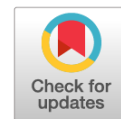


DOI: <https://doi.org/10.17816/aog697282>

EDN: EPVLWC

Пролиферативная активность и экспрессия эстрогеновых рецепторов в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации



Д.В. Иващенко¹, В.А. Мангушева¹, В.Ю. Сысоева¹, Р.Ю. Еремичев¹, Т.В. Никитина¹, Л.Н. Щербакова¹, П.И. Макаревич¹, Е.С. Младова², Н.И. Калинина¹, О.Б. Панина¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт репродуктивной медицины REMEDI, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. У пациенток с повторными неудачами имплантации основной акцент делается на нарушение рецептивности эндометрия, однако клеточные и рецепторные особенности эндометриальных мезенхимальных стромальных клеток в этой группе остаются практически не изученными, особенно на уровне пролиферативной активности и экспрессии эстрогеновых рецепторов. Настоящее исследование призвано охарактеризовать пролиферативную активность и экспрессию эстрогеновых рецепторов в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия у пациенток данной группы для выявления нового звена патогенеза бесплодия и потенциальных терапевтических мишеней.

Цель исследования. Изучить функциональные свойства мезенхимальных стромальных клеток эндометрия, в частности их пролиферативную активность и экспрессию эстрогеновых рецепторов, у пациенток с повторными неудачами имплантации зуплоидных эмбрионов.

Методы. В пилотное исследование включены 5 пациенток в возрасте 25–40 лет. Основную группу составили 4 пациентки с повторными неудачами имплантации. В качестве положительного контроля использован образец эндометрия суррогатной матери с шестью своевременными родами в анамнезе. Мезенхимальные стромальные клетки выделяли из биоптатов эндометрия, полученных путём аспирационной биопсии в первой фазе менструального цикла. Экспрессию гена *ESR1* определяли методом ПЦР в реальном времени, белок эстрогенового рецептора α (ER α) — иммуноцитохимически с флуоресцентными антителами. Пролиферативную активность мезенхимальных стромальных клеток оценивали в системе анализа живых клеток IncuCyte в контрольной среде и при добавлении 17 β -эстрадиола 0,1 нМ.

Результаты. Содержание мРНК эстрогенового рецептора *ESR1* в культивируемых мезенхимальных стромальных клетках эндометрия оказалось приблизительно в 10 раз выше по сравнению с мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани. Иммуноцитохимическое исследование выявило специфическую экспрессию ядерных ER α во всех образцах, при этом у пациенток с бесплодием неясного генеза количество рецепторов было снижено относительно контроля, а наименьший уровень экспрессии ER α обнаружен при трубно-перитонеальном бесплодии. Мезенхимальные стромальные клетки эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации продемонстрировали достоверно более низкую скорость пролиферации по сравнению с мезенхимальными стромальными клетками суррогатной матери. Наименьшая пролиферативная способность мезенхимальных стромальных клеток эндометрия обнаружена у пациенток с бесплодием неясного генеза. Добавление 17 β -эстрадиола вызвало статистически значимое увеличение скорости пролиферации мезенхимальных стромальных клеток эндометрия как у суррогатной матери, так и у пациенток с бесплодием неясного генеза. У пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием эстрадиол в концентрации 0,1 нМ не стимулировал пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток эндометрия.

Заключение. Впервые продемонстрировано снижение пролиферативной активности и экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER α) в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации. Полученные данные свидетельствуют о том, что мезенхимальные стромальные клетки пациенток с бесплодием неясного генеза сохраняют чувствительность к эстрогену, несмотря на снижение количества рецепторов. Результаты исследования расширяют фундаментальные представления о функциональных особенностях эндометриальных мезенхимальных стромальных клеток при повторных неудачах имплантации.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки эндометрия; бесплодие неясного генеза; повторные неудачи имплантации; эстрогеновый рецептор ER α .

Как цитировать:

Иващенко Д.В., Мангушева В.А., Сысоева В.Ю., Еремичев Р.Ю., Никитина Т.В., Щербакова Л.Н., Макаревич П.И., Младова Е.С., Калинина Н.И., Панина О.Б. Пролиферативная активность и экспрессия эстрогеновых рецепторов в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва. 2026. Т. 13, № 1. С. 48–58. DOI: 10.17816/aog697282 EDN: EPVLWC

Рукопись получена: 02.12.2025

Рукопись одобрена: 09.12.2025

Опубликована online: 28.02.2026

Proliferative Activity and Expression of Estrogen Receptors in Endometrial Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Repeated Implantation Failure

Dariya V. Ivashchenko¹, Veronika A. Mangusheva¹, Veronika Yu. Sysoeva¹, Roman Yu. Eremichev¹, Tatiana V. Nikitina¹, Liya N. Shcherbakova¹, Pavel I. Makarevich¹, Elena S. Mladova², Natalia I. Kalinina¹, Olga B. Panina¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

² Institute of Reproductive Medicine REMEDI, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Endometrial receptivity disorders are the primary focus in patients with repeated implantation failure. However, the cellular and receptor characteristics of endometrial mesenchymal stromal cells in this population remain poorly understood, especially in terms of proliferative activity and estrogen receptor expression. This work examined the proliferative activity and expression of estrogen receptors in endometrial mesenchymal stromal cells in these patients to identify a new pathogenetic link of infertility and potential therapeutic targets.

AIM: The work aimed to assess the functional characteristics of endometrial mesenchymal stromal cells, including their proliferative activity and estrogen receptor expression, in patients with repeated failure of euploid embryo implantation.

METHODS: This pilot study included five patients aged 25–40 years. The main group included four patients with repeated implantation failure. An endometrial sample from a surrogate mother with a history of six term births served as a positive control. Mesenchymal stromal cells were isolated from endometrial aspiration biopsy samples collected during the first phase of the menstrual cycle. *ESR1* expression was assessed by real-time polymerase chain reaction, and estrogen receptor alpha (ER α) levels were measured by fluorescent immunocytochemistry. The proliferative activity of mesenchymal stromal cells was assessed in the IncuCyte live-cell analysis system in a control medium and with 0.1 nM 17 β -estradiol.

