ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии

имени академика В.И. Кулакова Минздрава РФ,

Московская Гимназия на Юго-Западе №1543

Характеристика первичных культур мезенхимных стромальных клеток из эндометрия и очагов эндометриоза человека

А.Д. Малышева

П.С. Тимошина

Научный руководитель:

к.б.н. А.М. Савилова
зав. лаб. клеточных технологий

Москва 2015

Оглавление

1. Введение…….……3

2. Обзор литературы……4

2.1. Мезенхимные стволовые/стромальные клетки в эндометрии и очагах эндометриоза…….....4

2.2. Исследование пролиферативной активности ММСК в эндометрии и очагах эндометриоза……..….5

2.3. Маркеры пролиферации……...……..5

3. Материалы и методы…….…….7

3.1. Выделение, культивирование и характеристика ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза человека……..……7

3.2. Оценка пролиферации……...…...…..7

4. Результаты…….…...9

4.1. Выделение и культивирование клеточных культур из эндометрия и очагов эндометриоза…….……..9

4.2. Иммунофенотипирование ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза…….10

4.3. Проточная цитометрия……...…….…….10

4.4. Коэффициенты удвоения популяции…….……..……11

4.5. Оценка экспрессии генов, связанных с пролиферацией…….……12

5. Обсуждение…….……13

6. Выводы…….....…...14

7. Благодарности……...….....14

8. Список литературы……...14

9. Приложение……15

1. Введение

Эндометриоз – заболевание, при котором ткань, сходная по своему строению и функции с эндометрием, разрастается за пределами слизистой оболочки матки. Очаги эндометриоза находят во внутренних и наружных половых органах, легких, желудочно-кишечном тракте, глазных яблоках и т.д. (Дамиров и др., 2013).

Долгое время эндометриоз считался довольно редким заболеванием, и ему не уделялось должного внимания, однако за последние десятилетия частота заболеваемости заметно возросла (Адамян и др., 2006). Сейчас эндометриоз наблюдается как минимум у 10% женщин репродуктивного возраста (Rogers et al, 2009), а в России среди гинекологических патологий он занимает третье место (Адамян и др., 2006).

Таким образом, проблема эндометриоза стоит чрезвычайно остро. Точные причины заболевания до сих пор не выявлены, и достаточно эффективного метода лечения эндометриоза пока нет: частота рецидивов при современном гормональном и хирургическом лечении составляет 15-21% (Vercellini et al, 2009).

За регенерацию эндометрия, который ежемесячно отторгается, отвечают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), обладающие высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Ученые предполагают, что именно ММСК эндометрия обеспечивают рост эндометриоидной ткани (Gargett, Ye, 2012). Для разработки новых методов лечения эндометриоза важно понимать, чем различаются ММСК в эндометрии и эктопических местоположениях. Тогда можно будет создать такие лекарства, которые бы воздействовали на клетки в очагах эндометриоза, но не на клетки в эндометрии. Поэтому мы поставили цель: охарактеризовать и выявить сходства и различия первичных культур мезенхимных стромальных клеток из эндометрия и очагов эндометриоза.

Для достижения цели необходимо выполнить следующие задачи:

1. Выделить культуры мезенхимных стромальных клеток из эндометрия и очагов эндометриоза, полученных от пациентов после хирургической операции.
2. Культивировать клетки *in vitro* в специальной среде в течение четырех пассажей.
3. Провести исследование клеточного цикла ММСК в культурах методом проточной цитометрии.
4. Определить коэффициент удвоения популяций клеток на первом и четвертом пассажах.
5. Определить уровень экспрессии мРНК генов *ccnb1* и *cdc2*, связанных с пролиферацией, методом ПЦР в реальном времени (с обратной транскрипцией).
6. Определить и сравнить пролиферативную активность клеток из эндометрия и очагов эндометриоза на основе полученных результатов.
7. Сравнить полученные результаты с результатами других исследователей (Kao et al, 2011)

2. Обзор литературы

2.1. Мезенхимные стволовые/стромальные клетки в эндометрии и очагах эндометриоза

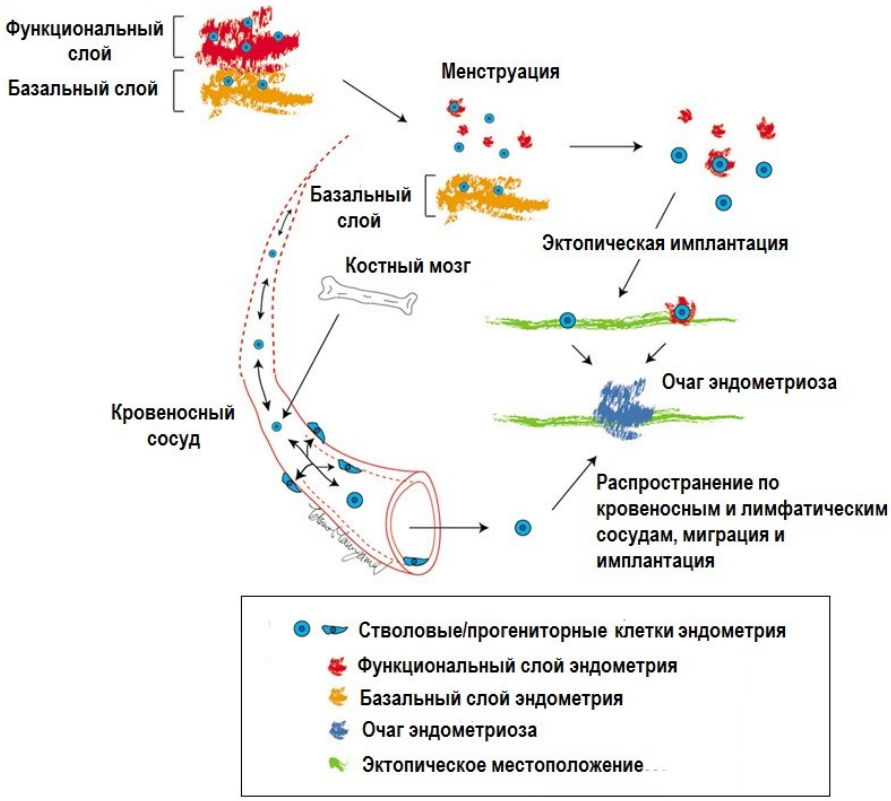
Одной из групп клеток, поддерживающих возобновление тканей организма, являются мезенхимные стволовые клетки (МСК), основным источником которых является костный мозг (Калинина и др., 2011). МСК сложно идентифицировать и анализировать непосредственно в тканях, поскольку специфические для них маркеры пока не найдены, и их исследуют при выделении из тканей популяций стромальных клеток, способных дифференцироваться *in vitro* в остео-, хондро- и адипогенном направлениях (Nombela-Arrieta et al, 2011). Однако эти клетки могут иметь различный пролиферативный и дифференцировочный потенциал и представляют собой гетерогенную популяцию (Morikawa et al., 2009). Чтобы отличать такие культивируемые клетки от МСК *in situ*, Международным обществом клеточной терапии (ISCT, Ванкувер, Канада) был предложен термин «мультипотентная мезенхимная стромальная клетка» (ММСК).

В 2006 году были определены минимальные критерии для ММСК: способность прикрепляться к пластику, экспрессия характерные поверхностных маркеров (CD90, CD105, CD73) и отсутствие экспрессии таких маркеров как CD34, CD45, HLA-DR, CD14, CD19, а также способность к направленной дифференцировке в мезодермальном направлении (адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировке) (Dominici et al, 2006).

Во многих исследованиях было показано, что ММСК способны к дифференцировке в другие типы клеток мезодермального, эктодермального и эндодермального происхождения, а не только в остео- , хондро- и адипогенном направлениях (Калинина и др., 2011). ММСК можно выделить из различных тканей и органов, в том числе и из эндометрия (Mosna et al, 2010), в котором МСК отвечают за ежемесячную регенерацию этой комплексной ткани.

