

DOI: 10.15690/vramn767

Н.В. Низяева<sup>1</sup>, Т.В. Сухачёва<sup>2</sup>, Г.В. Куликова<sup>1</sup>, М.Н. Наговицына<sup>1</sup>, Н.Е. Кан<sup>1</sup>, О.Р. Баев<sup>1</sup>,  
С.В. Павлович<sup>1</sup>, Р.А. Серов<sup>2</sup>, А.И. Щёголев<sup>1</sup>, Р.А. Полтавцева<sup>1</sup><sup>1</sup> Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова,  
Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> Научный центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева,  
Москва, Российская Федерация

## Морфологические особенности мезенхимальных клеток стромы ворсин хориона

**Обоснование.** В настоящее время строма ворсин хориона является доступным материалом для получения и последующего культивирования мезенхимальных стромальных клеток (МСК). В связи с развитием персонализированной медицины предпринимаются попытки культивирования аутологичных МСК из плаценты для лечения различных заболеваний матери и плода. **Цель исследования:** оценить возможность выделения и использования ткани плаценты для получения мезенхимальных стромальных клеток. **Методы.** Настоящее исследование было проведено на образцах плацент от 45 беременных женщин в возрасте 27–38 лет, на сроке гестации 36–40 нед, подвергнутых оперативному родоразрешению. В основную группу были включены 30 женщин, дети которых родились с врожденными пороками развития (ВПР). Группу сравнения составили 15 пациенток с физиологическим течением беременности без пороков развития. На серийных парафиновых срезах было выполнено гистологическое (окраска гематоксилином и эозином), а также иммуногистохимическое исследование с применением первичных моноклональных антител к МСК CD90 (1:25; Abcam, Великобритания), CD105 (1:500; Abcam, Великобритания), CD44 (1:25; Dako, Дания), CD73 (1:200, Abcam, Великобритания). Кроме того, 15 образцов были исследованы с применением трансмиссионной электронной микроскопии (Philips/FEI Corporation, Eindhoven, Голландия). Количественная оценка интенсивности окрашивания была проведена в клетках стромы промежуточных ворсин с помощью программы обработки изображений NIS-Elements (Czech Republic) для микроскопа Nikon Eclipse 80i. При сравнении средних величин нами использовался t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости различий между группами был принят равным  $<0,05$ . **Результаты.** В результате гистологического исследования образцов, окрашенных гематоксилином и эозином, было отмечено значительное фиброзирование стромы, отставание развития ворсинчатого дерева ворсин плаценты в группе с ВПР ( $p < 0,01$ ). При иммуногистохимическом исследовании в строме стволовых и промежуточных ворсин хориона не выявлено значимого различия между группами в интенсивности окрашивания CD73+, CD90+ и CD44+ клеток ( $p > 0,05$ ). При анализе экспрессии CD105 в строме промежуточных ворсин определялось значимое снижение окрашивания в группе ВПР ( $0,058 \pm 0,0049$ ) в отличие от группы сравнения ( $0,088 \pm 0,0039$ ) ( $p < 0,05$ ). При электронной микроскопии обнаружено, что интерстициальные клетки стромы ворсин при ВПР имели фибробластическую дифференцировку. **Заключение.** Таким образом, для получения клеточной культуры необходимо исключать образцы плацент от пациенток сотягощенным акушерском анамнезом, патологией матери и плода. При врожденной патологии плода выделять из плаценты для культивирования МСК нецелесообразно, и следует, вероятно, воспользоваться донорскими клетками. При выборе образца для культивирования следует ориентироваться на морфологическое строение плаценты.

**Ключевые слова:** врожденные пороки развития, культивирование клеток, мезенхимальные стромальные клетки, плацента, строма ворсин хориона, фибробласты.

