

УДК 611.013.85

## ОБ УЧАСТИИ КЛЕТОК КАЩЕНКО–ГОФБАУЭРА В ТКАНЕВОМ ОБМЕНЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА РАННИХ ЭТАПАХ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>Груздев С.А., <sup>1</sup>Хайруллин Р.М., <sup>2</sup>Милованов А.П.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ, Ульяновск, e-mail: khayrullin@list.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека РАН», Москва, e-mail: a\_p\_milovanov@mail.ru

Клетки Кащенко–Гофбауэра являясь синцитиальными макрофагами ворсинчатого хориона, регулируют процессы прорастания ворсин хориона и развития сосудов плода в период развития хориального древа. На ранних стадиях развития беременности клетки Кащенко–Гофбауэра находятся в условиях высокой тканевой концентрации  $\beta$ -хорионического гонадотропина (далее –  $\beta$ -ХГЧ), который может поглощаться и утилизироваться ими. Целью исследования явилось определение сравнительной иммуногистохимической экспрессии  $\beta$ -ХГЧ в клетках Кащенко–Гофбауэра плаценты человека при физиологической и неразвивающейся беременности. Для этого были изучены образцы плацентарной ткани, полученные в ходе медицинских абортот от 5,5 до 10,5 недель гестации. Средний возраст пациенток составил  $27,8 \pm 1,2$  лет. Образцы плацентарной ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина 24–48 часов и обрабатывали приёмами стандартной гистологической техники. После удаления парафина на тонких срезах иммуногистохимически с помощью пероксидаза-авидин-биотинового метода была выявлена экспрессия рецепторов к человеческому  $\beta$ -ХГЧ. Иммуноэкспрессия  $\beta$ -ХГЧ в клетках Кащенко–Гофбауэра была выявлена только в 2-х случаях физиологической беременности, что составило 10% всех случаев, при неразвивающейся беременности случаев экспрессии  $\beta$ -ХГЧ обнаружено не было. Иммуногистохимические находки свидетельствуют об общей высокой (избыточной) концентрации  $\beta$ -ХГЧ в плацентарной ткани, который очевидно поглощается и утилизируется плацентарными макрофагами. Предполагается, что экспрессия  $\beta$ -ХГЧ в строме ворсин и в перикапиллярном пространстве при одновременном выявлении вакуолей с гормоном в цитоплазме клеток Кащенко–Гофбауэра при физиологической беременности не является случайной. Отсутствие клеток стромальных макрофагов в ворсинах плаценты при неразвивающейся беременности с ретрохориальной гематомой может косвенно свидетельствовать о патологически низком уровне  $\beta$ -ХГЧ и определённой роли этого явления в развитии гормональной плацентарной недостаточности на ранних этапах беременности.

**Ключевые слова:** клетки Кащенко–Гофбауэра,  $\beta$ -ХГЧ, трофобласт

## ABOUT INVOLVEMENT OF KASHCHENKO–HOFBAUER CELLS IN TISSUE METABOLISM OF CHORIONIC GONADOTROPIN IN EARLY PREGNANCY

<sup>1</sup>Gruzdev S.A., <sup>1</sup>Khayrullin R.M., <sup>2</sup>Milovanov A.P.

<sup>1</sup>Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: khayrullin@list.ru;

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow, e-mail: a\_p\_milovanov@mail.ru

The Kashchenko-Hofbauer cells known as syncytial macrophages chorionic villi, regulate the germination of chorionic villi and vascular development during formation of chorion tree. In the early stages of pregnancy Kashchenko-Hofbauer cells are in high tissular concentrations of  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) that may be involved in its absorption and utilization. The aim of the study was to determine the comparative immunohistochemical expression of  $\beta$ -hCG in the cells Kashchenko-Hofbauer cells of human placenta at physiological and non-developing pregnancy. For this were the placental tissue samples obtained during medical abortion from 5,5 to 10,5 weeks of gestation studied. The average age of the patients was  $27,8 \pm 1,2$  years. Placental tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin solution 24–48 hours and processed with standard histological techniques of engineering. After removal of the wax on thin sections by immunohistochemistry using peroxidase-avidin-biotin method was revealed expression of receptors for the human  $\beta$ -hCG. Immunohistochemical expression  $\beta$ -hCG in Kashchenko-Hofbauer cells cells was found only in 2 cases of physiological pregnancies, which accounted for 10% of all cases. In cases of non-developing pregnancy expression of  $\beta$ -hCG were not found. Immunohistochemical findings indicate to generally high  $\beta$ -hCG concentrations in placental tissue, which apparently absorbed and utilized placental macrophages. It is assumed that the expression of  $\beta$ -hCG in the stroma of the villi, in the pericapillary space and in vacuoles in the cytoplasm of Kashchenko-Hofbauer cells in physiological pregnancy is not accidental. The absence of immunopositive stromal macrophages in placental villi of non-developing pregnancy with retro-chorionic hematoma may be indirect evidence of abnormally low level of  $\beta$ -hCG and the specific role of this phenomenon in the development of hormone placental insufficiency in the early stages of pregnancy.