Было высказано предположение, что за рост очагов эндометриоза также отвечают МСК (Gargett, Ye, 2012). Согласно одной из наиболее общепринятых гипотез о возникновении эндометриоза – гипотезы мультипотентных стволовых клеток, – МСК в результате ретроградной менструации с менструальной кровью попадают в брюшную полость, где образуют эндометриоидный очаг. Кроме того, высказана гипотеза о лимфогенной/гематогенной диссеминации, согласно которой МСК из базального слоя эндометрия и прогениторные клетки из костного мозга могут циркулировать по лимфатическим и кровеносным сосудам, дифференцируясь в эндометриоидную ткань в разных частях организма. (Maruyama, Yoshimura, 2012).

Рис. 1. Предполагаемая модель перемещения стволовых/прогениторых клеток из эндометрия и костного мозга с последующим формированием очага эндометриоза (из Maruyama et al, 2010, с изменениями).



Строение очагов эндометриоза сходно со строением нормального эндометрия, однако эндометриоидная ткань менее подвержена циклическим трансформациям и слабо реагирует на воздействие гормонов (Стрижаков, Давыдов, 1997).

2.2. Исследования пролиферативной активности ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза

Результаты исследований показывают, что пролиферативная активность ММСК из эндометриальной и эндометриоидной тканей различается.

Kao et al (2011) выделяли ММСК из эутопического и эктопического эндометрия, полученного в ходе операции от 22 пациенток, и исследовали клетки на втором-четвертом пассажах. Подсчитав коэффициент удвоения популяции, ученые выяснили, что пролиферативный потенциал клеток из очагов эндометриоза лишь незначительно выше, чем у клеток из эндометрия. Также у клеток эктопического эндометрия оказалась выше и способность к миграции и инвазии.

2.3. Маркеры пролиферации

Для анализа пролиферативной активности можно измерять уровень экспрессии генов, продукты которых непосредственно связаны с процессом деления клетки.

Сигнал к началу деления клетки дает фактор MPF (mitosis-promoting factor, maturation-promoting factor), представляющий собой циклин-киназный комплекс. MPF состоит из 2

субъединиц: регуляторной – циклина B1, который кодируется геном *ccnb1*, и каталитической - циклин-зависимой киназы CDK1 (CDC2), которая кодируется геном *cdc2* (https://en.wikipedia.org/wiki/Maturation_promoting_factor). MPF обладает фосфорилазной активностью и инициирует конденсацию хромосом, формирование веретена деления, распад ядерной оболочки и фрагментацию аппарата Гольджи (http://www.uniprot.org/uniprot/P06493#section_comments).

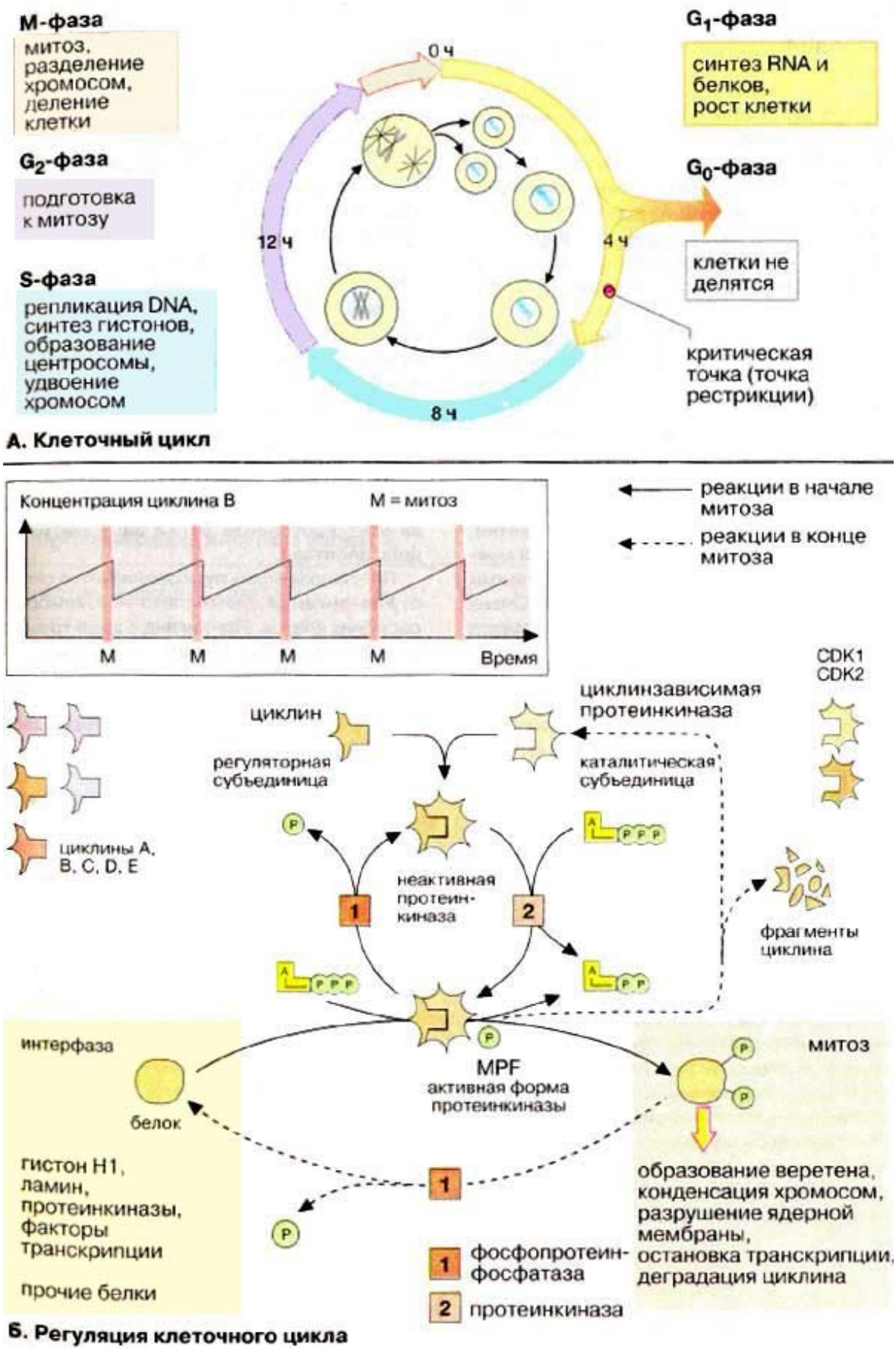


Рис. 2. Структура клеточного цикла и его регуляция (по http://www.ximia.org/biochem/380.html).

3. Материалы и методы

3.1. Выделение, культивирование и характеристика ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза человека

Выделение и культивирование ММСК

Образцы тканей эндометрия собирали в ходе хирургического выскабливания матки у пациенток, страдающих эндометриозом; образцы очагов эндометриоза были получены в ходе хирургического вмешательства. Всего в исследование был взят биоматериал от 4 пациенток, поступивших на лечение в ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России: от одной пациентки получили образцы и эндометриальной, и эндометриоидной ткани, от двух – образцы эндометрия, от одной – образцы очагов эндометриоза. Также лаборатория предоставила нам две культуры ММСК из очагов эндометриоза на 3 пассаже.

