

13. Park H-Y., Pongpudpunth M., Lee J. and Yaar M. Biology of Melanocytes. In: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7 ed. New York, McGraw-Hill, 2007, p. 591–608.
14. Tobin D.J. Biology of hair follicle pigmentation. In: Hair growth and disorders. Berlin, Springer, 2008, p. 51–74.
15. Tobin D.J. The Aging Hair Pigmentary Unit. In: Aging Hair. Berlin, Springer, 2010, p. 77–90.

Поступила в редакцию 25.10.2010

Получена после доработки 25.02.2011

AGE-RELATED CHARACTERISTICS OF MELANOCYTES IN THE HAIR FOLLICLES OF THE TEMPORAL REGION SKIN IN MEN

V.I. Nozdin, A.G. Alekseyev and T.A. Belousova

Using morphometric and immunocytochemical methods, the distribution of melanin-containing cells in the hair follicles was studied using the autopsy samples of the skin obtained from the temporal region of scalp of 74 male individuals of different age

(10–79 years). In all age groups, the melanocytes were identified only in the epithelial hair matrix — both in sections stained with hematoxylin–eosin and in sections treated with the monoclonal antibodies against tyrosinase. The examination of unstained sections demonstrated that after 15 years the reduction of a total area occupied by melanin granules in the cytoplasm of melanocytes and keratinocytes took place. After 26 years the irregular but stable decrease was found in the number of pigment-forming cells. The number of melanocytes identified using the monoclonal antibodies against tyrosinase, was greater than the number of pigment cell detected by routine methods.

Key words: *skin, scalp, interfollicular epidermis, proliferation, aging*

Scientific Department, «Retinoids» Pharmaceutical Joint-Stock Company, Moscow; Department of Histology, Cytology and Embryology, Medical Institute of Oryol State University

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.018:618.3

Л.Р. Мустафина, Е.В. Хон, С.В. Логвинов и С.Ю. Юрьев

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ИНФИЛЬТРАТА В БАЗАЛЬНОЙ ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ УРОГЕНИТАЛЬНЫМИ МИКОПЛАЗМАМИ

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. С.В. Логвинов), Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, e-mail: mustafinalr@rambler.ru

Проведен иммуногистохимический анализ состава и распределения иммунокомпетентных клеток в базальной децидуальной оболочке человека при беременности 6–8 нед в норме (контроль) и при инфицировании микоплазмами разных видов (микробное число более 10^4 КОЕ). Во всех исследованных группах выявлено преобладание моноцитов; в равных соотношениях встречались большие гранулярные лимфоциты (с фенотипом $CD56^{++}CD16^{-}CD3^{-}$), макрофаги (с фенотипом $CD68^{+}$) и иммунонегативные лимфоциты; в наименьшем количестве были представлены НК-клетки ($CD56^{+}CD16^{+}$), плазмоциты и гранулоциты. Статистически значимых различий между показателями содержания этих клеток у исследованных групп выявлено не было. Полученные данные показали, что микоплазменная инфекция, даже с высоким микробным числом, не вызывает значимых изменений в составе клеточного инфильтрата децидуальной оболочки.

Ключевые слова: *базальная децидуальная оболочка, лимфоциты, макрофаги, микоплазменная инфекция*

Строма базальной децидуальной оболочки (БДО), наряду с децидуальными клетками, содержит ряд иммунокомпетентных клеток, принимающих активное участие в процессах имплантации и поддержании беременности [1, 10, 14]. Лейкоциты и другие клетки, присутствующие в эндометрии и мигрирующие в него во время имплантации и в ранние сроки беременности, продуцируют множество цитокинов, способных не только сохранять беременность, но и модулировать иммунный ответ на микроорганизмы [15]. Реакция иммунокомпетентных клеток маточно-плацентарной

области на отдельные виды микоплазм, по данным разных авторов, может быть неодинаковой. Так, например, при инфицировании *Mycoplasma hominis* показана локальная активация иммунокомпетентных клеток, направленная на усиление воспалительных реакций, а при инфицировании *Ureaplasma urealyticum* — иммуносупрессия [7]. Другими авторами отмечено лишь снижение локального иммунитета при латентном течении бессимптомного воспалительного процесса, вызванного уреа- и/или микоплазменным инфицированием, без конкретизации действия отдельных

патогенов [2]. Любое изменение местных иммунных реакций может приводить к нарушению процессов плацентации, инвазии и развития хориона, с последующим прерыванием беременности [3, 4].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение изменений популяционного состава иммунокомпетентных клеток в БДО при микоплазменном инфицировании.