**Keywords:** Kashchenko-Hofbauer cells,  $\beta$ -hCG, trophoblast

Клетки Кащенко–Гофбауэра, или синцитиальные макрофаги ворсинчатого хориона, происходят от мезенхимальных стволовых клеток и являются антиген-презентирующими клетками, играющими значительную роль в иммунной защите [3]. Эти плацентарные макрофаги также вносят вклад

в процессы дифференцировки трофобласта и ангиогенеза, вырабатывая различные факторы роста и цитокины (VEGF, FGF, васкулотропин, фактор пролиферации эндотелия, белки семейства Sprouty (Spry) и белок-белкового взаимодействия Spry-семейства с CBL-белками) [4]. Управляя процессами

прорастания ворсин и развития сосудов плода, они модулируют их рост и разветвление в процессе развития хориального древа [4, 7, 8, 10]. На ранних стадиях развития беременности клетки Кашенко–Гофбауэра находятся в условиях высокой тканевой концентрации  $\beta$ -хорионического гонадотропина  $\beta$ -ХГЧ.  $\beta$ -ХГЧ выполняет важные функции в ткани эндометрия и в трофобласте в периимплантационный период. Многие авторы показали его роль в дифференцировке [2, 11], эндокринных функциях [9] и регуляции инвазии цитотрофобласта в миометральные сегменты спиральных артерий матки [5]. Описано 2 типа белка  $\beta$ -ХГЧ, которые имеют различия по трем аминокислотам: тип 1 (СGB7) и тип 2 (СGB3, -5, -8). Оба типа  $\beta$ -ХГЧ экспрессируются на 8–9 неделях беременности до того, как материнская кровь поступит в межворсинчатое пространство как в клеточном трофобласте, так и синцитиотрофобласте, а на 12–14 неделях только в синцитиотрофобласте [2, 6]. Уровень секреции культуральных клеток цитотрофобласта на 8–9 неделе в 4 раза превышает аналогичный уровень на 12–14 неделе [6]. Факт иммуноэкспрессии  $\beta$ -ХГЧ клетками Кашенко–Гофбауэра был описан нами в предыдущей работе в условиях физиологической беременности [1]. В зарубежной литературе имеется единственное исследование, достоверно свидетельствующее об участии синцитиальных макрофагов в обмене  $\beta$ -ХГЧ [12].

**Целью исследования** является определение сравнительной иммуногистохимической экспрессии  $\beta$ -ХГЧ в клетках Кашенко–Гофбауэра плаценты человека при физиологической и неразвивающейся беременности.

#### Материал и методы исследования

Для проведения исследования был осуществлён забор плацентарной ткани при проведении медицинских аборт на сроках гестации от 5,5 до 10,5 недель развития у 59 пациенток. У 20 пациенток аборт производился при физиологически протекающей беременности, у 39 пациенток – при неразвивающейся беременности с ретрохориальной гематомой. Срок гестации определялся по первому дню последней менструации. Для уточнения сроков гестации дополнительно использовали данные ультразвукографии матки с определением теменно-копчикового размера эмбриона. Все пациентки были соматически здоровы, их средний возраст составил  $27,8 \pm 1,2$  лет. Полученную плацентарную ткань тщательно промывали дистиллированной холодной водой с инструментальным выделением фрагментов хориального слоя плаценты и ворсин, при этом эмбриональные ткани из исследования исключались. Фрагменты плацентарной ткани фиксировались в 10%-м нейтральном буферном растворе формалина и обрабатывали по стандартной гистологической технике. После депарафинизации