RESULTS: *ESR1* mRNA levels in cultured endometrial mesenchymal stromal cells were approximately 10 times higher than in adipose tissue mesenchymal stromal cells. Immunocytochemistry revealed specific expression of nuclear ER α in all samples. Patients with unexplained infertility had fewer receptors than the control group, with the lowest ER α expression reported in patients with tubal-peritoneal infertility. Endometrial mesenchymal stromal cells from patients with repeated implantation failure had a significantly lower proliferation rate than mesenchymal stromal cells from a surrogate mother. Patients with unexplained infertility had the lowest proliferative capacity of endometrial mesenchymal stromal cells. Adding 17 β -estradiol significantly increased endometrial mesenchymal stromal cell proliferation in both the surrogate mother and patients with unexplained infertility. In patients with tubal-peritoneal infertility, 0.1 nM estradiol did not improve endometrial mesenchymal stromal cells proliferation.

CONCLUSION: This work is the first to demonstrate decreased proliferative activity and expression of estrogen receptors (ER α) in endometrial mesenchymal stromal cells in patients with repeated implantation failure. The findings indicate that mesenchymal stromal cells from patients with unexplained infertility remain sensitive to estrogen despite the reduced number of receptors. These data add to a better understanding of the functional characteristics of endometrial mesenchymal stromal cells in repeated implantation failure.

Keywords: endometrial mesenchymal stromal cells; unexplained infertility; repeated implantation failure; estrogen receptor ER α .

To cite this article:

Ivashchenko DV, Mangusheva VA, Sysoeva VYu, Eremichev RYu, Nikitina TV, Shcherbakova LN, Makarevich PI, Mladova ES, Kalinina NI, Panina OB. Proliferative Activity and Expression of Estrogen Receptors in Endometrial Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Repeated Implantation Failure. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology*. 2026;13(1):48–58. DOI: 10.17816/aog697282 EDN: EPVLWC

Received: 02.12.2025

Accepted: 09.12.2025

Published online: 28.02.2026

DOI: <https://doi.org/10.17816/aog697282>

EDN: EPVLWC

反复种植失败患者子宫内膜间充质基质细胞的增殖活性及雌激素受体表达

Dariya V. Ivashchenko¹, Veronika A. Mangusheva¹, Veronika Yu. Sysoeva¹, Roman Yu. Eremichev¹, Tatiana V. Nikitina¹, Liya N. Shcherbakova¹, Pavel I. Makarevich¹, Elena S. Mladova², Natalia I. Kalinina¹, Olga B. Panina¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

² Institute of Reproductive Medicine REMEDI, Moscow, Russia

摘要

论证。 在反复种植失败的患者中，主要关注点在于子宫内膜容受性的受损，然而该群体中子宫内膜间充质基质细胞的细胞和受体特征，特别是在增殖活性和雌激素受体表达水平上，仍基本未被研究。本研究旨在表征该组患者子宫内膜间充质基质细胞的增殖活性和雌激素受体表达，以揭示不孕症发病机制的新环节和潜在的治疗靶点。

目的。 研究反复整倍体胚胎种植失败患者子宫内膜间充质基质细胞的功能特性，特别是其增殖活性和雌激素受体表达。

方法。 初步研究纳入了5名25 - 40岁的女性患者。主要组由4名反复种植失败的患者组成。阳性对照采用一名有6次足月产史的代孕母亲的子宫内膜样本。间充质基质细胞分离自月经周期第一阶段通过抽吸活检获取的子宫内膜活检组织。ESR1基因表达采用实时定量PCR法检测，雌激素受体 α (ER α)蛋白采用荧光抗体免疫细胞化学法检测。在对照培养基及添加0.1 NM 17B-雌二醇的条件下，利用INCUCYTE活细胞分析系统评估间充质基质细胞的增殖活性。

结果。 培养的子宫内膜间充质基质细胞中雌激素受体 ESR1 mRNA 的含量约为脂肪组织间充质基质细胞的 10 倍。免疫细胞化学研究显示，所有样本中均存在核 ER α 的特异性表达，其中不明原因不孕症患者的受体数量较对照组有所减少，而在输卵管腹膜性不孕症患者中发现 ER α 的表达水平最低。反复着床失败患者的子宫内膜间充质基质细胞增殖速率显著低于代孕母亲的间充质基质细胞。在不明原因不孕症患者中发现子宫内膜间充质基质细胞的增殖能力最低。添加 17B-雌二醇使代孕母亲和不明原因不孕症患者的子宫内膜间充质基质细胞增殖速率均出现统计学显著增加。在输卵管腹膜性不孕症患者中，浓度为 0.1 NM 的雌二醇未能刺激子宫内膜间充质基质细胞的增殖。

结论。 首次证实了反复种植失败患者子宫内膜间充质基质细胞中增殖活性和雌激素受体 (ER α) 表达的降低。所得数据表明，尽管受体数量减少，不明原因不孕症患者的间充质基质细胞仍保持对雌激素的敏感性。研究结果扩展了关于反复着床失败中子宫内膜间充质基质细胞功能特征的基础认识。

关键词： 子宫内膜间充质干细胞，不明原因不孕，反复种植失败，雌激素受体 ER α 。

引用本文：

Ivashchenko DV, Mangusheva VA, Sysoeva VYu, Eremichev RYu, Nikitina TV, Shcherbakova LN, Makarevich PI, Mladova ES, Kalinina NI, Panina OB. 反复种植失败患者子宫内膜间充质基质细胞的增殖活性及雌激素受体表达. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology*. 2026;13(1):48–58. DOI: 10.17816/aog697282 EDN: EPVLWC

收到: 02.12.2025

接受: 09.12.2025

发布日期: 28.02.2026

ОБОСНОВАНИЕ

Современные вспомогательные репродуктивные технологии заметно улучшили шансы на беременность у пар с различными формами бесплодия. Однако, по мировым данным, эффективность экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не превышает 45–60%. Решающим фактором успешной имплантации генетически здорового эмбриона является адекватная восприимчивость эндометрия, которая зависит от сложной регуляции на клеточном и молекулярном уровнях. Особую роль в этих процессах играют мезенхимные стромальные клетки (МСК) эндометрия. Эти клетки располагаются периваскулярно как в базальном, как и в функциональном слоях эндометрия [1]. Известно, что эндометрий является уникальной тканью организма, заживление которого происходит без формирования рубца. Отсутствие рубцевания при заживлении эндометрия связано с тканеспецифическими особенностями его стромальных клеток или их микроокружения [2]. МСК эндометрия участвуют в регуляции не только циклических изменений, но и в поддержании гомеостаза микроокружения, включая взаимодействия с эндотелиальными клетками и иммунокомпетентными структурами.