Материал и методы. Объектом исследования служили образцы БДО человека ($n=91$), полученные после искусственных абортов по немедицинским показаниям при беременности 6–8 нед от женщин, поступивших в гинекологическое отделение родильного дома № 1 г. Томска. Все женщины давали информированное согласие на обработку полученного биологического материала и публикацию результатов в открытой печати.

Полученный материал был распределен на 4 группы: 1-я ($n=23$) — БДО, инфицированная *U. urealyticum*; 2-я ($n=22$) — БДО, инфицированная *M. hominis*; 3-я ($n=12$) — БДО, инфицированная сочетанно *U. urealyticum* и *M. hominis* (микробное число в 1–3-й группах составило более 10^4 КОЕ); 4-я ($n=34$) — контрольная, без микоплазменного инфицирования.

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и по общепринятой методике заливали в парафин. После приготовления срезов толщиной 4–6 мкм проводили иммуногистохимические реакции с использованием моно- и поликлональных антител (DakoCytomation, Дания) для выявления CD3 (1:100), CD16 (1:40), CD56 (1:100), CD68 (1:100). Выявление экспрессии осуществляли с использованием набора EnVision (DakoCytomation, Дания). Ядра докрашивали гематоксилином Майера. Для оценки состава клеточного инфильтрата на 1 мм^2 БДО: больших гранулярных лейкоцитов (БГЛ), натуральных киллерных клеток (НК-клеток), моноцитов, макрофагов, плазмочитов, гранулоцитов применяли окулярную вставку с известной площадью (об. 90, ок. 10). Определяли

долю клеток каждого вида, принимая за 100% абсолютное количество всех клеток на 1 мм^2 среза. Просмотр и фотографирование препаратов осуществляли используя микроскоп «Axiostar plus» (Carl Zeiss, Германия). Статистическую обработку результатов проводили при помощи лицензионного пакета программ Statistica 6.0. Анализ полученных данных осуществляли методами описательной статистики с вычислением медианы и интерквартильного интервала. Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для оценки силы взаимосвязи между показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Различия между показателями в разных группах считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. В строме БДО у контрольной группы клетки инфильтрата располагались преимущественно диффузно, изредка формируя скопления вокруг остатков маточных желез или спиральных артерий. В группах с уреа- и микоплазменной моноинфекцией, а также при сочетанном инфицировании, кроме того, встречались клеточные инфильтраты, расположенные в виде отдельных очагов.

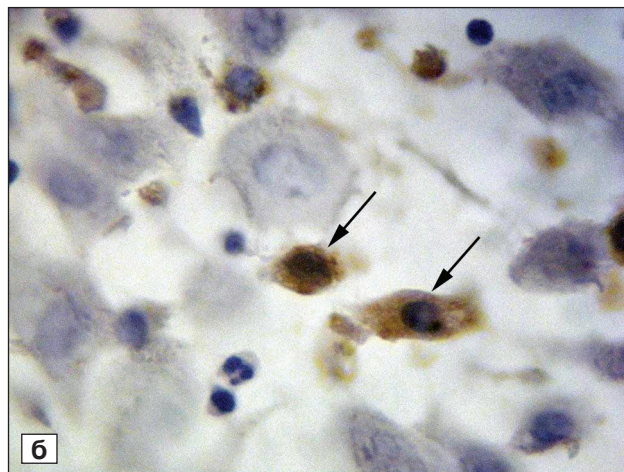
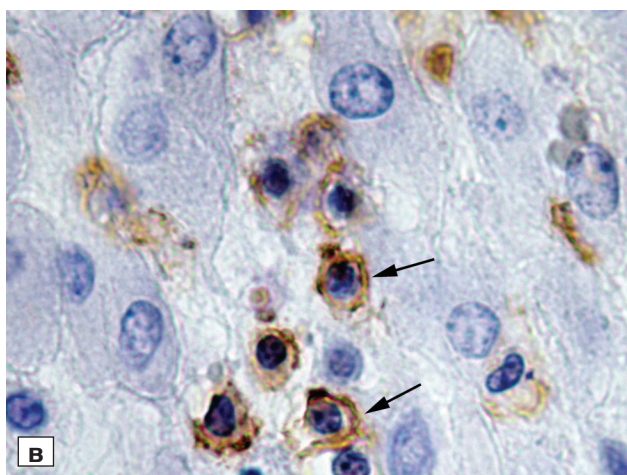
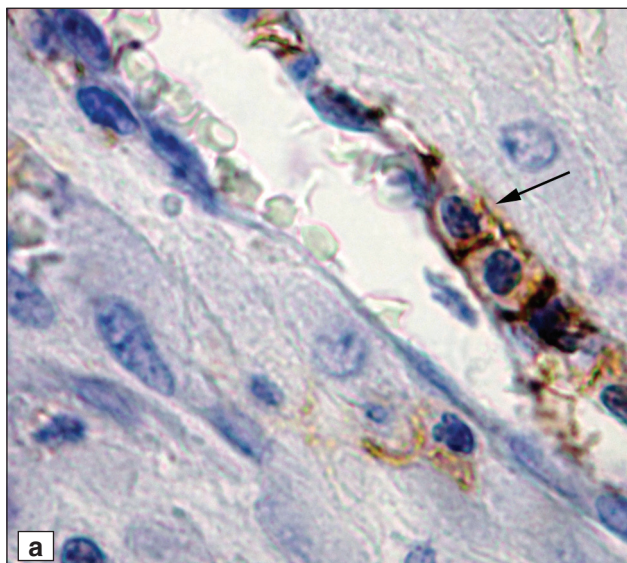
При оценке характера клеточной инфильтрации в БДО было выявлено преобладание моноцитов. Их количество было одинаковым во всех исследованных группах (таблица).