**(Для цитирования:** Низяева Н.В., Сухачёва Т.В., Куликова Г.В., Наговицына М.Н., Кан Н.Е., Баев О.Р., Павлович С.В., Серов Р.А., Щёголев А.И., Полтавцева Р.А. Морфологические особенности мезенхимальных клеток стромы ворсин хориона. *Вестник РАМН.* 2017;72(1):76–83. doi: 10.15690/vramn767)

### Обоснование

Ворсинчатое дерево плаценты доношенного срока гестации при физиологическом течении беременности представлено разными типами ворсин (стволовые, промежуточные и терминальные), выполняющих разную функцию и отличающихся количеством стромы, а также различной степенью васкуляризации [1]. Стволовые ворсины образуют каркас ворсинчатого дерева, при этом основную функцию газообмена осуществляют терминальные ворсины с минимальным количеством стромы и тонкими синцитио-капиллярными мембранами, через которые происходит газообмен [1, 2]. В строме ворсин хориона среди мезенхимальных стромальных клеток (МСК) присутствует популяция мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, сохраняющих потенциал к развитию в одном или разных направлениях. В настоящее время МСК используются для экспериментальных моделей, а также при лечении ряда заболеваний, не поддающихся

традиционным методам лечения [3]. Ряд исследователей считает, что для клеточной терапии лучше использовать аутологичные клетки [4], получая их путем культивирования из пуповинной крови, жировой ткани, а также плаценты. Наиболее доступным материалом для получения МСК является ткань плаценты [3–5].

Настоящее пилотное исследование направлено на анализ морфологических особенностей мезенхимальных клеток стромы ворсин хориона при патологии плода.

**Цель исследования:** оценить возможность выделения и использования ткани плаценты для получения мезенхимальных стромальных клеток.

### Методы

#### Дизайн исследования

Выполнено моноцентровое нерандомизированное одномоментное исследование.

**Критерии соответствия****Критерии включения в исследование:**

- в основную группу: образцы плацент, полученные от женщин после кесарева сечения, у которых родились дети с врожденными аномалиями развития;
- в группу сравнения: образцы плацент, полученные от женщин с физиологически протекающей беременностью после оперативного родоразрешения по поводу симфизита, миопии тяжелой степени, а также при наличии рубца на матке после ранее выполненных операций кесарева сечения.

**Критерии исключения:**

- для обеих групп: самопроизвольные роды, тяжелая экстрагенитальная и акушерская патология;
- для группы сравнения: отсутствие соматической и акушерской патологии родильниц и патологии новорожденного.

**Условия проведения**

Настоящее исследование проведено на базе одного специализированного медицинского научного учреждения ФГБУ «Научный центр акушерства гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ.

**Продолжительность исследования**

Исследование проводилось с июня 2016 по октябрь 2016 г.

**Исходы исследования****Основной исход исследования**

В настоящем исследовании был проведен анализ интенсивности иммуногистохимической реакции по сте-

пени выраженности коричневого окрашивания; посредством трансмиссионной электронной микроскопии были изучены форма, размеры, количество органелл мезенхимальных клеток стромы ворсин хориона.

**Дополнительный исход исследования**

Посредством изучения гистологических микропрепаратов проведен анализ морфологических признаков, характерных для плацент от женщин, родивших детей с врожденными пороками развития.

**Методы регистрации исходов**

Образцы плацент, полученные в результате оперативных родов, были исследованы с помощью гистологического (с использованием окраски гематоксилином и эозином), ультраструктурного (посредством трансмиссионной электронной микроскопии) и иммуногистохимического методов анализа.

Продукты положительной иммуногистохимической реакции выявлялись в виде коричневого окрашивания клеток. Количественная оценка интенсивности окрашивания была проведена в клетках стромы промежуточных ворсин с помощью программы обработки изображений NIS-Elements Advanced Research 3.2 program (Laboratory Imaging LTD, Чехия) для микроскопа Nikon Eclipse 80i в условных единицах. Мезенхимальные клетки стромы были изучены и измерены посредством трансмиссионного микроскопа. При анализе гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, выявляемый признак считался положительным, если был отмечен более чем в 3 полях зрения при анализе 10 полей при увеличении микроскопа  $\times 100$ . Выраженность признака не учитывалась.