Нарушения в функциональном состоянии МСК, в том числе снижение их пролиферативной активности и рецепторной функции, могут быть связаны с развитием различных патологий, таких как миома матки [3], эндометриоз [4], синдром Ашермана [5] и пролиферативные заболевания эндометрия [6, 7]. Несмотря на значительный интерес к изучению МСК эндометрия, данные о специфических изменениях их пролиферативной активности и уровне экспрессии эстрогеновых рецепторов у пациенток с повторными неудачами имплантации остаются ограниченными. Дальнейшее изучение этих аспектов может значительно расширить понимание патогенеза бесплодия и способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на восстановление нормальной функции эндометриальных МСК и повышение эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Цель исследования

Изучить функциональные свойства МСК эндометрия, в частности их пролиферативную активность и экспрессию эстрогеновых рецепторов, у пациенток с повторными неудачами имплантации зуплоидных эмбрионов.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Пилотное лабораторное *in vitro* исследование с параллельными контролями; оценка экспрессии *ESR1/ERA* и пролиферативной активности МСК эндометрия при экспозиции эстрадиолом с динамическим наблюдением.

Условия проведения исследования

Исследование проводили с октября 2024 по июнь 2025 г. на базе лаборатории морфогенеза и репарации тканей МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова и института репродуктивной медицины REMEDI. Все стадии исследования соответствуют законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам (принципам Хельсинкской декларации) и нормативным документам, а также одобрены этическим комитетом Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (протокол № 9/24 от 25.11.2024). От всех пациенток, ставших участниками исследования, получено информированное согласие.

Критерии соответствия (отбора)

В исследовании участвовали женщины в возрасте от 25 до 40 лет с повторными неудачами имплантации зуплоидных эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Критерии исключения: возраст старше 40 лет, ожирение 3-й степени, курение, наличие тяжёлых сопутствующих заболеваний, острый инфекционный процесс.

Клиническая характеристика пациенток

В ходе пилотного исследования были изучены МСК, выделенные из эндометрия пяти пациенток в возрасте от 25 до 40 лет. В качестве положительного контроля использован образец эндометрия пациентки, у которой в анамнезе 6 своевременных родов, двое из которых в качестве суррогатной матери (образец № 8). Основную группу составили четыре пациентки с повторными неудачами имплантации (два и более неэффективных переноса зуплоидного эмбриона после проведения преимплантационного генетического тестирования). Из четырёх пациенток основной группы у двух ЭКО проводилось в связи с подтверждённым трубно-перитонеальным бесплодием, у двух — в связи с бесплодием неясного генеза. Клиническая характеристика пациенток представлена в табл. 1. Переносы эмбрионов выполняли как в естественном, так и стимулированном циклах, толщина эндометрия на момент переноса у всех пациенток была более 8,5 мм.

Статистические процедуры

Для статистического анализа использовали программное обеспечение GraphPad Prism. Нормальность оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух групп из нормально распределённой совокупности использовали *t*-тест, из ненормально распределённой совокупности — критерий Манна–Уитни. Для сравнения нескольких групп из нормально распределённой совокупности использовали дисперсионный анализ (ANOVA), если не указано иное. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений. Значение $p < 0,05$ считалось достаточным для отклонения нулевой гипотезы.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациенток

Id пациента	Возраст, лет	Индекс массы тела, кг/м ²	Причина проведения ЭКО	Количество неэффективных переносов эмбриона
№ 4	39	26	Бесплодие неясного генеза	5
№ 5	33	25	Трубно-перитонеальное бесплодие	3
№ 6	39	30	Трубно-перитонеальное бесплодие	2
№ 7	37	21	Бесплодие неясного генеза	3
№ 8	39	20	Суррогатная мать	–

Выделение мезенхимных стромальных клеток из эндометрия

Образцы эндометрия были получены в амбулаторных условиях путём аспирационной биопсии эндометрия зондом Pipelle® в первой фазе менструального цикла в институте репродуктивной медицины REMEDI на основании соглашения о научном сотрудничестве между организациями (договор о научном сотрудничестве).

Образец эндометриальной ткани помещали в раствор коллагеназы 1-го типа (200 ед/мл) и диспазы (Worthington, США), инкубировали в течение 30 мин при 37 °С и затем центрифугировали 10 мин при 200g. Полученные фрагменты ткани помещали в среду культивирования недифференцированных МСК AdvanceSTEM (Basal Medium for Undifferentiated Mesenchymal Human Stem Cells, HyClone, Cytiva, США) с 10% добавлением ростовых добавок (Stem Cell Growth Supplement, HyClone, Cytiva, США) и раствором антибиотика/антимикотика (Antibiotic/Antimycotic Solution, HyClone, Cytiva, США). Клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37 °С и 5% CO₂. Смену среды проводили каждые 3–4 дня. Клетки пассировали при достижении ≈90% конфлюэнтного монослоя. Все эксперименты с клетками выполняли на 5–7-м пассажах.

Иммуноцитохимическое исследование мезенхимных стромальных клеток, выделенных из эндометрия на эстрогеновый рецептор α (ERα)

МСК эндометрия 4–5-го пассажа культивировали на покровных стёклах до достижения монослоя, затем фиксировали в 4% свежеприготовленном растворе формальдегида на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, трижды промывали в буфере PBS, пермеабилizировали 10 мин в 0,3% растворе Triton X-100 на PBS, трижды промывали в буфере PBS и окрашивали первыми антителами против рецептора эстрогена человека rabbit anti-human ERα antibody (13258S; Cell Signaling Technology, США) в разведении 1:100. В качестве контроля использовали неиммунные антитела rabbit IgG (Invitrogen, США). Для визуализации использовали вторые антитела goat anti-rabbit 1:500 (Cat # A-11008, Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Ядра докрашивали раствором DAPI (Sigma–Aldrich). Препараты заключали

в Aqua-Poly/Mount (Polysciences, США). Препараты анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000B, оснащённого цифровой камерой DFC7000T (Leica Microsystems, Inc., Германия). Результаты для статистического анализа представляли в виде процента ядер со специфической окраской антителами относительно количества клеток в поле зрения.