Несколько в меньшем количестве, чем моноциты, были представлены БГЛ с фенотипом $\text{CD56}^{++}\text{CD16}^{-}\text{CD3}^{-}$, которые находились не только в соединительной ткани децидуальной оболочки, но и интраэпителиально — отдельные $\text{CD56}^{++}\text{CD16}^{-}\text{CD3}^{-}$ -клетки определялись в эпителии сохранившихся маточных желез (рисунок, а). БГЛ отличались от $\text{CD56}^{-}\text{CD16}^{-}\text{CD3}^{-}$ -

Относительное содержание (%) клеток в базальной децидуальной оболочке в 6–8 нед беременности [Me (Q_1 – Q_3)]

Клетки инфильтрата	Контроль	Экспериментальные группы		
		1-я	2-я	3-я
Макрофаги	17,52 (12,50–23,40)	17,86 (13,11–21,43)	13,72 (9,09–19,20)	18,54 (13,52–22,88)
Плазмочиты	0,11 (0,00–3,70)	0,07 (0,00–2,04)	0,00 (0,00–0,00)	1,19 (0,08–4,94)
Лимфоциты	16,55 (11,36–20,69)	16,18 (11,56–21,43)	20,85 (14,29–23,68)	18,28 (16,33–22,70)
Моноциты	40,46 (32,31–44,68)	38,38 (20,00–44,90)	36,47 (33,33–55,90)	36,53 (28,10–41,50)
Гранулоциты	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,00)
Большие гранулярные лимфоциты	17,92 (9,72–30,00)	20,00 (12,82–28,57)	17,47 (9,52–31,11)	25,00 (10,35–30,99)
Натуральные киллерные клетки	1,44 (0,00–6,38)	1,03 (0,00–11,01)	0,14 (0,00–5,20)	0,09 (0,00–1,53)

Примечание. Me — медиана; Q_1 – Q_3 — интерквартильный интервал; 1-я группа — *Ureaplasma urealyticum*; 2-я — *Mycoplasma hominis*; 3-я — сочетание *Ureaplasma urealyticum*+*Mycoplasma hominis*.



Иммунопозитивные клетки в составе инфильтрата базальной децидуальной оболочки в ранние сроки беременности при инфицировании урогенитальными микоплазмами.

а — большие гранулярные лимфоциты с фенотипом $CD56^{++}CD16^{-}CD3^{-}$ (стрелка); б — натуральные киллерные клетки с фенотипом $CD56^{+}CD16^{+}$ (стрелки); в — макрофаги с фенотипом $CD68^{+}$ (стрелки). Иммуногистохимическая реакция. Об. 90, ок. 10.

лимфоцитов значительными размерами, бобовидным ядром, расположенным нередко эксцентрично, и довольно большим объемом цитоплазмы. Подсчет БГЛ выявил некоторое увеличение их доли в группе с уреаплазменной моноинфекцией и в группе с сочетанной уреа- и микоплазменной инфекцией по сравнению с таковой в контроле. При этом статистически значимых различий между показателями в сравниваемых группах не наблюдалось. Выявлена обратная взаимосвязь между содержанием моноцитов и БГЛ: увеличение последнего зависело от снижения в БДО доли моноцитов ($r=-0,58$; $P=0,0003$).