на тонких срезах выявляли экспрессию рецепторов к человеческому хорионическому  $\beta$ -HCG с помощью первичных антител Universal iSH Detection Kit. Для этого депарафинированные в ксилоле срезы регидратировали путём проведения через спирты снижающейся концентрации и выдерживали в 1% растворе перекиси водорода и метанола в течение 10 минут для погашения активности эндогенной пероксидазы. Срезы промывали в 0,15 М трис-буфере. Маркёр был детектирован с помощью пероксидаза-авидин-биотин-нового метода. Конечный продукт реакции определяли с помощью 3,3'-диаминобензидина (DAB, Sigma Chemical Co), содержащего 0,01% перекиси водорода в течение 2–3 мин. Срезы контрастировали гематоксилином Майера в течение 30 с, дегидратировали, просветляли в ксилоле. Постоянный положительный и отрицательный контроли были включены в каждую серию исследования. Препараты исследовали и фотодokumentировали под световым микроскопом Leica DM500 и Leica DM4000 с использованием системы Leica Application Suite и цифровой фотокамеры высокого разрешения.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Иммуноэкспрессия  $\beta$ -ХГЧ в клетках Кашенко–Гофбауэра была нами выявлена только в 2-х случаях физиологической беременности, что составило 10% всех случаев, при неразвивающейся беременности случаев экспрессии  $\beta$ -ХГЧ в нашем исследовании обнаружено не было. Достоверность различий полученных результатов по критерию различия долей составило  $p < 0,0246$ .

Сравнительная частота случаев иммуноэкспрессии  $\beta$ -ХГЧ в клетках Кашенко–Гофбауэра в плаценте при физиологической и неразвивающейся беременности

| Наименование группы пациенток   | Число наблюдений | Число случаев положительной реакции на $\beta$ -ХГЧ |
|---------------------------------|------------------|---|
| С физиологической беременностью | 20               | 2 (10%)   |
| С неразвивающейся беременностью | 39               | 0 (0%)  |
| Итого:                          | 59               | $p < 0,0246$  |

Как видно на рис. 1, основная масса продукта иммуноэкспрессии  $\beta$ -HCG сосредоточена в покрывающем поверхность развивающихся ворсин синцитиотрофобласте. Клетки Кашенко–Гофбауэра, экспрессирующие  $\beta$ -ХГЧ, выделяются в строме ворсин как крупного размера клетки, имеющие вакуолизированную цитоплазму. Вакуоли, содержащие продукт реакции, имеют резкие границы и чётко визуализируются даже на

небольших увеличениях. Следует отметить, что случаи иммуноэкспрессии  $\beta$ -ХГЧ в плацентарных макрофагах сочетались с явно выраженным неравномерным диффузным прокрашиванием стромальной ткани ворсин. Только в указанных выше двух случаях физиологической беременности вокруг адвентиции капилляров стромы ворсин наблюдались также мелкозернистые скопления продукта реакции, заметно выделяющиеся по интенсивности окраски на общем фоне стромы. Перикапиллярная зернистость продукта реакции выявляется только вокруг хорошо проницаемых стенок капилляров мелкого калибра, в то время как вокруг сосудов большего диаметра такая зернистость не определяется. Эти факты свидетельствуют об общей высокой (избыточной) концентрации  $\beta$ -ХГЧ в плацентарной ткани, который очевидно поглощается и утилизируется плацентарными макрофагами. Предполагаемым механизмом поглощения

$\beta$ -ХГЧ может быть неиммунный фагоцитоз. Yamaguchi с соавт. [12] в культуре обработанных фоболмеристилацетатом клеток линии острого моноцитарного лейкоза (ТНР-1) иммуноцитохимическим методом показали, что макрофаги, морфологически сходные с клетками Кашенко–Гофбауэра, включают в свою цитоплазму  $\beta$ -ХГЧ, но не лютеотропный или фолликулостимулирующий гормон. Косвенно авторы продемонстрировали, что увеличение концентрации  $\beta$ -ХГЧ в клетках по времени совпадает с вакуолизацией цитоплазмы. На основе обнаруженных явлений авторы высказали гипотезу о том, что стромальные макрофаги ворсин плаценты путём образования специфических вакуолей поглощают избыточное количество материнского  $\beta$ -ХГЧ, предотвращая тем самым нарушение дифференцировки гениталий развивающегося эмбриона и выравнивают гормональный баланс в системе мать-плацента-плод.

