

© Л.Р.Мустафина, С.В.Логвинов, С.Ю.Юрьев, 2015
УДК 611.013.84.018+618.32

Л.Р.Мустафина^{1, 3}, С.В.Логвинов¹, С.Ю.Юрьев²

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЧИСЛЕННОЙ ПЛОТНОСТИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. С.В.Логвинов); ² кафедра акушерства и гинекологии (зав. — проф. А.К.Махмудходжаев), факультет повышения квалификации и профессиональной переподготовки, Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск; ³ отдел перинатологии (зав. — проф. С.В.Логвинов), Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и перинатологии, Томский научный центр СО РАМН

Изучены изменения численной плотности макрофагов материнского (в базальной децидуальной оболочке) и фетального (клетки Кашенко—Гофбауэра) происхождения в плаценте при инфицировании беременных женщин условно-патогенной (*Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*) и патогенной (*Chlamydia trachomatis*) урогенитальной микрофлорой. Проведено гистологическое исследование плаценты и иммуногистохимическое выявление CD68-иммунореактивных клеток в базальной децидуальной оболочке и ворсинчатого хориона, полученных после искусственных абортов по немедицинским показаниям на 6–8-й неделе беременности (n=136). Результаты показали отсутствие изменений в численной плотности макрофагов материнского происхождения и значимое снижение численной плотности макрофагов в стромах ворсин хориона, что при хламидийном инфицировании сочеталось с замедленным, а при уреа- и микоплазменном — с ускоренным развитием ворсинчатого дерева.

Ключевые слова: базальная децидуальная оболочка, ворсинчатый хорион, макрофаги, микоплазменная инфекция, хламидийная инфекция

При физиологически протекающей беременности базальная децидуальная оболочка (БДО) содержит различные виды лейкоцитарных и нелейкоцитарных клеток, среди которых доминируют клетки врожденной иммунной системы [5, 10]. Их присутствие в БДО означает, что система врожденного иммунитета матери, во-первых, не безразлична к полуаллогенному плоду, а во-вторых, способна инициировать врожденный иммунный ответ в случае инфицирования.

Децидуальные макрофаги, имеющие материнское происхождение, при наступлении беременности приобретают специфический фенотип и являются первыми клетками, способными распознавать продукты жизнедеятельности патогенных микроорганизмов за счет активации на их поверхности Толл-подобных рецепторов [13]. Дисфункция макрофагов или изменения их содержания в БДО могут приводить к нарушениям в процессе инвазии цитотрофобласта и формирования плаценты, к изменениям толерантности материнского организма к полуаллогенному трофобласту с развитием осложнений беременности и ее прерыванием [5, 10].

В стромах ворсин хориона в ранние сроки беременности единственной популяцией иммунокомпетентных клеток являются клетки Кашенко—Гофбауэра (ККГ), экспрессирующие высокие уровни регуляторных цитокинов и способные участвовать в неспецифических защитных реакциях в плаценте [4, 13]. Однако отраженные в литературе сведения, свидетельствующие о реактивности макрофагов плодного происхождения при инфекции, довольно противоречивы. Так, при инфекционном хориоамнионите отмечалось снижение количества макрофагов в ворсинах хориона [14]. При хориоамнионитах и виллизитах неизвестной этиологии, а также ряде других патологических состояний, напротив, было описано увеличение численной плотности ККГ [8, 12, 13]. Кроме того, при развитии ворсинчатого хориона ККГ способствуют иммуносупрессии в зоне имплантации зародыша, обеспечивая его толерантность к антигенам матери [13].

Таким образом, несмотря на неодинаковое происхождение макрофагов (материнские, фетальные) и расположение их в разных участках плаценты (БДО, строма ворсинчатого хориона),

Сведения об авторах:

Логвинов Сергей Валентинович, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии; Юрьев Сергей Юрьевич, кафедра акушерства и гинекологии, Сибирский государственный медицинский университет;

Мустафина Лилия Рамильевна (e-mail: mustafinalr@rambler.ru), отдел перинатологии, Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и перинатологии, Томский научный центр СО РАМН, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

очевидна их единая роль в обеспечении защитной функции при воспалительных процессах во время беременности.

Цель данной работы — исследовать численную плотность макрофагов в БДО и ворсинах хориона в зависимости от вида урогенитального инфицирования.