Для выделения первичной культуры ММСК мы измельчали ткань с помощью стерильных ножниц на фрагменты не больше 3 мм² и инкубировали в CO_2-инкубаторе (5% CO_2, с насыщенным водяным паром) при 37°С в культуральной среде DMEM/F12 в соотношении 1:1, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Когда достаточное количество клеток мигрировало из эксплантa, при смене среды фрагменты ткани удаляли. После получения первичной культуры мы проводили культивирование клеток в культуральных флаконах площадью 25 см² в культуральной среде того же состава до четвертого пассажа, пересевая по мере образования монослоя (обычно через каждые семь суток). Плотность посадки составляла $3x10^3$ клеток на 1 см². Для открепления клеток от субстрата при пересеве мы выдерживали культуру в 0,25% растворе трипсина-ЭДТА в течение 3 минут.

Иммунофенотипирование выделенных ММСК.

Сотрудниками лаборатории клеточных технологий было проведено иммунофенотипирование выделенных клеточных культур на первом пассаже по поверхностным маркёрам с помощью проточной цитофлуориметрии.

3.2. Оценка пролиферации

Мы использовали три метода оценки пролиферативной активности ММСК: исследование клеточного цикла методом проточной цитометрии, вычисление коэффициента удвоения популяции и оценку экспрессии генов, связанных с пролиферацией.

Проточная цитометрия

Анализ количества клеток в культуре, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, мы проводили методом проточной цитофлуориметрии. Клетки снимали на 1 и 4 пассажах с субстрата, выдерживая в растворе трипсина-ЭДТА в течение 3 минут. Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин, затем клетки фиксировали, добавив к осадку 500 мкл 70% ледяного раствора этанола и инкубируя в течение 1 часа в

темноте при 4°С. Фиксированные клетки промывали физиологическим раствором и центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин. Осадок выдерживали в 100 мкл раствора, содержащего 50 мкг/мл иодида пропидия (PI) и 25 мкг/мл РНКазы А в течение 15 минут, затем добавляли 200 мкл физиологического раствора и анализировали. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, USA). В результате были получены данные о доле клеток в каждой культуре, находящихся в определенной фазе клеточного цикла. Поскольку PI связывается с ДНК, определение стадии, в которой находится клетка, производится с помощью оценки интенсивности флуоресценции. Так, клетки, находящиеся в фазе G_2/M, содержат удвоенную ДНК и дают пик с наибольшей интенсивностью флуоресценции, клетки в фазе G_1 флуоресцируют в два раза менее интенсивно, а клетки в S фазе флуоресцируют с промежуточной интенсивностью. Пик с наименьшей интенсивностью флуоресценции дают апоптотические клетки, содержащие деградировавшую ДНК (Рылова, Буравкова, 2013).

Вычисление коэффициента удвоения популяции

Коэффициент удвоения популяции мы рассчитывали следующим образом. Через сутки после пересева и непосредственно перед следующим пересевом мы фотографировали пять точек, отмеченных на дне культуральных флаконов, на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония) (при увеличении x200) с использованием программного обеспечения NIS Elements. Также использовали фотографии клеток, имевшихся в базе данных лаборатории клеточных технологий. Затем мы подсчитывали количество клеток на каждой фотографии при помощи программы ImageJ и вычисляли коэффициент удвоения популяции для каждой из пяти точек по формуле:

$$PD = log_2(\frac{N}{N_0}),$$

где N_0 - количество клеток через сутки после пересева, а N – количество клеток непосредственно перед следующим пересевом. За коэффициент удвоения популяции мы принимали среднее арифметическое коэффициентов для всех пяти точек.

Оценка экспрессии генов, связанных с пролиферацией

Экспрессию мРНК генов *cdc2, ccnb1*, а также референсного гена *hprt1*, мы исследовали в образцах 1 и 4 пассажей ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза человека. РНК была выделена из клеток методом, основанном на реакции преципитации с последующей отмывкой, с помощью комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот «Проба-НК/Проба НК-плюс» (ДНК-технология, РФ). Анализ экспрессии генов проводили на кДНК, полученной в результате реакции обратной транскрипции, с использованием набора, содержащего полимеразу, буфер и dNTP (Евроген, РФ) на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология, РФ) методом ПЦР в реальном времени.

Для анализа экспрессии генов использовали показатель ΔCp, который рассчитывали по формуле:

$$\Delta Cp = Cp\ sample - Cp\ reference,$$

где Cp – значение порогового цикла; Cp sample – значение Cp исследуемого гена-мишени; Cp reference - значение Cp референсного гена *hprt1*.

Данные мы обрабатывали в программе R (R Development Core Team, 2004).

4. Результаты

4.1. Выделение и культивирование клеточных культур из эндометрия и очагов эндометриоза

Анализ морфологии клеток, выделяемых методом имплантов из эндометрия и очагов эндометриоза, показал относительную гомогенность популяционного состава, что подтверждается также результатами иммунофенотипирования по поверхностным маркёрам (не показаны). Культуры ММСК состояли преимущественно из вытянутых фибробластоподобных клеток размером от 60 мкм до 100 мкм, и на первом пассаже содержали незначительное количество (до 10%) полигональных клеток размером около 60 мкм (рис. 3). На четвертом пассаже клетки выглядели сходным образом, показывая еще большую степень гомогенности (рис. 4).

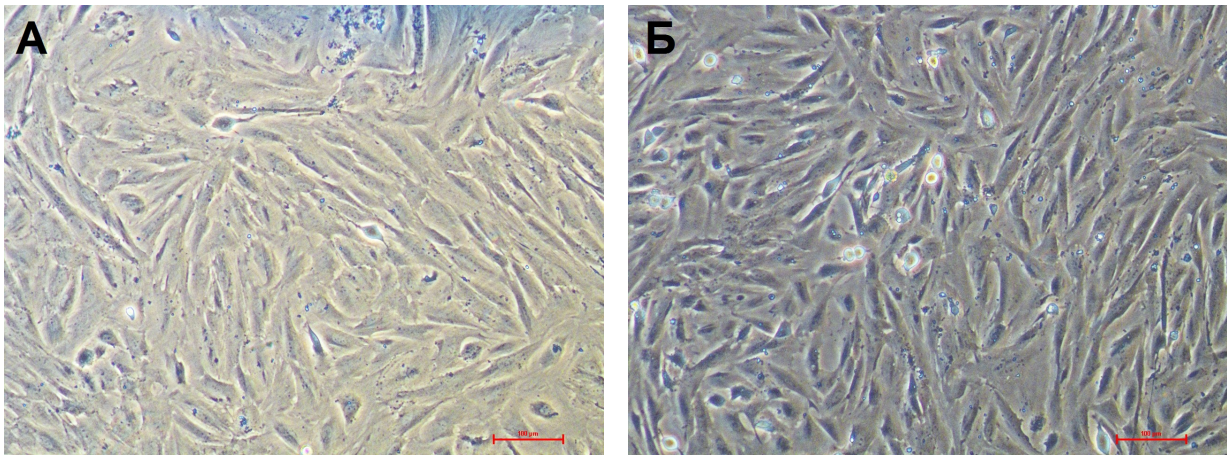


Рис. 3. Фенотип культур ММСК из эндометрия (А) и очагов эндометриоза (Б) на первом пассаже.