Анализ экспрессии гена эстрогенового рецептора ESR1 в мезенхимных стромальных клетках, выделенных из эндометрия

Для определения экспрессии ESR1 использовали метод ПЦР реального времени. Монослой клеток лизировали в реагенте для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, РФ). РНК выделяли в соответствии с протоколом производителя.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора обратной транскриптазы Magnus (Кат. ## SK006S, SK006M, Евроген, РФ).

Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческого реактива qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, РФ) на амплификаторе Bio-Rad Real-Time CFX96 Touch (BioRad, США). Использовали готовые коммерческие праймеры pr101-esr1-r1 GGATCTCTAGCCAGGCACATTC (Евроген, РФ) и Nr100-Esr1-f1 GCTTACTGACCAACCTGGCAGA (Евроген, РФ).

В качестве отрицательного контроля использовали МСК жировой ткани условно здорового донора из коллекции банка депозитария живых систем (<https://human.depo.msu.ru/>). Для анализа полученных результатов рассматривали кратность измерения (fold change) в экспрессии ESR1 между МСК, выделенными из эндометрия, и МСК жировой ткани.

Анализ скорости пролиферации мезенхимных стромальных клеток эндометрия

МСК, выделенные из эндометрия, переносили в 24-луночный планшет в низкой, средней и высокой концентрациях (60×10³ кл/мл, 120×10³ кл/мл или 240×10³ кл/мл) для подбора оптимальных условий эксперимента. Для контроля в лунку наливали среду культивирования, в экспериментальные лунки добавляли эстрадиол-17β 0,1 нМ. Планшеты помещали в систему анализа живых клеток IncuCyte Zoom (Sartorius, Германия). Для анализа скорости пролиферации состояние МСК регистрировали каждый час

в четырёх полях зрения в каждой лунке. Проллиферацию клеток определяли как среднее процентное соотношение покрытой клетками площади ко всей площади на фазовых изображениях и анализировали с помощью программного обеспечения IncuCyte (Sartorius, Германия). Проводили два независимых повтора каждого эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия эстрогенового рецептора *ESR1* в культивируемых мезенхимных стромальных клетках

Содержание мРНК эстрогенового рецептора *ESR1* в культивируемых на 2–3-м пассажах МСК, выделенных из эндометрия, по описанной выше методике оказалось примерно в 10 раз выше по сравнению с МСК, выделенными из жировой ткани, который принимали за единицу (рис. 1).

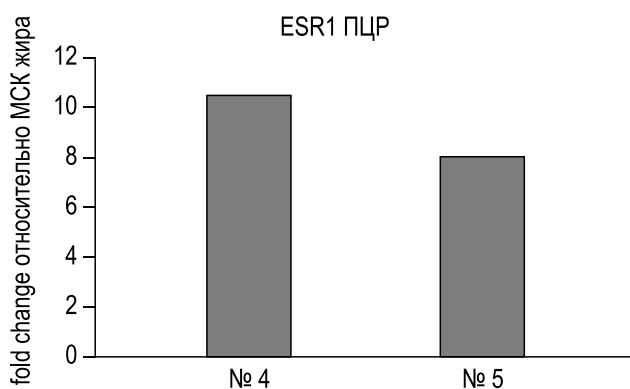


Рис. 1. Значения кратности измерения (fold change) в экспрессии *ESR1* мезенхимальных стромальных клеток (МСК), выделенных из эндометрия пациенток № 4 (бесплодие неясного генеза) и № 5 (с трубно-перитонеальным бесплодием), по сравнению с отрицательным контролем (МСК, выделенными из жировой ткани).

Имуноцитохимическое выявление экспрессии рецептора эстрогена α (ER α) в культивируемых мезенхимных стромальных клетках

Ген *ESR1* кодирует белок ER α , который является ядерным фактором транскрипции. При связывании с эстрогеном этот рецептор активирует или подавляет экспрессию определённых генов, участвующих в пролиферации эндометрия. Выявленный нами высокий уровень транскрипта *ESR1* в МСК эндометрия, по данным литературы, может не всегда соответствовать содержанию белка рецептора эстрогена α (ER α). Для оценки количества эстрогеновых рецепторов ER α в МСК эндометрия проводили также его иммуноцитохимическое выявление антителами. Мы наблюдали специфическую окраску антителами в образцах всех пациенток, что подтверждает экспрессию ядерных эстрогеновых рецепторов ER α в МСК, выделенных из эндометрия (рис. 2).

Обработка изображений с подсчётом процента специфически окрашенных ядер на случайных полях зрения показала, что в МСК пациенток с бесплодием неясного генеза определяется меньшее количество экспрессируемых рецепторов ER α относительно МСК здорового эндометрия (суррогатная мать). При этом самый низкий уровень экспрессии ER α выявлен при трубно-перитонеальном бесплодии (рис. 3).

В литературе представлены противоречивые данные об экспрессии гена *ESR1* и присутствия ER α в МСК эндометрия. Некоторые авторы утверждают, что МСК эндометрия не экспрессируют ген *ESR1* [8], другие, напротив, обнаружили его высокую экспрессию [9]. Исследования 2008 г. показали, что в ткани эндометрия только дифференцированные клетки обладают рецепторами стероидных гормонов [10]. Более поздние исследования указывают, что в МСК эндометрия экспрессированы обе изоформы рецептора эстрогена (ER α и ER β) и рецептор эстрогена,