Материал и методы. Объектом исследования служили образцы БДО и ворсинчатого хориона ($n=136$), полученные после искусственных абортов по неакушерским показаниям на 6–8-й неделе беременности у женщин, поступивших в гинекологическое отделение родильного дома № 1 г. Томска. Исследования были одобрены этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета Росздрава (протокол заседания № 1278 от 01.03.2010 г.) и проводились с письменного согласия пациенток.

Материал был получен от пациенток, которых разделили на следующие группы: 1-я ($n=66$) — беременные женщины без уреоплазменного, микоплазменного и хламидийного инфицирования (контрольная); 2-я ($n=18$) и 3-я ($n=16$) — беременные женщины, инфицированные *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* (соответственно); микробное число во 2-й и 3-й группах составило больше 10^4 КОЕ; 4-я ($n=24$) — беременные женщины с активной формой хламидиоза; 5-я ($n=12$) — женщины с персистентной формой хламидиоза. Идентификацию уреоплазм, микоплазм и хламидий осуществляли методом ПЦР при исследовании соскобов эпителия уретры и цервикального канала. Критерием диагностики персистентной формы хламидийной инфекции являлось обнаружение в сыворотке крови антител класса G к белку теплового шока HSP60 *C. trachomatis*. При активной форме хламидиоза антитела к HSP60 хламидий не обнаруживаются. Женщин, включенных в настоящее исследование, несмотря на присутствие инфекционных агентов, клинические проявления не беспокоили.

Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и по общепринятой методике заливали в парафин. Срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, а также проводили иммуногистохимическое исследование при помощи поликлональных антител к маркеру макрофагов — CD68 (DakoCytomation, Дания, разведение 1:100), для чего применяли двухэтапный avidин-биотиновый метод с высокотемпературной демаскировкой антител согласно стандартному протоколу. Визуализацию экспрессии осуществляли с использованием набора EnVision Detection System (DakoCytomation, Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера.

Для оценки численной плотности CD68-позитивных клеток на 1 мм^2 среза БДО и ворсинчатого хориона применяли окулярную вставку с известной площадью при об. 90, ок. 10. Подсчет клеток в строме ворсин осуществляли в 10 независимых полях зрения. Количественную оценку структурных компонентов ворсинчатого хориона проводили с помощью окулярной сетки с 50 тестовыми точками. Для этого при об. 90, ок. 10 в 10 независимых полях зрения подсчитывали количество точек, приходящихся на строму, сосуды и эпителий ворсин хориона. Затем по соотношению точек определяли удельный объем (в %) каждой из указанных структур, принимая за 100 общее количество точек. Просматривали и фотографировали микропрепараты с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия).