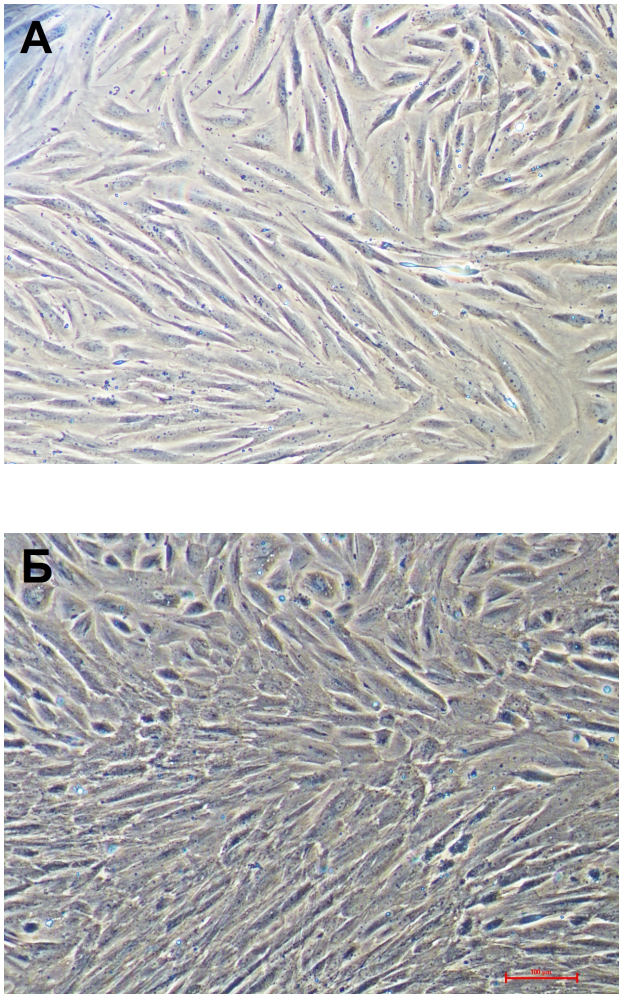


Рис. 4. Фенотип культур ММСК из эндометрия (А) и очагов эндометриоза (Б) на четвертом пассаже.

4.2. Иммунофенотипирование ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза

Было показано, что все выделенные культуры на высоком уровне экспрессируют характерные для ММСК поверхностные маркёры (CD90, CD105, CD73) и не экспрессируют такие маркеры как CD34, CD45, HLA-DR, CD14, CD19.

4.3. Проточная цитометрия

В ходе проведения проточной цитометрии с окрашиванием ММСК йодидом пропидия были получены следующие результаты (табл. 1, 2; рис. 7 – см. прилож.).

Табл. 1. Определение доли клеток в различных стадиях клеточного цикла для культур ММСК из очагов эндометриоза.

Пациент	Пассаж	Фаза клеточного цикла, доля клеток, %			
		Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Sed	1	0,64	82,67	6,17	10,64
	4	1,37	81,18	3,48	13,95
Vas	1	0,42	80,67	0,82	13,17

	4	5,44	77,58	3,38	10,72
Gon	4	21,94	65,12	4,32	8,71
Grig	4	36,98	44,63	6,79	11,68
Среднее	1	0,53	81,67	3,5	12,17
	4	16,43	67,13	4,49	11,27

Табл. 2. Определение доли клеток в различных стадиях клеточного цикла для культур ММСК из эндометрия.

Пациент	**Пассаж**	**Фаза клеточного цикла, доля клеток, %**			
		Sub-G1	**G0/G1**	**S**	**G2/M**
Sed	1	1,03	66,81	11,18	21,13
	4	0,63	85,51	4,16	9,44
Sm	1	7,40	60,03	1,61	17,62
	4	8	62,36	7,91	19,28
Kos	1	7,76	58,45	1,75	25,64
Среднее	1	5,4	61,85	4,85	21,46
	4	4,32	73,94	6,04	14,36

4.4. Коэффициенты удвоения популяции

Используя формулу для вычисления коэффициента удвоения популяции, были получены следующие результаты (табл. 3).

Табл. 3. Коэффициент удвоения популяции культур ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза.

Ткань	**Пациент**	**P1, PD ± SD**	**P4, PD ± SD**
Эндометриоз	Sed	3,32 ± 0,32	2,4 ± 0,13
	Dor*	2,52 ± 0,21	1,52 ± 0,42
	Vas	0,46 ± 0,21	0,59 ± 0,16
	In*	1,83 ± 0,08	-
	Ov*	2,29 ± 1,77	-
	Kiz*	3,47 ± 0,36	-
	Gon	-	0,88 ±0,15

	Grig	-	0,72 ± 0,55
	Fed*	-	4,96 ± 0,46
Эндометрий	Sed	3,58 ± 0,15	3,6 ± 0,31
	Dor*	3,37 ± 0,16	4,00 ± 0,08
	Sh*	3,39± 0,10	2,90 ± 0,53
	Smol*	2,97 ± 0,31	3,28 ± 0,29
	Sm	2,37 ± 0,40	-0,52 ± 0,13
	Kos	0,61 ± 0,09	-
	Tol*	3,34 ±0,17	-
	Mur*	-	4,42 ± 1,09
	Koc*	-	2,44 ± 0,53

Условные обозначения: PD – коэффициент удвоения популяции, SD – стандартное отклонение, P1 – 1 пассаж, P4 – 4 пассаж; * - данные получены на основе имеющихся в лаборатории клеточных технологий фотографий, “-“ – нет данных по пассажу.

Исследовав ММСК из образцов эндометрия и очагов эндометриоза, которые удалось довести и до 1, и до 4 пассажа (пациентки Sed, Dor, Vas, Sh, Smol, Sm), достоверных различий пролиферативной активности клеток между пассажами мы не выявили (парный тест Вилкоксона, p-value > 0,05).

При сравнении пролиферативной активности ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза как на первом пассаже, так и на четвертом, также не было выявлено достоверных различий (тест Вилкоксона, p-value > 0,05).

4.5. Оценка экспрессии генов, связанных с пролиферацией

Результаты ПЦР в реальном времени для определения уровня экспрессии генов *ccnb1* и *cdc2* представлены на рис. 5, 6. За значение ΔCp, представленное на графике, мы принимали среднее арифметическое ΔCp, полученных на основании трех повторностей.

Рис. 5. Результаты ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии мРНК гена *ccnb1* в культурах ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза.