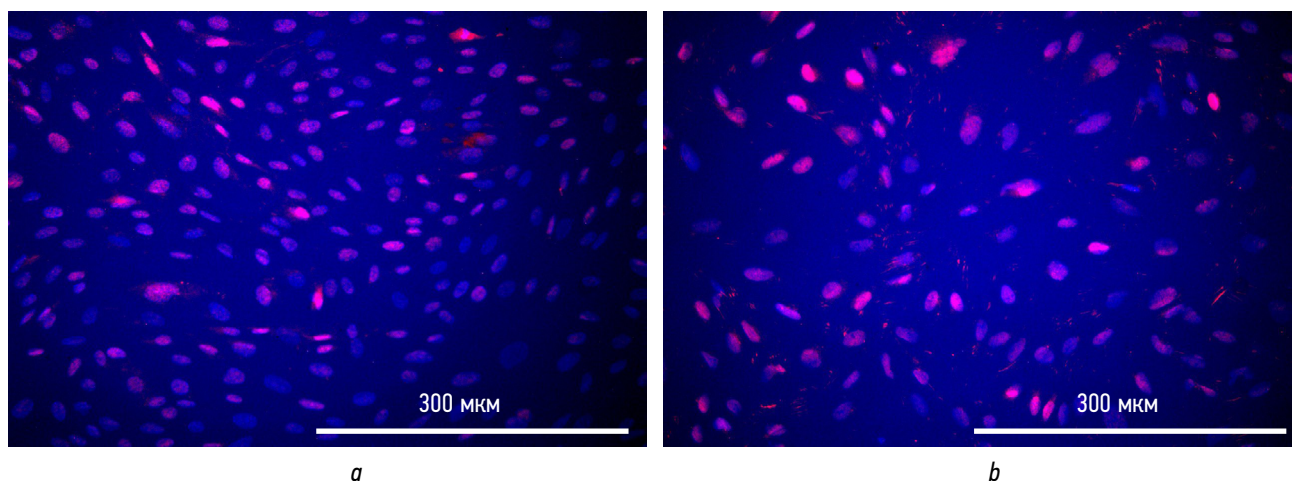


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное выявление ядерного рецептора ER α (красное окрашивание) в мезенхимальных стромальных клетках, выделенных из эндометрия; ядра клеток докрасены красителем DAPI; масштабный отрезок 300 мкм: *a* — образец № 4 (неясный генез бесплодия); *b* — образец № 8 (суррогатная мать).

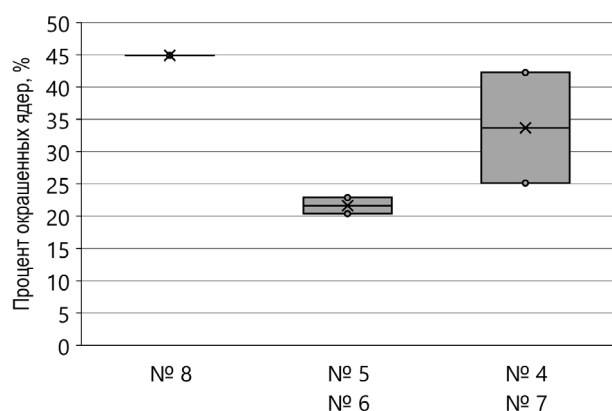


Рис. 3. Сравнение количества клеточных ядер с эстрогеновыми рецепторами ER α , определённых методом иммуноцитохимии с флуоресцентными антителами, в материалах № 8 (суррогатная мать), № 5 и 6 (трубно-перитонеальный фактора бесплодия), № 4 и 7 (неясный генез бесплодия).

связанный с G-белком 1 (GPER) [11, 12]. При этом в литературе отсутствуют данные по изучению мРНК эстрогенового рецептора *ESR1* и количеству ядерных эстрогеновых рецепторов ER α в МСК, выделенных из эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации.

Оценка пролиферации мезенхимных стромальных клеток эндометрия в контрольной среде и при культивировании с 17 β -эстрадиолом

Для оценки скорости пролиферации МСК использовали систему анализа живых клеток IncuCyte, фиксируя динамику изменения конфлюэнтности — показателя, отражающего долю площади культуральной

поверхности, покрытой клетками. Следует учитывать, что метрика конфлюэнтности чувствительна к степени расплывания: при одинаковой концентрации клетки разных пациентов могут занимать разную площадь. Для получения оптимальных данных по конфлюэнтности оценку пролиферации МСК эндометрия отслеживали в реальном времени при трёх стартовых плотностях посева: 60×10^3 , 120×10^3 и 240×10^3 кл/мл. Результаты представлены в виде средней конфлюэнтности МСК эндометрия с четырёх полей зрения с интервалом съёмки в 1 ч (рис. 4). По представленным графикам можно судить о пролиферативной активности клеток в тот или иной момент времени.

Самой большой скоростью пролиферации *in vitro* на стадии роста обладали МСК, выделенные из эндометрия суррогатной матери (положительный контроль). Уже через 40 ч после начала инкубации клетки образовывали конфлюэнтный монослой.

В соответствии с нашей гипотезой МСК эндометрия фертильной пациентки с сохранённой способностью к имплантации будут демонстрировать высокую скорость пролиферации как один из показателей функциональности эндометрия. МСК, выделенные из эндометрия пациенток с бесплодием, характеризовались меньшей скоростью пролиферации *in vitro* (см. рис. 4, красные кривые). Наименьшая способность к формированию монослоя выявлена у пациенток с бесплодием неясного генеза (см. рис. 4, синие кривые), при этом МСК эндометрия одного из образцов данной группы так и не сформировали монослой даже через 80 ч после начала эксперимента. Достоверная статистически значимая разница в скорости пролиферации МСК пациенток с повторными неудачами имплантации в сравнении с МСК суррогатной матери была