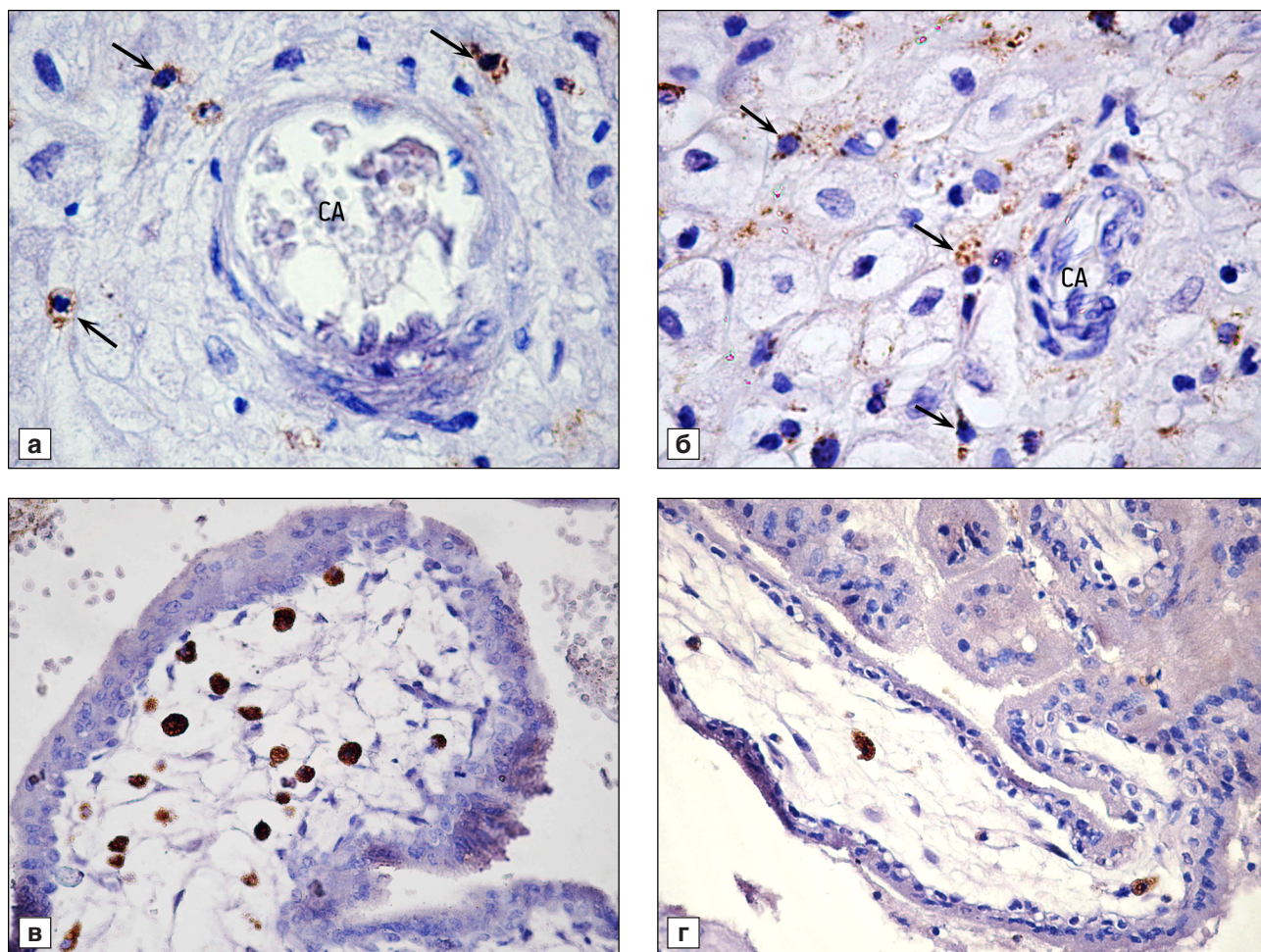
Статистическую обработку количественных данных проводили, используя компьютерные программы SPSS 11.5, и анализировали методами описательной статистики с вычислением медианы (Me) и интерквартильного интервала ($Q_{25\%}$ – $Q_{75\%}$). Для оценки различий между показателями в группах использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $P<0,05$, при $0,056\leq P\leq 0,060$ высказывались о тенденции.

Результаты исследования. При инфицировании *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* в БДО наблюдалась сходная морфологическая картина. Строма была представлена пластинами компактно расположенных децидуальных клеток, среди которых преобладали промежуточные и зрелые формы. Спиральные артерии подвергались гестационной перестройке, характеризующейся инвазией цитотрофобласта в их стенку с замещением мышечных и эластических элементов фибриноидом и расширением просвета. Нередко наблюдалось полное закрытие просвета артерий клетками цитотрофобласта. CD68-позитивные макрофаги диффузно располагались среди децидуальных клеток, имели вытянутую или отростчатую форму, крупное гиперхромное ядро (рисунк, а).

При активной и персистентной формах хламидиоза децидуальные клетки в БДО располагались на расстоянии друг от друга в связи с отеком стромы. Спиральные артерии характеризовались начальными признаками ремоделирования, что проявлялось незначительным фибриноидным набуханием их стенок, отсутствием в последних инвазии цитотрофобласта. CD68-позитивные макрофаги были диффузно расположены между децидуальными клетками (см. рисунок, б), с некоторым преобладанием вокруг спиральных артерий и желез эндометрия.

Ворсинчатый хорион при уреоплазменном и микоплазменном инфицировании был представлен в основном промежуточными незрелыми ворсинами, в соединительной ткани которых в промежутках между отростчатыми клетками (в сети стромальных каналов) свободно располагались CD68-позитивные ККГ (см. рисунок, в). Эти клетки имели преимущественно овальную или круглую форму, мелковакуолизированную цитоплазму и эксцентрично расположенное ядро. Поверхность ворсин покрывал слой цито- и синцитиотрофобласта.