N.V. Nizyaeva<sup>1</sup>, T. V. Sukhacheva<sup>2</sup>, G. V. Kulikova<sup>1</sup>, M. N. Nagovitsyna<sup>1</sup>, N. E. Kan<sup>1</sup>, O. R. Baev<sup>1</sup>,  
S. V. Pavlovich<sup>1</sup>, R. A. Serov<sup>2</sup>, A. I. Shchegolev<sup>1</sup>, R. A. Poltavtseva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> A. N. Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russian Federation

## Morphological Features of Mesenchymal Stroma Cells of Chorionic Villi

**Background:** Nowadays autologous mesenchymal placental stromal cells (MSCs) may use to treat for various diseases both of the mother and the child. Stroma of the placenta villi is appropriated origin for cell culture isolation. **Aim** of the study was to evaluate the possibility for selection and use of placental tissue for mesenchymal stromal cells. **Materials and methods:** The present study was based on 45 placental samples of women aged 27–38 yy. who underwent surgical delivery at 36–40 weeks of gestation. 30 of these women have been enrolled in the basic group including children with congenital abnormalities (CA). The comparison group consisted of 15 patients with physiological pregnancy. We performed histological examination (with hematoxylin and eosin staining), immunohistochemical examination (with use monoclonal antibodies CD90 (1:25; Abcam, UK), CD105 (1:500; Abcam, UK), CD44 (1:25; Dako), CD73 (1:200, Abcam, UK), and electron microscopy (by microscope Philips/FEI Corporation, Eindhoven, Holland). Eclipse 80i microscope (Nikon Corporation, Japan) was used to examine the immunohistochemical reactions as a brown staining. The evaluation of the intensity of reaction was conducted by NIS-Elements Advanced Research 3.2 program (Czech Republic). Student's *t*-test and analysis of variance were used to compare the mean values. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . **Results:** Interstitial cells of the stroma of the villi with CA had fibroblastic differentiation as revealed degenerative changes of the cells. The histologic examination with hematoxylin and eosin staining revealed significant fibrosis of the stroma of the placenta villi in CA group ( $p < 0.01$ ). Immunohistochemical study of stem and intermediate chorionic villi revealed no significant differences in staining of CD44+, CD90+, CD73+, and CD105+ cells if compared to the control group ( $p > 0.05$ ). Although CD105 expression was significantly lower in the CA group ( $0.058 \pm 0.0049$ ) than in the control group ( $0.088 \pm 0.0039$ ) ( $p < 0.05$ ). However, electron microscopy detected the villi interstitial stromal cells with fibroblastic differentiation in CA group. **Conclusions:** Thus, it is necessary to exclude placenta with obstetrical history, somatic, and congenital pathology of the mother and the child when selecting the placental cell culture. Moreover, choosing a sample the morphological structure of the placenta should be taken into consideration. However, congenital malformations of the fetus, pathology of the mother cultivate mesenchymal stromal cells of placentas is inappropriate and should be taken advantage of the donor cells.

**Key words:** culturing cells, mesenchymal stromal cells, placenta, congenital fetal malformations, chorionic villi stroma, fibroblasts.

**(For citation:** Nizyaeva NV, Sukhacheva TV, Kulikova GV, Nagovitsyna MN, Kan NE, Baev OR, Pavlovich SV, Serov RA, Shchegolev AI, Poltavtseva RA. Morphological Features of Mesenchymal Stroma Cells of Chorionic Villi. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72(1):76–83. doi: 10.15690/vramn767)

После макроскопического изучения последов из центральной зоны каждой плаценты вырезали фрагменты ткани размерами 1×1 см, толщиной 0,3 см, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 ч. На серийных парафиновых срезах толщиной 4 мкм было выполнено гистологическое исследование (окраска гематоксилином и эозином), на парафиновых срезах, расположенных на стеклах Superfrost plus (Menzel, Braunschweig, Германия), — иммуногистохимическое исследование с применением первичных моноклональных антител к CD90 (1:25; Abcam, Великобритания), CD105 (1:500; Abcam, Великобритания), CD44 (1:25; Dako, Дания), CD73 (1:200, Abcam, Великобритания). Демаскировка антигена проводилась в микроволновой печи при мощности 600 Вт с использованием цитратного буфера (Spring Bioscience, США; рН 6,0). Для подавления активности эндогенной пероксидазы срезы были при комнатной температуре инкубированы в 3% растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ready-to use, Spring Bioscience, США) в течение 10 мин. Отмывание срезов производилось трижды фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, рН 7,6) по 5 мин каждое. Неспецифическое окрашивание блокировалось раствором Protein Block (Spring Bioscience, США). В качестве вторичных антител использована смесь противомышиных и противокроличьих антител со стрептавидин-биотиновым комплексом (SBK Kit Dako, Дания). Для трансмиссионной электронной микроскопии через 2–5 мин после кесарева сечения были взяты фрагменты плаценты размером 1 мм<sup>3</sup>, которые фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида и 1% параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксировали в 1,5% растворе OsO<sub>4</sub>, обезвоживали, заливали в арадит. Полутонкие срезы были окрашены по методу ШИК (реактив Шиффа) с докраской метиленовым синим [6]. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Philips CM100 (Philips/FEI Corporation, Eindhoven, Голландия). Для проведения отрицательного контроля образцы исследуемых срезов подвергались стандартной иммуногистохимической процедуре без инкубации с первичными антителами.