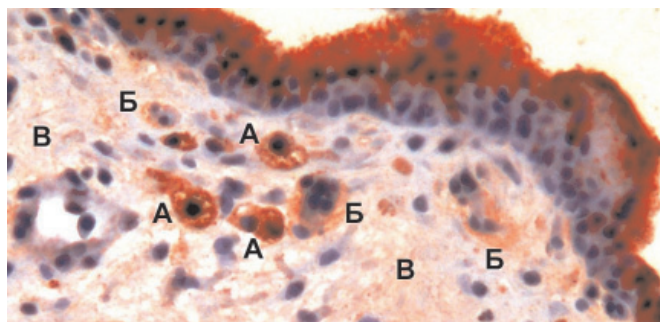


Рис. 1. Микрофото плаценты человека, 7 недель физиологической гестации. Иммуноэкспрессия  $\beta$ -НСГ (продукт реакции красного цвета):  
А – клетки Кашенко–Гофбауэра; Б – перикапиллярная зернистость продукта реакции;  
В – диффузное распределение продукта реакции в строме ворсины.  
Докраска ядер гематоксилином Майера. Ув.  $\times 600$

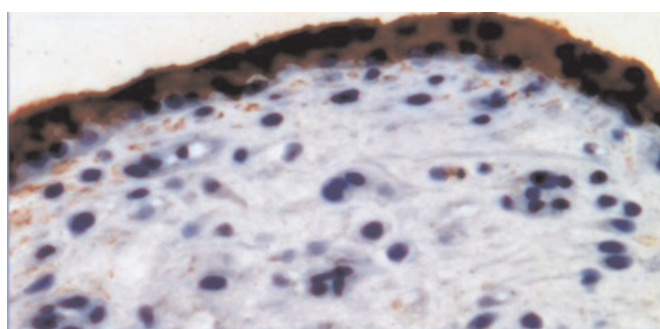


Рис. 2. Микрофото плаценты человека, 8 недель гестации. Случай неразвивающейся беременности с ретрохориальной гематомой. Иммуноэкспрессия  $\beta$ -НСГ (продукт реакции красного цвета). В стромальной ткани отсутствует диффузное распределение продукта реакции. Отдельные гранулы зернистости продукта реакции сосредоточены в субцитотрофобластической зоне.  
Докраска ядер гематоксилином Майера. Ув.  $\times 600$

При анализе случаев выявления клеток Кашенко–Гофбауэра, экспрессирующих  $\beta$ -ХГЧ, было установлено, что плацентарная ткань была получена при процедуре медицинского аборта физиологически про-

текающей первой дебютной беременности. В случаях получения плацентарной ткани при производстве медицинских абортов повторных физиологических и неразвивающихся беременностях иммуноэкспрессия



β-HCG была сосредоточена исключительно в зоне синцитиотрофобласта развивающихся ворсин (рис. 2). Морфологической картины, аналогичной той, которая представлена на рис. 1, не наблюдалось. Более высокая концентрация β-ХГЧ в плацентарной ткани при первой беременности, по-видимому, является биологически целесообразной реакцией обеспечения повышенного уровня надёжности функциональной системы «мать-плацента-плод», направленной на предотвращение возможной репродуктивной потери и установления в ней оптимального уровня гормонального фона для последующих повторных гестаций.

### Заключение

Таким образом, обнаруженные нами факты экспрессии β-ХГЧ в строме ворсин и в перикапиллярном пространстве при одновременном выявлении вакуолей с гормоном в цитоплазме клеток Кашенко–Гофбауэра не являются случайными. Они явно свидетельствуют о высокой концентрации гормона в плацентарной ткани. Вопрос о специфичности формирования вакуолей, содержащих β-ХГЧ является дискуссионным. Отсутствие клеток стромальных макрофагов в ворсинах плаценты при неразвивающейся беременности с ретрохориальной гематомой косвенно свидетельствует о патологически низком уровне β-ХГЧ и определённой роли этого явления в развитии хориальной недостаточности на ранних этапах беременности.