При активной и персистентной форме хламидиоза в ворсинчатом хорионе наблюдался очаговый тромбоз межворсинчатого пространства, преобладали незрелые промежуточные ворсины с дистрофией и деструкцией синцитиотрофобласта на поверхности отдельных ворсин. ККГ свободно размещались в стромальных каналах, однако их



Иммунопозитивные макрофаги в базальной децидуальной оболочке (а, б) и клетки Кашенко—Гофбауэра в строме ворсин хориона (в, г) при различных видах урогенитального инфицирования.

а — CD68-позитивные макрофаги (стрелки) при микоплазменном инфицировании; б — CD68-позитивные макрофаги (стрелки) при хламидиозе; в — клетки Кашенко—Гофбауэра при микоплазменном инфицировании; г — клетки Кашенко—Гофбауэра при хламидиозе. СА — спиральные артерии. Иммуногистохимическая реакция на CD68. а, б — об.90, ок.10; в, г — об.40, ок.10

содержание при хламидийной инфекции было меньше, чем в других исследованных группах (см. рисунок, г).

В численной плотности CD68-позитивных клеток в БДО и ворсинчатом хорионе при разных видах урогенитального инфицирования были обнаружены следующие различия (табл. 1). Так, содержание макрофагов в БДО не различалось в исследованных группах. В строме ворсинчатого хориона численная плотность ККГ была снижена в 1,3 раза при уреа- и микоплазменном инфицировании и в 1,5–1,8 раза — при персистентной и активной форме хламидиоза (соответственно) по сравнению с показателями в контрольной группе.

Количественная оценка удельного объема различных структур ворсинчатого хориона при инфицировании условно-патогенной и патогенной урогенитальной микрофлорой также выявила отличия от значений в контрольной группе (табл. 2). При этом уреа- и микоплазменное инфицирование нижних отделов половых путей характеризова-

лось пролиферацией трофобластического эпителия, стромы и сосудов ворсин. В условиях хламидиоза морфологические изменения проявлялись более низким удельным объемом стромы, сосудов и эпителия ворсин, чем в контрольной группе.

Обсуждение полученных данных. В ранее опубликованных работах были представлены данные, характеризующие количественное содержание CD68-позитивных клеток в БДО и ворсинчатом хорионе при инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*, которая является облигатным внутриклеточным патогенным микроорганизмом для человека [1, 3]. Результаты, обобщенные в настоящем исследовании, позволили сравнить изменения численной плотности макрофагов плаценты при инфицировании беременных женщин патогенной и условно-патогенной (*Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*) микрофлорой.

Так, присутствие патогенной микрофлоры не вызывало изменений в численной плотности

Таблица 1

**Численная плотность CD68-позитивных клеток при инфицировании половых путей
разными видами урогенитальных микроорганизмов при беременности 6–8 нед, Ме ($Q_{25\%}$ – $Q_{75\%}$), клеток/мм² среза**

Локализация клеток	Исследованные группы				
	1-я, контрольная	2-я, U. ur.	3-я, M. hom.	4-я, C. tr. АФ	5-я, C. tr. ПФ
Базальная децидуальная оболочка (БДО)	2217,78 (1774,22–2858,47)	2612,05 (2267,06–3351,31)	2205,46 (1774,22–3351,31)	2323,51 (1978,52–2759,90)	2809,19 (2020,64–3449,88)
Ворсинчатый хорион	1232,10 ^{3,4,5} (823,04–1522,88)	958,57 (739,26–1182,82)	932,70 ^{1,4} (689,98–1053,46)	675,36 ^{1,3} (532,27–869,86)	815,65 ¹ (724,48–1002,93)

Примечание. Здесь и в табл. 2: ^{1, 2, 3, 4, 5} цифрами обозначены значимые различия с показателями в соответствующих группах при $P < 0,05$; U. ur. — *Ureaplasma urealyticum*; M. hom. — *Mycoplasma hominis*; C. tr. АФ — *Chlamydia trachomatis*, активная форма; C. tr. ПФ — *Chlamydia trachomatis*, персистентная форма.