Макрофаги с фенотипом $CD68^{+}$ были относительно равномерно распределены в строме, имели вытянутую веретенообразную, реже отростчатую форму, что хорошо определялось при иммуногистохимической реакции (см. рисунок, б). Относительное содержание макрофагов БДО не различалось в исследованных группах, хотя незначительное снижение доли данных клеток наблюдалось в группе с микоплазменной моноинфекцией.

Иммунонегативные лимфоциты ($CD56^{-}$, $CD16^{-}$, $CD3^{-}$) определялись в количествах, сравнимых с содержанием макрофагов и БГЛ. При сопоставлении относительного содержания лимфоцитов в различных группах обнаружено его незначительное увеличение при инфицировании *M. hominis* по сравнению с показателями в контрольной группе, но значимые различия отсутствовали.

НК-клетки с фенотипом $CD56^{+}CD16^{+}CD3^{-}$ встречались в незначительном количестве, характеризовались диффузным расположением в строме БДО или формированием небольших отдельных периваскулярных инфильтратов (см. рисунок, в).

Плазмциты обнаруживались в строме БДО поодиночке и никогда не образовывали скоплений. Увеличение их относительного содержания при сочетании уреа- и микоплазменного инфицирования было незначительным.

Содержание гранулоцитов было незначительным и не различалось в сравниваемых группах.

Обсуждение полученных данных. Как показали результаты проведенного исследования, самой многочисленной популяцией в БДО были моноциты. Доминирование клеток данного вида согласуется с концепцией, согласно которой подавление специфического иммунного ответа матери сопровождается активацией неспецифической врожденной иммунной системы [4]. При

этом именно моноциты, количество которых значительно увеличивается в ранние сроки физиологической беременности, играют ведущую роль в иммунной адаптации материнского организма к полуаллогенному эмбриону и поддержании беременности [8].

Преобладание в составе клеточного инфильтрата БДО моноцитов может объясняться их морфологическим сходством с неактивированными БГЛ (крупные размеры, гиперхромные ядра бобовидной формы), что отчасти подтвердилось выявленной обратной корреляционной связью между этими клетками.

БГЛ эндометрия и децидуальной оболочки в ранние сроки беременности по морфологическим признакам соответствуют НК-клеткам, встречающимся в крови и в других тканях организма человека [15]. Однако фенотипическая характеристика БГЛ, определяемых в эндометрии и БДО, имеет свои особенности, и при иммуногистохимическом фенотипировании эти клетки определяются как $CD56^{++}CD16^{-}CD3^{-}$ [1]. Наиболее отчетливо данное окрашивание проявляется в секреторную фазу менструального цикла, в периимплантационный период и в I триместре беременности [8]. Наряду с моноцитами, эти клетки участвуют в имплантации, стимулируя инвазию трофобласта, и контролируют перестройку спиральных маточных артерий при беременности [10]. Показано, что в ранние сроки беременности эти клетки составляют более 70% (более 30% от всех клеток эндометрия) [1]. По сравнению с отмеченным в литературе, низкое содержание БГЛ, обнаруженное в нашем исследовании, вероятнее всего связано не с малым числом клеток, а с их неполной активацией к 6–8 нед беременности, которая продолжается на протяжении всего I триместра беременности, достигая максимума к его окончанию.

Макрофаги с фенотипом $CD68^{+}$, являясь производными моноцитов периферической крови, также участвуют в защите эмбриона и плода от агрессии местного иммунного ответа матери. Привлекаемые в БДО клетками стромы и трофобласта, они приобретают специфический фенотип, который способствует развитию плаценты и материнской толерантности к полуаллогенному плоду [13]. Согласно данным разных исследователей, их содержание в БДО довольно велико (около 20%) и остается таковым на протяжении всей беременности [11, 12]. Изменения содержания или активности децидуальных макрофагов может нарушать функции инвазивного цитотрофобласта и развитие плаценты, приводя к различным нарушениям беременности, вплоть до ее прерывания [5, 11, 12].

Количество иммунонегативных лимфоцитов ($CD56^{-}$, $CD16^{-}$, $CD3^{-}$), установленное в настоящем исследовании, соответствует описанному в литературе и не изменяется в зависимости от вида микоплазм, несмотря на их высокое микробное число [6]. Увеличение клеточной популяции лимфоцитов в децидуальной оболочке наблюдается, например, при вирусных инфекциях, в случаях привычных выкидышей неясного генеза [10, 15].

Количество НК-клеток, представленных в БДО при разных видах микоплазменной инфекции, как показано в нашем исследовании, было минимальным и не зависело от вида микоплазм. Естественные киллерные клетки с фенотипом $CD56^{+}CD16^{+}$ играют существенную роль в момент имплантации, однако после ее наступления и на протяжении всей беременности отмечается их подавление [4]. Увеличения количества и киллерной активности НК-клеток приводит к нарушению процесса имплантации и самопроизвольному аборту [9].

Таким образом, наличие при физиологической беременности *U. urealyticum* и *M. hominis* даже с высоким микробным числом (больше 10^4 КОЕ) не вызывает изменений в составе иммунокомпетентных клеток БДО в I триместре беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. Функциональная морфология больших гранулярных лимфоцитов эндометрия человека. Морфология, 2001, т. 119, вып. 2, с. 70–76.
2. Быковская О.В. Иммуномодулирующая терапия при хронических цервицитах, обусловленных уреа- и микоплазменной инфекцией. Гинекология, 2007, т. 9, № 1, с. 24–28.
3. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М., Триада-Х, 2002.
4. Сухих Г.Т., Сафронова В.Г. и Ванько Л.В. Современные представления о роли фагоцитов в патогенезе осложнений беременности. Бюл. экспер. биол., 2002, т. 134, № 8, с. 124–135.
5. Bürk M.R., Troeger C., Brinkhaus R. et al. Severely reduced presence of tissue macrophages in the basal plate of pre-eclampsic placentae. Placenta, 2001, v. 22, № 4, p. 309–316.
6. Dietl J., Ruck P., Horny H.P. et al. The decidua of early human pregnancy: immunohistochemistry and function of immunocompetent cells. Gynecol. Obstet. Invest., 1992, v. 33, № 4, p. 197–204.
7. Doh K., Barton P.T., Korneeva I. et al. Differential vaginal expression of interleukin-1 system cytokines in the presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2004, v. 12, № 2, p. 79–85.
8. Engert S., Rieger L., Kapp M. et al. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. Am. J. Reprod. Immunol., 2007, v. 58, № 2, p. 129–137.
9. Kara F., Cinar O., Erdemli-Atabeni E. et al. Ultrastructural alterations in human decidua in miscarriages compared to normal preg-

- nancy decidua. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2007, v. 86, № 9, p. 1079–1086.
10. Lachapelle M.H., Miron P., Hemmings R. and Roy D.C. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J. Immunol.*, 1996, v. 15, № 56 (10), p. 4027–34.
 11. Lash G.E., Otun H.A. Innes B.A. et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum. Reprod.*, 2010, v. 25, № 5, p. 1137–1145.
 12. Nagamatsu T. and Schust D.J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod. Sci.*, 2010, v. 17, № 3, p. 209–218.
 13. Renaud S.J. and Graham C.H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol. Invest.*, 2008, v. 37, № 5, p. 535–564.
 14. Sanguansermsri D. and Pongcharoen S. Pregnancy immunology: decidual immune cells. *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.*, 2008, v. 26, № 2-3, p. 171–181.
 15. Tabiasco J., Rabot M., Aguerre-Girr M. et al. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties — a review. *Placenta*, 2006, v. 27, Suppl A, p. 34–39.

Поступила в редакцию 15.02.2011

Получена после доработки 27.05.2011

CELLULAR COMPOSITION OF DECIDUA BASALIS INFILTRATE DURING EARLY PREGNANCY IN UROGENITAL MYCOPLASMA INFECTION

*L.R. Mustafina, E.V. Khon, S.V. Logvinov
and S.Yu. Yuriyev*

The composition and distribution of immunocompetent cells in human decidua basalis at 6–8 weeks of pregnancy was studied immunohistochemically under normal conditions (control group) and in infection with different mycoplasma species (microbial number $> 10^4$ CFU). In all the groups studied, monocytes were most numerous cells; large granular lymphocytes (phenotype: $CD56^{++}CD16^{-}CD3^{-}$), macrophages ($CD68^{+}$) and immunonegative lymphocytes were observed in equal proportions; the least numerous populations were those of NK-cells ($CD56^{+}CD16^{+}$), plasmocytes and granulocytes. No statistically significant differences were found between the content of these cells in all the investigated groups. The data obtained suggest that mycoplasma infection even characterized by high microbial number, does not cause significant changes in the composition of decidua basalis cellular infiltrate.

Key words: *decidua basalis, lymphocytes, macrophages, mycoplasma infection*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Siberian State Medical University, Tomsk