### Список литературы

1. Груздев С.А., Хайруллин Р.М., Милованов А.П. Иммуногистохимическая экспрессия некоторых маркеров синцитиотрофобласта на ранних стадиях развития плаценты человека // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 12. – Часть 1. – С. 52–58.
2. Сигнальные молекулы – маркеры зрелости плаценты / И.М. Кветной, Э.К. Айламазян, Е.А. Лапина, А.В. Колобов. – М.: МЕДпресс-информ, 2005. – 96с.
3. Милованов А.П. Патология системы мать-плацента-плод: руководство для врачей. – М.: Медицина, 1999. – 448с.
4. Anteby E.Y., Natanson-Yaron S., Greenfield C., Goldman-Wohl D., Haimov-Kochman R., Holzer H., Yagel S. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching // *Placenta*. – 2005. – Vol. 26. – № 6. – P. 476–480.
5. Bischof P., Friedli E., Martelli M., Campana A. Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1991. – Vol. 165. – P. 1791–1801.
6. Cocquebert M., Berndt S., Segond N., Guibourdenche J., Murthi P., Aldaz-Carroll L., Evain-Brion D., Fournier T. Comparative expression of hCGβ-genes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 303. – № 8. – P. 950–958.
7. Cooper J.C., Sharkey A.M., McLaren J., Charnock-Jones D.S., Smith S.K. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry // *J. Reprod. Fertil.* – 1995. – Vol. 105. – № 2. – P. 205–213.
8. Demir R., Kayisli U.A., Seval Y., Celik-Ozenci C., Korgun E.T., Demir-Weusten A.Y., Huppertz B. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis // *Placenta*. – 2004. – Vol. 25. – № 6. – P. 560–572.

9. Feinman M.A., Kliman H.J., Caltabiano S., Strauss J.F. 3rd 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1986. – Vol. 63. – P. 1211–1217.
10. Khan S., Katabuchi H., Araki M., Nishimura R., Okamura H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro // *Biol. Reprod.* – 2000. – Vol. 62. – № 4. – P. 1075–1083.
11. Shi Q.J., Lei Z.M., Rao C.V., Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts // *Endocrinology*. – 1993. – Vol. 132. – P. 1387–1395.
12. Yamaguchi M., Ohba T., Tashiro H., Yamada G., Katabuchi H. Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi // *Cells Tissues Organs*. – 2013. – Vol. 197. – № 2. – P. 127–135.

### References

1. Gruzdev S.A., Khajrullin R.M., Milovanov A.P. Immunogistokhimicheskaya ehkspressiya nekotorykh markyrovov sintsitotrofoblasta na rannikh stadiyakh razvitiya platsenty cheloveka // *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012. no. 12. CHast' 1. pp. 52–58.
2. Kvetnoj I.M., Ajlamazyan, E.K., Lapina E.A., Kolobov A.V. Signal'nye molekuly – markery zrelosti platsenty. M.: MEDpress-inform, 2005. 96 p.
3. Milovanov A.P. Patologiya sistemy mat'-platsenta-plod: Rukovodstvo dlya vrachej. M.: Meditsina, 1999. 448 p.
4. Anteby E.Y., Natanson-Yaron S., Greenfield C., Goldman-Wohl D., Haimov-Kochman R., Holzer H., Yagel S. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching // *Placenta*. 2005. Vol. 26. no. 6. pp. 476–480.
5. Bischof P., Friedli E., Martelli M., Campana A. Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991. Vol. 165. pp. 1791–1801.
6. Cocquebert M., Berndt S., Segond N., Guibourdenche J., Murthi P., Aldaz-Carroll L., Evain-Brion D., Fournier T. Comparative expression of hCGβ-genes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. Vol. 303. no. 8. pp. 950–958.
7. Cooper J.C., Sharkey A.M., McLaren J., Charnock-Jones D.S., Smith S.K. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry // *J. Reprod. Fertil.* 1995. Vol. 105. no. 2. pp. 205–213.
8. Demir R., Kayisli U.A., Seval Y., Celik-Ozenci C., Korgun E.T., Demir-Weusten A.Y., Huppertz B. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis // *Placenta*. 2004. Vol. 25. no. 6. pp. 560–572.
9. Feinman M.A., Kliman H.J., Caltabiano S., Strauss J.F. 3rd 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986. Vol. 63. pp. 1211–1217.
10. Khan S., Katabuchi H., Araki M., Nishimura R., Okamura H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro // *Biol. Reprod.* 2000. Vol. 62. no. 4. pp. 1075–1083.
11. Shi Q.J., Lei Z.M., Rao C.V., Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts // *Endocrinology*. 1993. Vol. 132. pp. 1387–1395.
12. Yamaguchi M., Ohba T., Tashiro H., Yamada G., Katabuchi H. Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi // *Cells Tissues Organs*. 2013. Vol. 197. no. 2. pp. 127–135.

### Рецензенты:

Чарышкин А.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;  
Музурова Л.В., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека ГОУ ВПО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 08.04.2013.