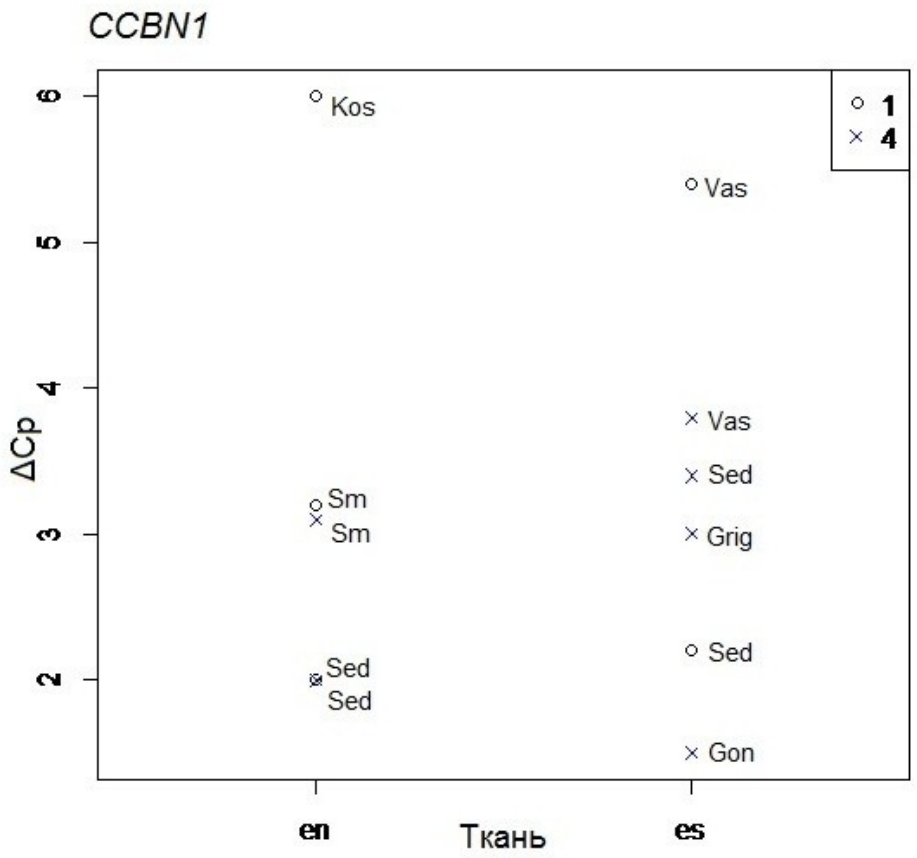
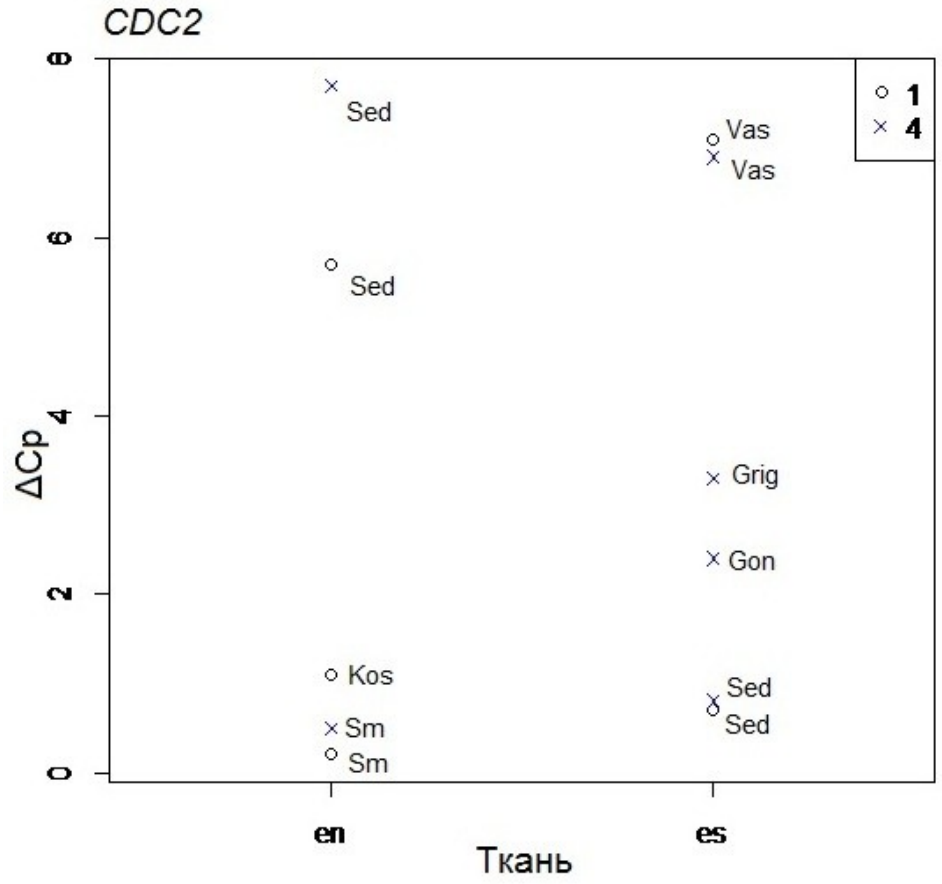


Рис. 6. Результаты ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии мРНК гена *cdc2* в культурах ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза.



Условные обозначения: en - эндометрий, es – эндометриоз, 1 – 1 пассаж, 4 – 4 пассаж.

5. Обсуждение

Согласно результатам проточной цитометрии (табл. 1 и 2) в культуре ММСК из эндометрия на 1 пассаже наблюдается большее число апоптотических клеток (sub-G1 фаза), чем в культуре ММСК из очагов эндометриоза. Однако на 4 пассаже в культуре ММСК из эндометриоза происходит резкое увеличение доли клеток в фазе sub-G1, что может говорить о снижении жизнеспособности ММСК из очагов эндометриоза в сравнении с ММСК из эндометрия при культивировании в течение нескольких пассажей.

В случае снижения жизнеспособности клеток из очагов эндометриоза мы ожидали увидеть снижение доли клеток, находящихся в фазе G2/M. На 1 пассаже доля делящихся клеток (в G2/M фазе) в культуре ММСК из эндометрия действительно выше, чем в культуре клеток из очагов эндометриоза, но на 4 пассаже она падает более значительно, чем доля делящихся ММСК из очагов эндометриоза. Такие результаты мы считаем результатом недостаточной выборки.

Также объём выборки не позволяет проанализировать данные по экспрессии генов, связанных с пролиферацией.

Анализ коэффициентов удвоения популяции не выявил достоверных различий как между культурами ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза. Однако возможно, что пролиферативная активность ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза действительно различается несущественно, как уже показано в работе Kao et al (2011).

Кроме того, важными факторами, влияющими на пролиферативную активность ММСК, могут являться индивидуальные особенности женщин, от которых был получен материал: возраст, гормональный фон, особенности течения эндометриоза, сопутствующие заболевания и т.д. Так, если в целом ММСК из очагов эндометриоза на 4 пассаже обладали довольно низким коэффициентом удвоения популяции, то у пациентки Fed он оказался самым высоким среди всех образцов. При этом только ММСК в культуре из эндометрия пациентки Sm имели отрицательный коэффициент, хотя у остальных он составил больше 2 (табл. 3). Результаты проточной цитометрии культур ММСК из очагов эндометриоза пациенток Gon и Grig показывают очень высокий процент апоптотических клеток, чего у других пациенток не наблюдается (табл. 1).

6. Выводы

В связи с малой выборкой достоверные различия пролиферативной активности культур ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза не выявлены.

7. Благодарности

Выражаем благодарность Сергею Менделевичу Глаголеву за организацию практики, нашему научному руководителю Анастасии Михайловне Савиловой и сотрудникам лаборатории Ирине Александровне Федоровой и Марине Николаевне Юшиной за помощь в исследовании.

8. Список литературы

1. *Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н.* Эндометриозы: рук-во для врачей. – 2-е изд. – М.: Медицина, 2006. – 416 с.
2. *Дамиров М.М., Олейникова О.Н., Майорова О.В.* Генитальный эндометриоз: взгляд практикующего врача. – М.: БИНОМ, 2013. – 150 с.
3. *Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А. и др.* Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta Naturae. – 2011. – Т.3, № 4 (11). – с. 32-39.
4. *Рылова Ю.В., Буравкова Л.Б.* Постоянное культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при пониженном содержании кислорода // Цитология. – 2013. – Т.55, №12. – с. 852-860.
5. *Стрижаков А.Н., Давыдов А.И.* Гистерорезектоскопия. – М.: Медицина, 1997.
6. *An-Pei Kao, Kai-Hung Wang, Chia-Cheng Chang et al*. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model // Fertil. Steril. – 2011. – Vol. 95, No. 4. – P. 1308-1315.
7. *Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy – 2006. – Vol.8, No 4. – P. 315-317.
8. *Gargett C.E., Ye L.* Endometrial reconstruction from stem cell // Fertil. Steril. – 2012. – Vol. 98. No. 1. – P. 11-17.
9. *Maruyama T., Yoshimura Y.* Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis // Bioscience. – 2012. – Vol. 4, No. 1. – P. 2754-2763.

10. *Maruyama T., Masuda H., Ono M., Kajitani T., Yoshimura Y.* Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology // Reproduction. – 2010. – Vol. 140, No. 1. – P. 11-22.

11. *Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y. et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 206, No. 11. – P. 2483-2496.

12. *Mosna F., Sensebe L., Krampera M.* Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide // Stem Cells Dev. – 2010. – Vol. 19, No.10. – P. 1449-1470.

13. *Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E.* The elusive nature and function of mesenchymal stem cells // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2011. – Vol. 12, No. 2. – P. 126-131.

14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. – Vienna: R Foundation for Statistical Computing [Electronic resource]. – 2013. – Режим доступа: http://www.R-project.org/.