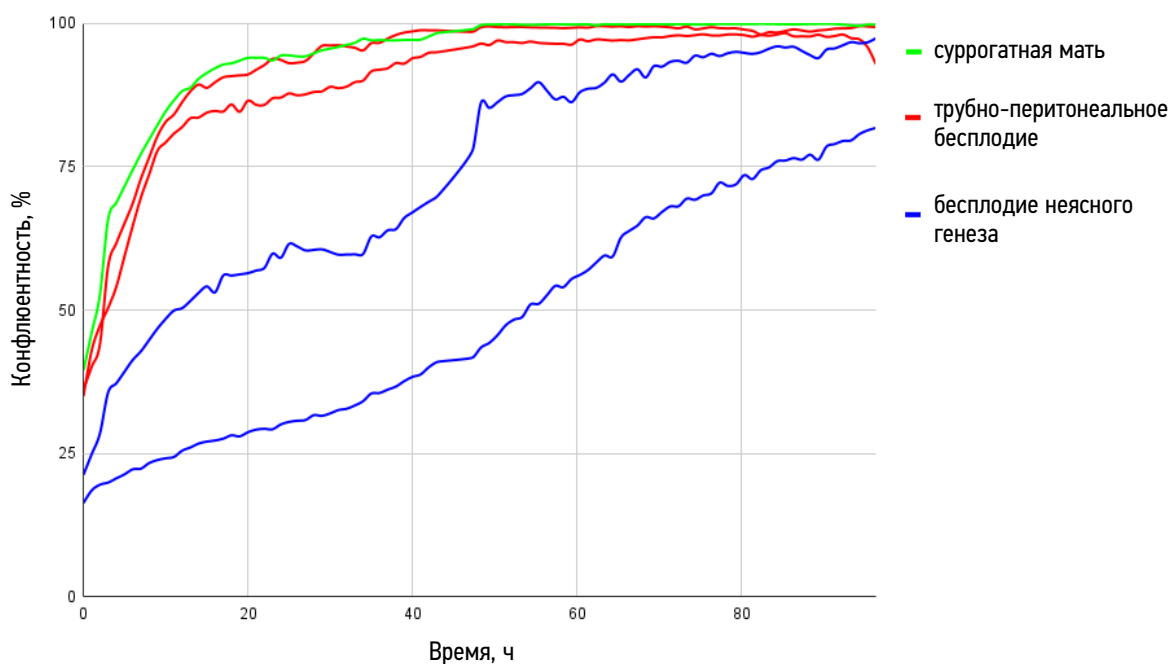


Рис. 4. Оценка пролиферативной активности мезенхимных стромальных клеток, выделенных из эндометрия пациенток, при начальной концентрации 240×10^3 кл/мл.

выявлена ($p < 0,001$) при всех трёх плотностях посева, что подтверждает нашу гипотезу о сниженной скорости пролиферации МСК, выделенных из эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации, по сравнению с «фертильным эндометрием». Наибольший клинический интерес представляют пациентки с бесплодием неясного генеза. Мы предполагаем, что причиной как бесплодия, так и повторных неудач имплантации у этих пациенток может быть пониженная пролиферативная активность МСК, что, вероятно, делает эндометрий неполноценным для успешной имплантации эмбриона.

Для оценки влияния эстрогена на скорость пролиферации МСК эндометрия в среду для культивирования добавляли 17β -эстрадиол в концентрации $0,1$ нМ и в течение 80 ч отслеживали динамику формирования конфлюэнтного монослоя (съёмка каждые 60 мин, 4 поля; 5-й пассаж). Для эксперимента была использована средняя начальная концентрация клеток 120×10^3 кл/мл.

МСК, выделенные из эндометрия суррогатной матери, показали статистически значимое увеличение скорости пролиферации в ответ на добавление эстрогена. У пациенток с бесплодием неясного генеза добавление эстрогена

также значимо ускоряло пролиферацию МСК. У одной из пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием ответ на 17β -эстрадиол отсутствовал, у другой наблюдалось значимое снижение пролиферации в ответ на добавление гормона. Иными словами, эстрадиол в концентрации $0,1$ нМ не стимулировал пролиферацию МСК эндометрия пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием.

Эстроген в клетках эндометрия реализует различные сигнальные пути через ядерные рецепторы ($ER\alpha/ER\beta$), включая прямую геномную активацию и косвенную через активатор белка-1, что приводит к противоположным эффектам: $ER\alpha$ стимулирует пролиферацию и дифференцировку, а $ER\beta$ подавляет эти процессы [13, 14]. При этом в литературе отсутствуют сведения о влиянии гормонов непосредственно на МСК эндометрия. Полученные нами данные говорят о вариабельности чувствительности МСК эндометрия к добавлению эстрогена *in vitro*. МСК, выделенные из эндометрия пациенток с бесплодием неясного генеза, показали значимое снижение скорости пролиферации относительно МСК суррогатной матери в контрольной среде. Мы ожидали слабый ответ на стимуляцию эстрогеном *in vitro* у этих пациенток, в том числе