#### **Этическая экспертиза**

Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием пациентки. Решением комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России было принято решение об отсутствии необходимости в проведении этической экспертизы в связи с особенностями протокола исследования (протокол заседания комитета № 6 от 09.06.2016).

#### **Статистический анализ**

##### **Методы расчета выборки**

Размер выборки предварительно не рассчитывался

##### **Методы статистического анализа данных**

Статистическая обработка полученных данных проведена в пакете программ Statistica for Windows v. 8. Проверку нормальности распределения исходных данных осуществляли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Данные по иммуногистохимическому анализу представлены как среднее значение (М) и стандартное отклонение (±S). При сравнении средних величин использовался *t*-критерий Стьюдента, для сравнения дан-

ных, полученных для разных групп, — точный критерий Фишера. Различия оценивались как статистически значимые при  $p \leq 0,05$ .

## **Результаты**

### **Участники исследования**

Исследование было проведено на образцах плацент от 45 женщин в возрасте от 27 до 38 лет (средний возраст 34±2,3 года) на сроке гестации 36–40 нед. Основную группу составили образцы плацент (n=30), полученные от женщин, у которых дети родились с врожденными пороками развития: дефекты межжелудочковой перегородки, формирование атриовентрикулярного канала, аномальное отхождение коронарных магистральных сосудов сердца — 12 случаев; мультикистоз почек, подковообразная почка, гипоплазия почек, экстрофия мочевого пузыря — у 7; экстралобарный секвестр легкого, гипоплазия легких — у 3; рудиментарная матка, гипоспадия головки полового члена, крипторхизм — у 5; атрезия двенадцатиперстной кишки, атрезия пищевода, незавершенный поворот кишечника — у 3; деформация конечностей, позвоночного столба — у 7; диафрагмальная грыжа — у 2; кроме того, в 2 случаях были выявлены дисморфии лицевого скелета. При цитогенетическом анализе во время беременности определялся нормальный кариотип. Группу сравнения составили образцы плацент (n=15) от родильниц с физиологическим течением беременности без пороков развития матери и плода.

### **Результаты гистологического исследования**

При гистологическом исследовании микропрепаратов плацент, окрашенных гематоксилином и эозином, от женщин с физиологической беременностью доношенного срока определялось нормально капилляризованное ворсинчатое дерево с балансом зрелых промежуточных и терминальных ворсин, незрелые промежуточные ворсины представлены в виде мелких скоплений (рис. 1). Строение ворсинчатого дерева соответствовало сроку гестации, при этом воспалительных изменений, признаков нарушения кровообращения не отмечено (см. рис. 1 А–Г). Однако в некоторых промежуточных ворсинах был отмечен фиброз стромы (строма плотная с отложением глыбок коллагена), а также сниженное количество кровеносных сосудов.