15. *Rogers P.A., D'Hooghe T.M., Fazleabas A. et al.* Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop // Reprod. Sci. – 2009. – Vol. 16. No. 4. – P. 335-346.

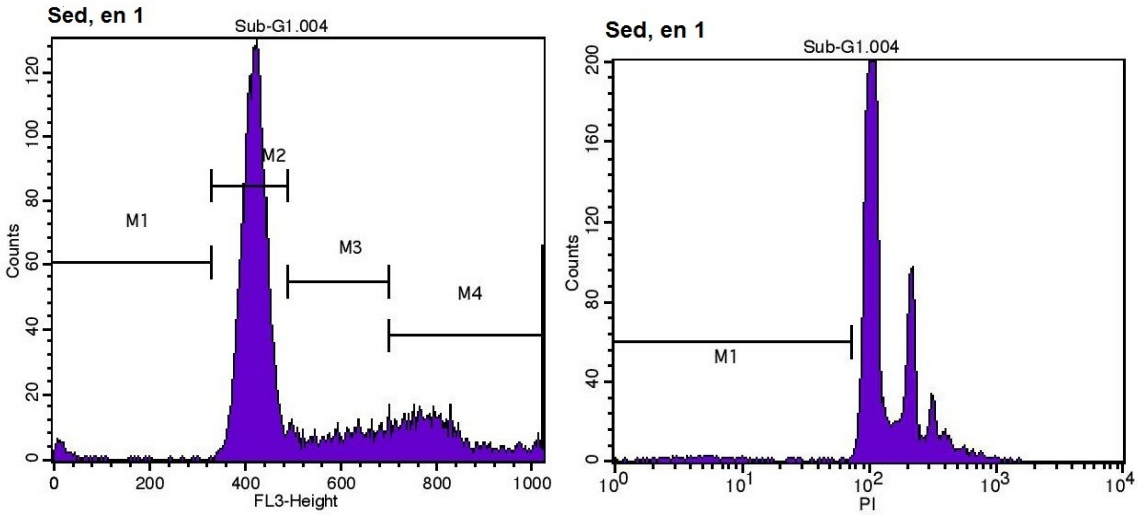
16. *Vercellini P., Crosignani P.G., Abbiati A. et al.* The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story // Hum. Reprod. Update. – 2009. – Vol. 15, No. 2. – P. 177-188.

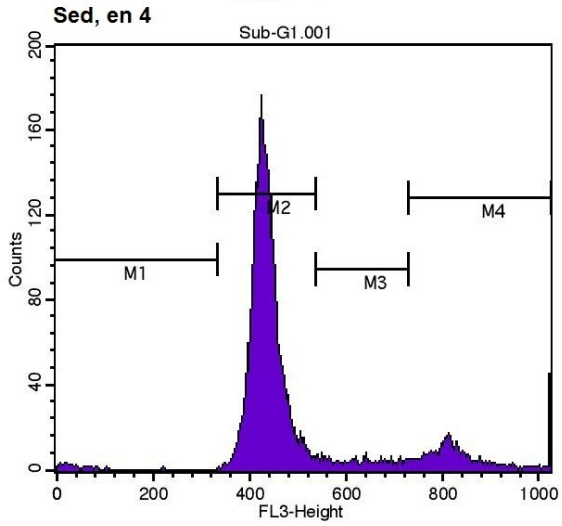
17. http://www.uniprot.org/uniprot/P06493#section_comments

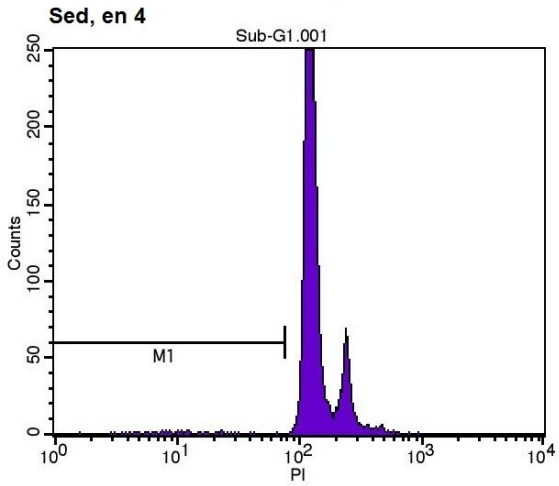
18. https://en.wikipedia.org/wiki/Maturation_promoting_factor

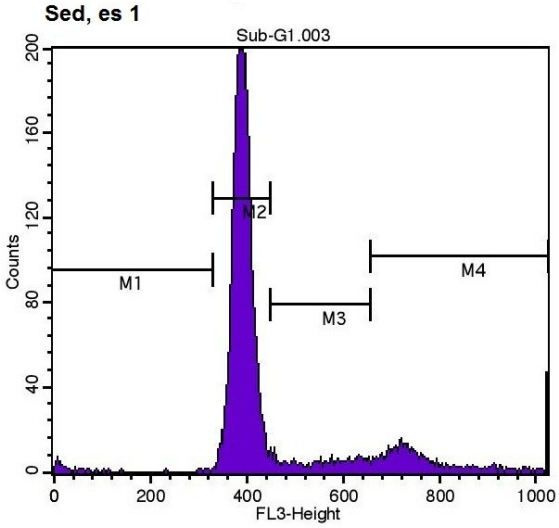
9. Приложение

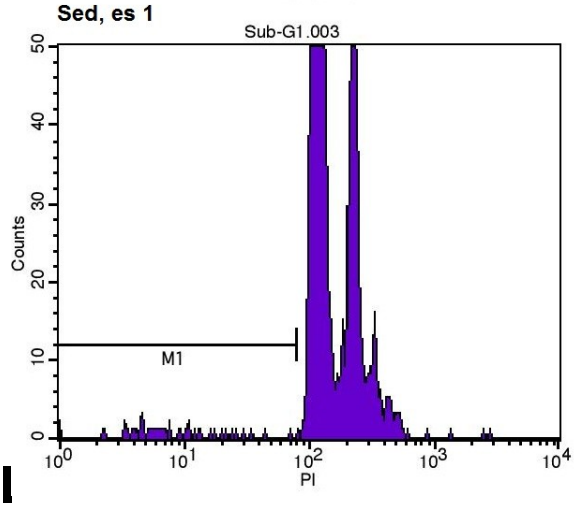
Рис. 7. Результаты проточной цитометрии для ММСК из эндометрия и очагов эндометриоза.

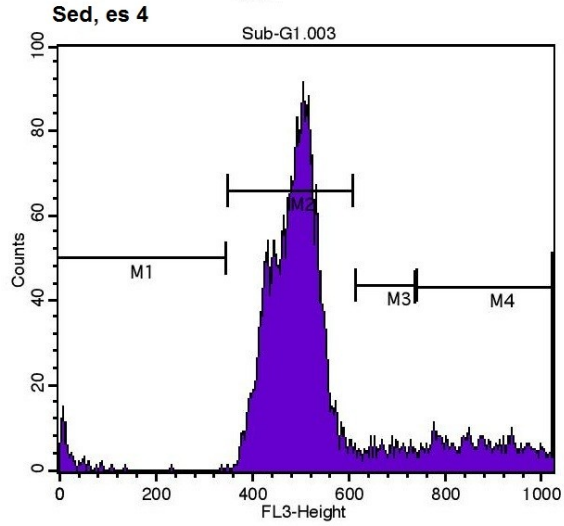


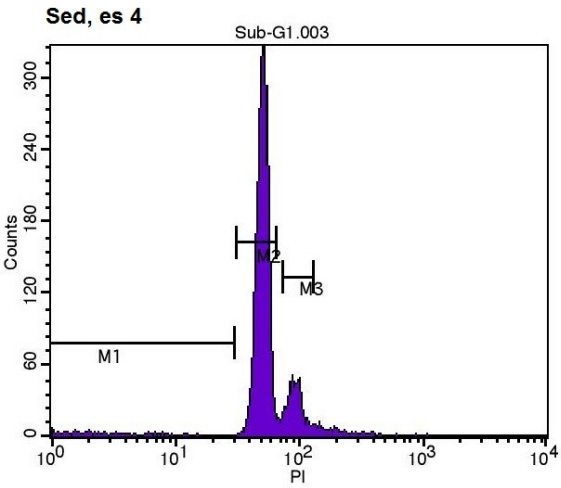

Sed, en 4
Sub-G1.001
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

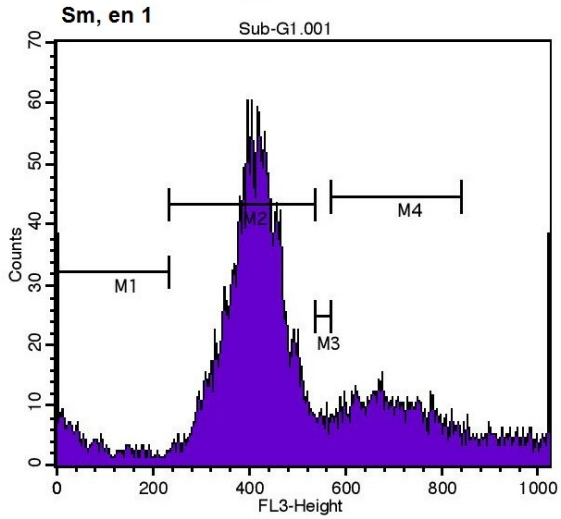

Sed, en 4
Sub-G1.001
Counts
PI
M1

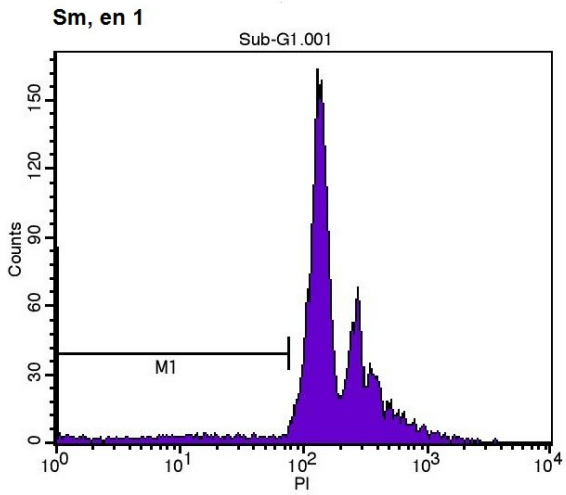

Sed, es 1
Sub-G1.003
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

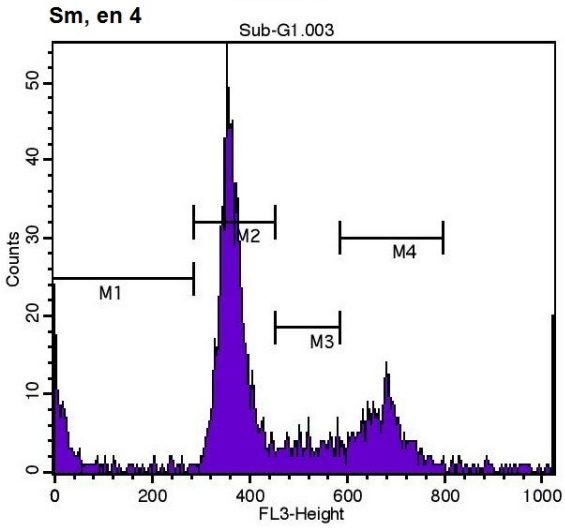

Sed, es 1
Sub-G1.003
Counts
PI
M1

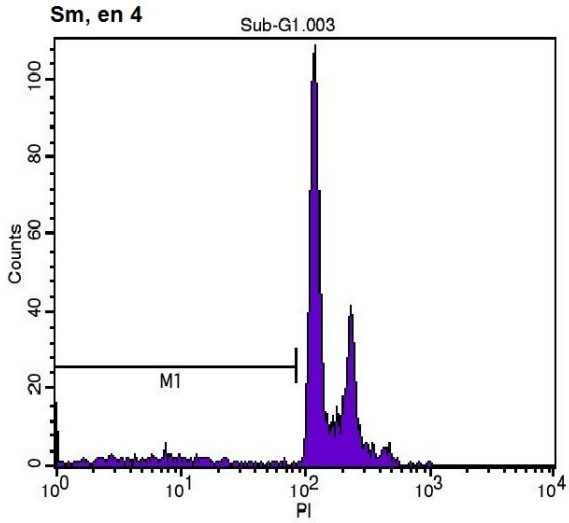

Sed, es 4
Sub-G1.003
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

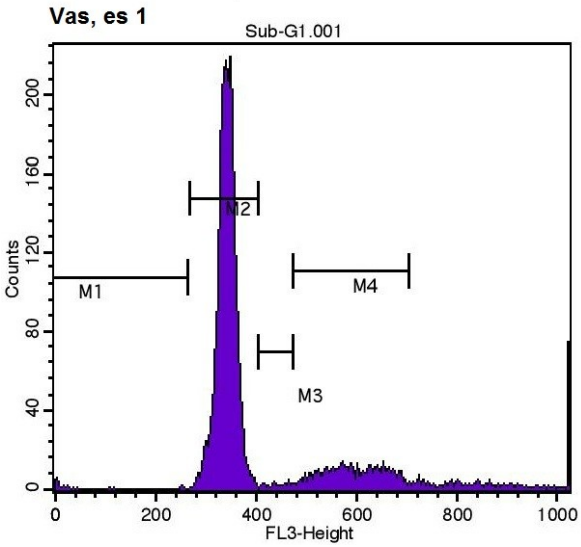

Sed, es 4
Sub-G1.003
Counts
PI
M1
M2
M3

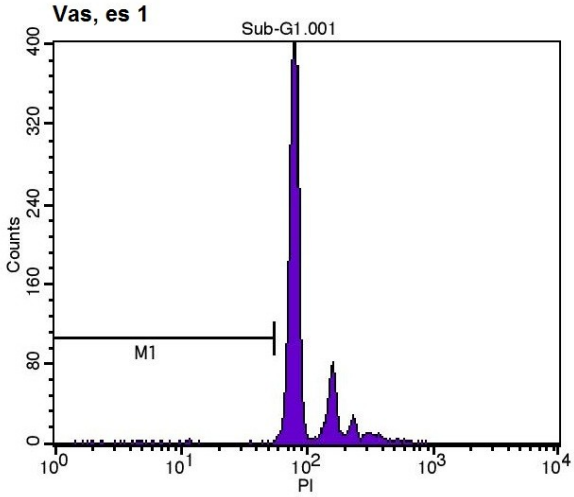

Sm, en 1
Sub-G1.001
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

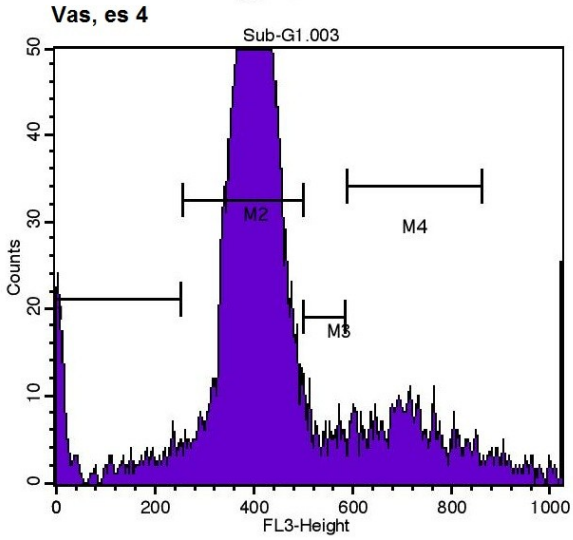

Sm, en 1
Sub-G1.001
Counts
PI
M1

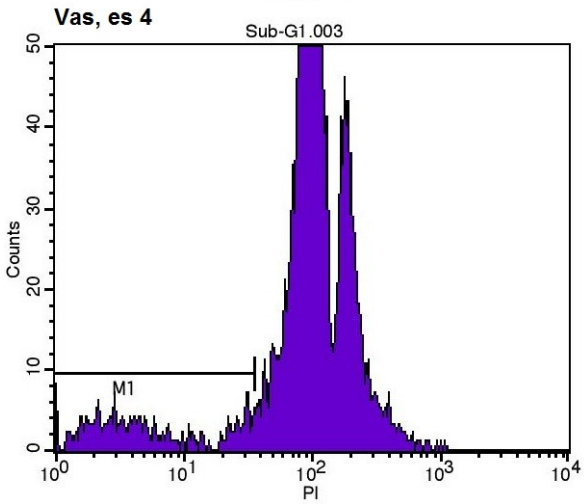

Sm, en 4
Sub-G1.003