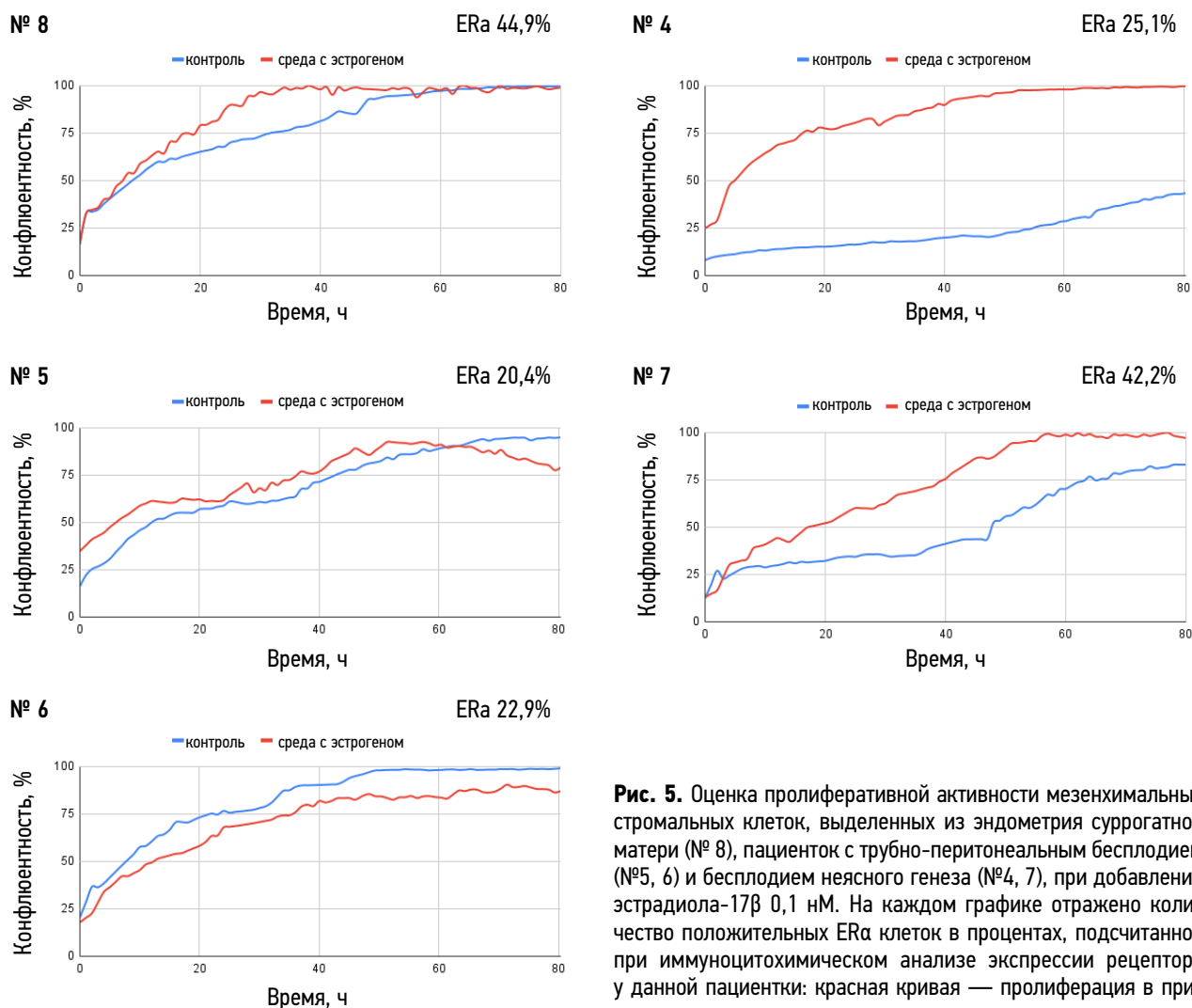


Рис. 5. Оценка пролиферативной активности мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из эндометрия суррогатной матери (№ 8), пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием (№5, 6) и бесплодием неясного генеза (№4, 7), при добавлении эстрадиола- 17β $0,1$ нМ. На каждом графике отражено количество положительных $ER\alpha$ клеток в процентах, подсчитанное при иммуноцитохимическом анализе экспрессии рецептора у данной пациентки: красная кривая — пролиферация в присутствии эстрогена; синяя кривая — контрольная среда.

за счёт снижения у них количества ER α относительно МСК суррогатной матери. Тем не менее результаты данного эксперимента показали статистически значимое увеличение скорости пролиферации у пациенток с бесплодием неясного генеза в ответ на добавление эстрогена относительно контрольной среды. Это свидетельствует о том, что МСК этих пациенток сохраняют чувствительность к эстрогену, несмотря на снижение количества рецепторов к нему.

МСК, выделенные из эндометрия пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием, демонстрируют снижение экспрессии ER α и одновременно отсутствие изменения скорости пролиферации или даже её снижение в ответ на добавление эстрогена в среду. Регенеративная способность МСК эндометрия у этих пациенток, по-видимому, нарушена вследствие хронического воспалительного процесса в маточных трубах. Известно, что шансы на наступление беременности при переносе эмбриона зависят и от цитокинового, и от микробиологического профиля менструальной крови, которые могут изменяться при хроническом воспалительном процессе в матке [15]. Мы предполагаем, что эффективность попыток ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием во многом зависит от комплексного лечения хронического эндометрита и в меньшей степени от гормональной терапии с применением эстрогенов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые продемонстрировано снижение пролиферативной активности (по конфлюэнтности) и экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER α) МСК эндометрия у пациенток с повторными неудачами имплантации, что представляет собой новое звено патогенеза бесплодия, в том числе бесплодия неясного генеза. Эти результаты расширяют фундаментальные представления о функциональных особенностях эндометриальных МСК при повторных неудачах имплантации зуплоидных эмбрионов. Дальнейшие работы в этом направлении могут способствовать разработке персонализированных подходов к повышению эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Ограничения исследования

Исследование ограничено числом пациенток, поэтому нельзя было провести статистический анализ данных экспрессии гена рецептора эстрогена *ERS1*. Требуется дальнейшее исследование с включением большего числа пациенток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МСК, выделенные из эндометрия, экспрессируют ядерные эстрогеновые рецепторы ER α , а значит представляют собой эстроген-чувствительную популяцию

клеток. При этом МСК, выделенные из эндометрия пациенток с повторными неудачами имплантации, экспрессируют меньшее количество ядерных рецепторов к эстрогену ER α по сравнению с МСК, выделенными из эндометрия суррогатной матери. Самый низкий показатель экспрессии ядерных рецепторов к эстрогену ER α выявлен у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием.

У пациенток с бесплодием неясного генеза выявлена более низкая скорость пролиферации эндометриальных МСК по сравнению с МСК суррогатной матери; 17 β -эстрадиол в условиях *in vitro* увеличивает скорость пролиферации МСК пациенток с бесплодием неясного генеза.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Д.В. Иващенко — набор пациентов, работа с данными, написание черновика рукописи; В.А. Мангушева — анализ данных, написание черновика рукописи; В.Ю. Сысоева — разработка методологии, лабораторные исследования, анализ данных; Р.Ю. Еремичев — лабораторные исследования; Т.В. Никитина — лабораторные исследования; Л.Н. Щербаклова — определение концепции, валидация, написание черновика рукописи; П.И. Макаревич — определение концепции, разработка методологии; Е.С. Младова — набор пациентов, работа с данными; Н.И. Калинина — лабораторные исследования; О.Б. Панина — определение концепции, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (протокол № 9/24 от 25.11.2024).

Согласие на публикацию. Все участники исследования добровольно подписали форму информированного согласия до включения в исследование.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках Государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова (выделение клеток и первичная культура) при поддержке гранта Российского научного фонда № 25-75-30005 (оценка пролиферации и экспрессии рецепторов методом ПЦР).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. В рамках данной работы использованы впервые собранные сведения.

Доступ к данным. Авторы сообщают, что все данные представлены в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два рецензента, член редакционной коллегии и главный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: D.V. Ivashchenko: patient recruitment, data curation, writing—original draft; V.A. Mangusheva: formal analysis, writing—original draft; V.Yu. Sysoeva: methodology, investigation, formal analysis; R.Yu. Eremichev: investigation; T.V. Nikitina: investigation; L.N. Shcherbakova: conceptualization, validation, writing—original draft; P.I. Makarevich:

conceptualization, methodology; E.S. Mladova: patient recruitment, data curation; N.I. Kalinina: investigation; O.B. Panina: conceptualization, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: The study was approved by the local Ethics Committee of Lomonosov Moscow State University (Minutes No. 9/24 dated November 25, 2024).

Consent for publication: Written informed consent was obtained from all participants prior to enrollment.

Funding sources: The study was conducted as part of a state-funded assignment of Lomonosov Moscow State University (cell isolation and

primary culture) and supported by the Russian Science Foundation grant No. 25-75-30005 (proliferation and expression assessment by polymerase chain reaction).