Таблица 2

Удельный объем различных структур ворсинчатого хориона при беременности 6–8 нед, Ме ($Q_{25\%}$ – $Q_{75\%}$), %

Структуры ворсинчатого хориона	Исследованные группы				
	1-я, контрольная	2-я, U. ur.	3-я, M. hom.	4-я, C. tr. АФ	5-я, C. tr. ПФ
Строма	21,6 ^{3,4,5} (8,0–46,0)	43,4 ⁴ (0,1–57,6)	50,4 ^{1,4,5} (32,7–58,1)	15,3 ^{1,2,3} (13,0–18,4)	17,3 ³ (15,3–18,8)
Сосуды	0,4 ⁴ (0,1–1,9)	0,2 (0,1–3,8)	0,8 ⁴ (0,1–4,1)	0,1 ^{1,3} (0,1–0,2)	0,2 ¹ (0,1–0,3)
Эпителий	10,8 (7,9–18,3)	17,2 ^{4,5} (0,1–22,3)	17,0 ⁴ (7,7–24,0)	10,0 ^{2,3} (9,0–12,0)	9,4 ² (7,7–12,2)

CD68-позитивных клеток в БДО, при этом наблюдалось замедление гестационной перестройки стромы и сосудов, сопровождаемое отставанием в развитии ворсинчатого хориона и низкой численной плотностью ККГ.

Известно, что при физиологической беременности макрофаги, локализованные в БДО, характеризуются низким уровнем провоспалительных цитокинов, продукцией различных иммунорегуляторных молекул, которые паракринным способом регулируют пролиферацию и рост цитотрофобласта в ранние сроки беременности, обеспечивают толерантность материнского организма к трофобластическим клеткам, детерминируют дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в сторону Th₂-иммунного ответа, специфичного для беременности [7, 9].

Очевидно, что присутствие микроорганизмов должно было вызвать соответствующую реакцию клеток, обеспечивающих врожденный иммунитет с увеличением их численной плотности, однако этого не происходило. Объяснением могут служить результаты предыдущих исследований, которые позволили установить отчетливо выраженную экспрессию Толл-подобных рецепторов (TLR2) на поверхности CD68-позитивных клеток БДО при хламидиозе, указывающую на активацию макрофагов в ответ на присутствие хламидий [1]. При этом, защитная реакция макрофагов БДО реализуется не за счет увеличения их количества,

а путем активации распознающих рецепторов на поверхности клеток. Вероятно, это является начальным этапом развития воспалительного процесса в БДО при хламидиозе.

При инфицировании условно-патогенной микрофлорой с высоким микробным числом были получены несколько иные результаты: при том, что численная плотность макрофагов в БДО не изменялась, гестационная трансформация БДО явно опережала таковую в контрольной группе.

В исследованиях, проведенных и опубликованных ранее, мы установили, что при уреоплазменном инфицировании происходит незначительное увеличение числа TLR2-позитивных макрофагов в БДО, а при микоплазменном — его уменьшение [2, 3]. Полученные результаты могли быть связаны с непосредственным повреждением клеточной мембраны и поверхностного рецепторного аппарата макрофагов уреа- и микоплазмами, результатом чего являлась неадекватная реакция макрофагов на присутствие микроорганизмов.

Обтурация спиральных артерий цитотрофобластом способствовала развитию местной гипоксии, являющейся, как известно, важным стимулятором роста ворсинчатого хориона в ранние сроки беременности [6]. Как следствие, наблюдалось разрастание всех структур, составляющих ворсинчатое древо, в изучаемом периоде гестации. Логично было бы ожидать увеличения численной плотности ККГ, которого, однако, не наблюда-

лось. Учитывая важную роль ККГ в формировании соединительнотканной стромы и сосудов [11], можно утверждать, что макрофаги ворсин даже при их сниженной численной плотности успешно справляются с функцией формирования ворсинчатого древа. Причина снижения численной плотности ККГ при инфицировании условно-патогенной микрофлорой остается неясной и требует дальнейших исследований.