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

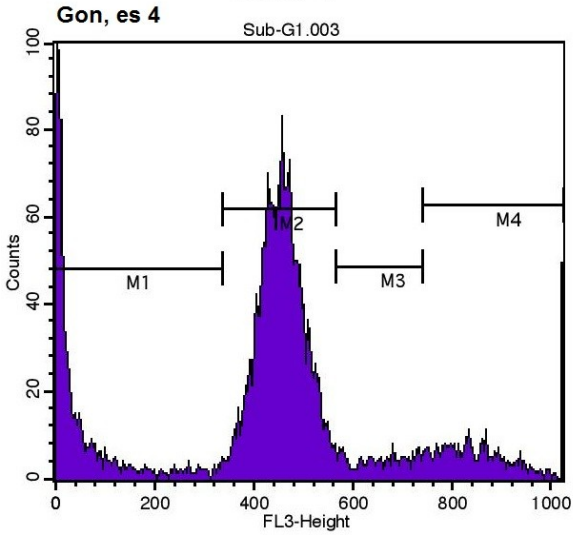

Sm, en 4
Sub-G1.003
Counts
PI
M1

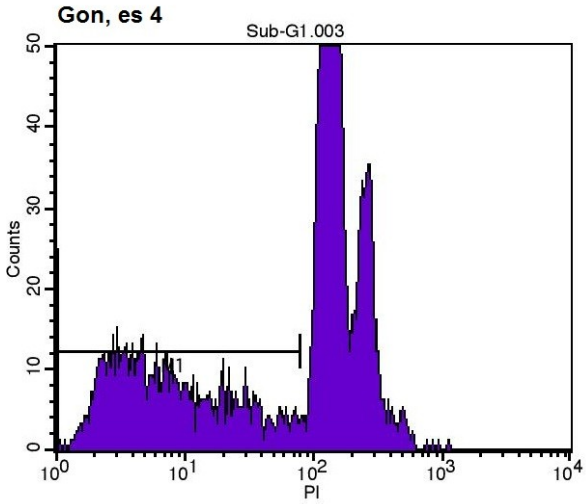

Vas, es 1
Sub-G1.001
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

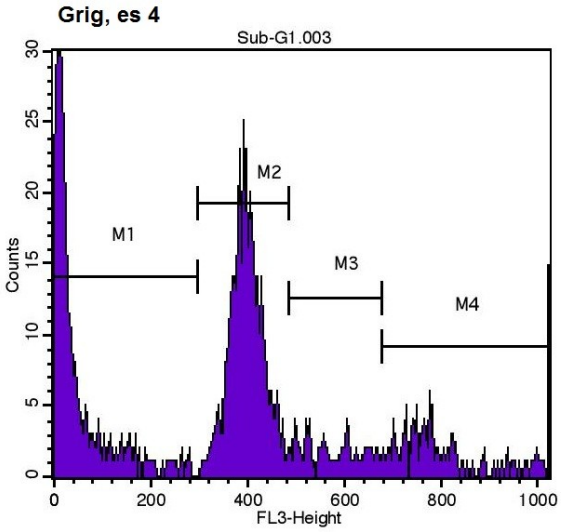

Vas, es 1
Sub-G1.001
Counts
PI
M1

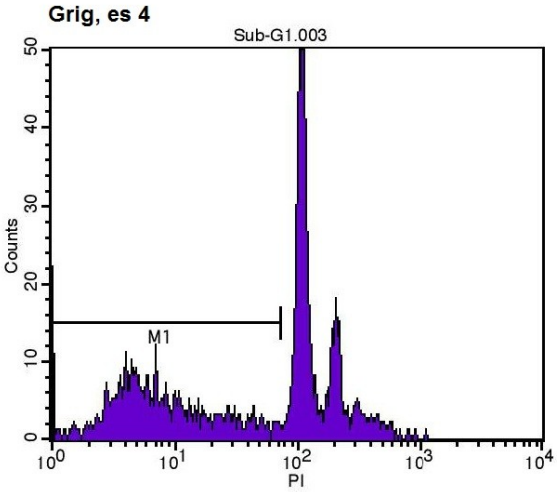

Vas, es 4
Sub-G1.003
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4

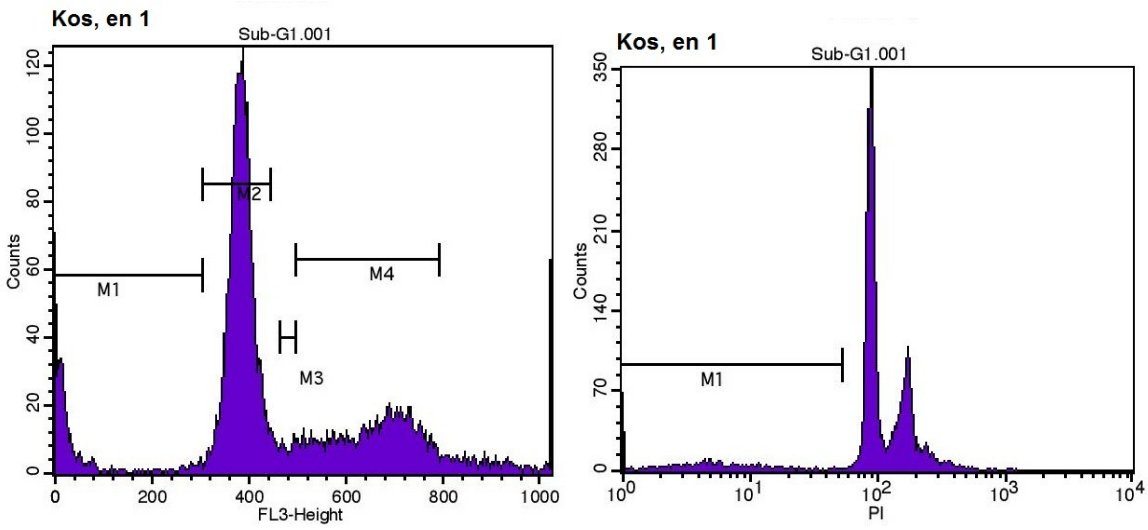

Vas, es 4
Sub-G1.003
Counts
PI
M1


Gon, es 4
Sub-G1.003
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4


Gon, es 4
Sub-G1.003
Counts
PI
M1


Grig, es 4
Sub-G1.003
Counts
FL3-Height
M1
M2
M3
M4


Grig, es 4
Sub-G1.003
Counts
PI
M1



Условные обозначения: en – эндометрий, es – эндометриоз, цифрами 1 и 4 обозначается пассаж, M1 – sub-G1 фаза, M2 – G0/1 фаза, M3 – S фаза, M4 – G2/M фаза.