При гистологическом исследовании и анализе полутонких срезов плацент пациенток с врожденными пороками развития выявлено значительное фиброзирование стромы ворсин (рис. 2 А–Г). Отмечено отложение коллагена в подавляющем количестве ворсин (рис. 2 Д, Е) как в центре нитевидной структуры, так и под синцитием, что обуславливало утолщение гемоплацентарного барьера и нарушение васкуляризации ворсинчатого дерева. В препаратах плацент этой группы преобладал неразветвленный тип ангиогенеза, представленный скоплением мелких нитевидных терминальных ворсин с длинными широкими капиллярными петлями; отмечены большие скопления незрелых промежуточных ворсин с очаговой интенсивной капилляризацией поверхностного отдела; наблюдалось отставание развития ворсинчатого дерева от сроков гестации (табл.), отмечались также бессосудистые ворсины, число синцитиальных узелков (синцитиальных почек) было снижено. Наряду с этим присутствовали участки с большим количеством синцитиальных узелков, ворсины с разветвленным типом ангиогенеза. В строме

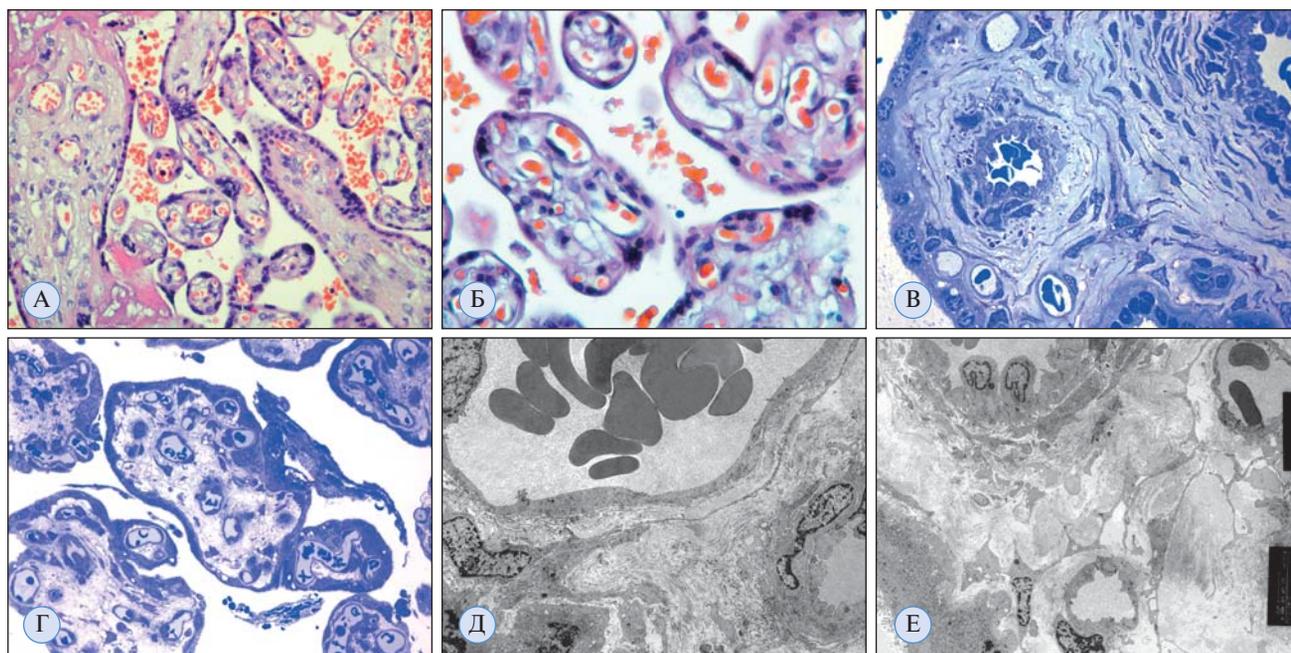


Рис. 1. Ворсинчатое дерево плаценты пациенток с физиологическим течением беременности

*Примечание.* А — ворсинчатое дерево плаценты; Б — промежуточные и терминальные ворсины; В — промежуточные ворсины; Г — стволовая ворсина (концентрическое расположение фибробластов и миофибробластов в адвентиции мелкой артерии); Д, Е — интерстициальные веретеновидные клетки (телоцит) стромы зрелой промежуточной ворсины с длинными тонкими отростками (длинные тонкие отростки разветвляются и окружают капилляры). А — окраска гематоксилином-эозином,  $\times 100$ ; Б —  $\times 200$ ; В–Е — полутонкие срезы, окрашенные реактивом Шиффа с докраской метиленовым синим; В, Г —  $\times 400$ , Д —  $\times 600$ ; Д, