477.
- Massimiani M., Lacconi V., La Civita F. et al.* Molecular signaling regulating endometrium-blastocyst crosstalk // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. P. 23.
- Nakamoto T., Okada H., Nakajima T. et al.* Progesterone induces the fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 6. P. 1447–1455.
- Ojosnegros S., Seriola A., Godeau A.L. et al.* Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques // *Hum. Reprod. Update.* 2021. V. 27. № 3. P. 501–530.
- Okada H.* Rapid downregulation of CD63 transcription by progesterone in human endometrial stromal cells // *Mol. Hum. Reprod.* 1999. V. 5. № 6. P. 554–558.
- Ramathal C.Y., Bagchi I.C., Taylor R.N. et al.* Endometrial decidualization: of mice and men // *Semin. Reprod. Med.* 2010. V. 28. № 1. P. 17–26.
- Randolph J.F., Peegel H., Ansbacher R. et al.* *In vitro* induction of prolactin production and aromatase activity by gonadal steroids exclusively in the stroma of separated proliferative human endometrium // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990. V. 162. № 4. P. 1109–1114.
- Teklenburg G., Salker M., Molokhia M. et al.* Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 4. P. e10258.
- Whirledge S., Kisanga E.P., Taylor R.N. et al.* Pioneer factors FOXA1 and FOXA2 assist selective glucocorticoid receptor signaling in human endometrial cells // *Endocrinology.* 2017. V. 158. № 11. P. 4076–4092.
- Yang Q., Zhang X., Shi Y. et al.* Increased expression of NDRG3 in mouse uterus during embryo implantation and in mouse endometrial stromal cells during *in vitro* decidualization // *Reproductive Sciences.* 2017. V. 25. № 8. P. 1197–1207.
- Yu H.F., Yang Z.Q., Xu M.Y. et al.* Yap is essential for uterine decidualization through Rrm2/GSH/ROS pathway in response to Bmp2 // *Int. J. Biol. Sci.* 2022. V. 18. № 6. P. 2261–2276.
- Zhang S., Lin H., Kong S. et al.* Physiological and molecular determinants of embryo implantation // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 5. P. 939–980.
- Zhu H., Hou C.C., Luo L.F. et al.* Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions // *Gene.* 2014. V. 551. № 1. P. 1–14.

## Modelling of the Decidualization of Mouse Endometrial Stromal Cells with Subsequent Embryo Implantation *in vitro*

A. O. Gaidamaka<sup>1, \*</sup>, A. V. Muromtsev<sup>1</sup>, L. S. Izmailova<sup>1</sup>, G. A. Marchenko<sup>2</sup>, and E. A. Vorotelyak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Luminex corporation, Het Zuiderkruis, 1 's-Hertogenbosch, The Netherlands, 5215 MV*

*\*e-mail: stadtrand@yandex.ru*

The decidualization of stromal cells is a key step in acquiring endometrial receptivity to the embryo. This process is regulated by sex steroid hormones, and in the mouse is additionally induced by embryo attachment. There are many protocols for the induction decidualization of stroma *in vitro*, but most of them require verification of the compliance of the processes occurring in cell culture with those in a living organism. This work focuses on the morphology of stromal cells and the expression activity of genes responsible for the progression of decidualization in 2D culture with subsequent embryo attachment. The feasibility of using several variants of protocols for the induction of decidualization and the possibility of using stromal cells after cryopreservation were also investigated.

*Keywords:* endometrium, stroma, decidualization, implantation *in vitro*, sex steroid hormones