Таким образом, при разных видах урогенитального инфицирования численная плотность макрофагов в БДО не изменяется, а в строме ворсин хориона — снижается по сравнению с таковой в группе контроля. Несмотря на отсутствие явных признаков воспаления в маточно-плацентарной области, при инфицировании патогенной и условно-патогенной микрофлорой изменяется скорость гестационной трансформации БДО и формирования ворсинчатого хориона, что в более поздние сроки беременности может приводить к развитию плацентарной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мустафина Л.Р., Логвинов С.В., Юрьев С.Ю. Влияние хламидийного инфицирования цервикального канала на показатели локального иммунитета базальной децидуальной оболочки в ранние сроки беременности // Врач-аспирант. 2012. Т. 54, № 5.1. С. 176–181.
2. Мустафина Л.Р., Логвинов С.В., Юрьев С.Ю. Особенности межклеточных взаимодействий в базальной децидуальной оболочке при вагините, ассоциированном с контаминацией условно-патогенными микроорганизмами // Бюл. сибирской медицины. 2012. № 4. С. 64–68.
3. Мустафина Л.Р., Логвинов С.В., Юрьев С.Ю. Роль макрофагов в маточно-плацентарных взаимодействиях при урогенитальном хламидиозе // Врач-аспирант. 2013. Т. 60, № 5.2. С. 370–374.
4. Сельков С.А., Соколов Д.И. Иммунологические механизмы контроля развития плаценты // Журн. акушерства и женских болезней. 2010. № 1. С. 6–10.
5. Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Крошкина Н.В., Воронин Д.Н. Роль клеток врожденного иммунитета в обеспечении успеха беременности в разные сроки гестации // Журн. акушерства и женских болезней. 2013. Т. 62, № 2. С. 151–159.
6. Burton G.J., Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia // J. Soc. Gynecol. Investig. 2004. Vol. 11, № 6. 342–352.
7. Fock V., Mairhofer M., Otti G.R. et al. Macrophage-derived IL-33 is a critical factor for placental growth // J. Immunol. 2013. Vol. 191, № 7. P. 3734–3743.
8. Grigoriadis C., Tympa A., Creatsa M. et al. Hofbauer cells morphology and density in placentas from normal and pathological gestations // Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2013. Vol. 35, № 9. P. 407–412.
9. Helige C., Ahammer H., Moser G. et al. Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: a quantitative evaluation // Hum. Reprod. 2014. Vol. 29, № 1. P. 8–17.
10. Houser B.L. Decidual macrophages and their roles at the maternal-fetal interface // Yale J. Biol. Med. 2012. Vol. 85, № 1. P. 105–118.
11. Ingman K., Cookson V.J., Jones C.J. et al. Characterisation of Hofbauer cells in first and second trimester placenta: incidence, phenotype, survival in vitro and motility // Placenta. 2010. Vol. 31, № 6. P. 535–544.
12. Karakaya Y.A., Ozer E. The role of Hofbauer cells on the pathogenesis of early pregnancy loss // Placenta. 2013. Vol. 34, № 12. P. 1211–1215.
13. Tang Z., Abrahams V.M., Mor G., Guller S. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2011. Vol. 1221. P. 103–105.
14. Vinnars M.T., Rindsjö E., Ghazi S. et al. The number of CD68(+) (Hofbauer) cells is decreased in placentas with chorioamnionitis and with advancing gestational age // Pediatr. Dev. Pathol. 2010. Vol. 13, № 4. P. 300–304.

Поступила в редакцию 08.03.2014
Получена после доработки 02.09.2014

DYNAMICS OF CHANGES IN THE NUMERICAL DENSITY OF PLACENTAL MACROPHAGES DURING UROGENITAL INFECTION IN EARLY PREGNANCY

L.R. Mustafina^{1, 3}, S.V. Logvinov¹, S. Yu. Yuriyev²

The changes in the numerical density of macrophages of maternal (basal decidua) and fetal (Kashchenko-Hofbauer cells) origin were studied in the placenta of women with opportunistic (*Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*) and pathogenic (*Chlamydia trachomatis*) urogenital microflora. Histological study of placenta was performed and CD68-immunoreactive cells were detected immunohistochemically in the basal decidua and in the chorionic villi obtained during artificial abortions for non-medical reasons in the 6–8th week of pregnancy (n=136). The results showed no changes in the numerical density of macrophages of maternal origin and a significant decrease in the numerical density of macrophages in the stroma of the chorionic villi, which was associated in *Chlamydia* infection with a delayed, and in *Ureaplasma* and *Mycoplasma* infection — with an accelerated development of the villous tree.

Key words: basal decidua, the villous chorion, macrophages, *Mycoplasma* infection, *Chlamydia* infection

¹ Department of Histology, Embryology and Cytology, ² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Advanced Training and Professional Retraining, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia; ³ Department of Perinatology, Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of RAS Siberian Branch Tomsk Scientific Center