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: All data obtained in this study are available in this article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer-review: This article was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two reviewers, a member of the editorial board, and the editor-in-chief.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Zhang S, Chan RWS, Ng EHY, Yeung WSB. The role of Notch signaling in endometrial mesenchymal stromal/stem-like cells maintenance. *Commun Biol*. 2022;5(1):1064. doi: 10.1038/s42003-022-04044-x EDN: GQCCRG
- Eremichev R, Kulebyakina M, Alexandrushkina N, et al. Scar-Free healing of endometrium: tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:616893. doi: 10.3389/fcell.2021.616893 EDN: PRDYCO
- Patterson AL, George JW, Chatterjee A, et al. Putative human myometrial and fibroid stem-like cells have mesenchymal stem cell and endometrial stromal cell properties. *Hum Reprod*. 2020;35(1):44–57. doi: 10.1093/humrep/dez247 EDN: NZFWAI
- Li T, He H, Liu R, et al. Isolation and identification of epithelial and stromal stem cells from eutopic endometrium of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;178:89–94. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.04.001
- Min J, Lu N, Huang S, et al. Phenotype and biological characteristics of endometrial mesenchymal stem/stromal cells: A comparison between intrauterine adhesion patients and healthy women. *Am J Reprod Immunol*. 2021;85(6):e13379. doi: 10.1111/aji.13379 EDN: DEHQNF
- Anikina TA, Sysoeva VYu, Rubina KA, Radzinsky VE. Expression of mesenchymal cellular markers in the endometrium in health and in proliferative uterine diseases. *Obstetrics and Gynecology*. 2016;(9):79–86. doi: 10.18565/aig.2016.9.79-86 EDN: WWWWPV
- Hubbard SA, Friel AM, Kumar B, et al. Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(21):8241–8248. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4808 EDN: XXDGUQ
- Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, Mall G. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod*. 2002;17(10):2725–2736. doi: 10.1093/humrep/17.10.2725 EDN: IPHWFH
- Spitzer TL, Rojas A, Zelenko Z, et al. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. *Biol Reprod*. 2012;86(2):58. doi: 10.1095/biolreprod.111.095885
- Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;288(1-2):22–29. doi: 10.1016/j.mce.2008.02.026 EDN: XVECAD
- Zlatska AV, Gordienko IM, Zubov DO, et al. Expression of estrogen and progesterone receptors by human endometrial multipotent mesenchymal stromal/stem cells in vitro under hypoxia conditions. *Biotechnologia Acta*. 2019;12(1):81–85. doi: 10.15407/biotech12.01.081 EDN: NPAEJR
- Szukiewicz D, Stangret A, Ruiz-Ruiz C, et al. Estrogen- and progesterone (P4)-mediated epigenetic modifications of endometrial stromal cells (EnSCs) and/or mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) in the etiopathogenesis of endometriosis. *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17(4):1174–1193. doi: 10.1007/s12015-020-10115-5 EDN: YXZDQG
- Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019;116:135–170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*. 1997;277(5331):1508–1510. doi: 10.1126/science.277.5331.1508 EDN: CNSOUR
- Jain M, Mladova E, Shichanina A, et al. Microbiological and cytokine profiling of menstrual blood for the assessment of endometrial receptivity: a pilot study. *Biomedicine*. 2023;11(5):1284. doi: 10.3390/biomedicine11051284EDN: HBBGTY

ОБ АВТОРАХ

* Иващенко Дарья Владимировна;

адрес: Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-кт, д. 27, корп. 1;

ORCID: 0009-0000-3219-2412;

e-mail: nanomy_1@icloud.com

Мангушева Вероника Александровна;

ORCID: 0009-0001-2367-3238;

e-mail: veronikamanguseva@gmail.com

Сысоева Вероника Юрьевна, канд. биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0001-9885-9056;

eLibrary SPIN: 9473-2564;

e-mail: veroniks@mail.ru

AUTHORS' INFO

* Dariya V. Ivashchenko;

address: 27 Lomonosovsky ave, unit 1, Moscow, Russia, 119192;

ORCID: 0009-0000-3219-2412;

e-mail: nanomy_1@icloud.com

Veronika A. Mangusheva;

ORCID: 0009-0001-2367-3238;

e-mail: veronikamanguseva@gmail.com

Veronika Yu. Sysoeva, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;

ORCID: 0000-0001-9885-9056;

eLibrary SPIN: 9473-2564;

e-mail: veroniks@mail.ru

Еремичев Роман Юрьевич, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-1797-1634;
eLibrary SPIN: 6245-1180;
e-mail: eremichevry@my.msu.ru

Никитина Татьяна Владиславна;
ORCID: 0009-0007-9311-4777;
e-mail: nikitinamide@gmail.com

Щербакова Лия Ниязовна, д-р мед. наук,
доцент;
ORCID: 0000-0003-2681-4777;
eLibrary SPIN: 3138-4565;
e-mail: liya.fbm@gmail.com

Макаревич Павел Игоревич, д-р мед. наук;
ORCID: 0000-0001-8869-5190;
eLibrary SPIN: 7259-9180;
e-mail: pavel.makarevich@gmail.com

Младова Елена Сергеевна;
ORCID: 0000-0002-6103-3100;
e-mail: e.mladova@remediclinic.ru

Калинина Наталья Игоревна, канд. биол. наук, доцент;
ORCID: 0000-0003-3497-9619;
eLibrary SPIN: 6300-6946;
e-mail: n_i_kalinina@mail.ru

Панина Ольга Борисовна, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0003-1397-6208;
eLibrary SPIN: 2105-6871;
e-mail: olgapanina@yandex.ru

Roman Yu. Eremichev, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-1797-1634;
eLibrary SPIN: 6245-1180;
e-mail: eremichevry@my.msu.ru

Tatiana V. Nikitina;
ORCID: 0009-0007-9311-4777;
e-mail: nikitinamide@gmail.com

Liya N. Shcherbakova, MD, Dr. Sci. (Medicine),
Associate Professor;
ORCID: 0000-0003-2681-4777;
eLibrary SPIN: 3138-4565;
e-mail: liya.fbm@gmail.com

Pavel I. Makarevich, MD, Dr. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0001-8869-5190;
eLibrary SPIN: 7259-9180;
e-mail: pavel.makarevich@gmail.com

Elena S. Mladova;
ORCID: 0000-0002-6103-3100
e-mail: e.mladova@remediclinic.ru

Natalia I. Kalinina, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;
ORCID: 0000-0003-3497-9619;
eLibrary SPIN: 6300-6946;
e-mail: n_i_kalinina@mail.ru

Olga B. Panina, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0003-1397-6208;
eLibrary SPIN: 2105-6871;
e-mail: olgapanina@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author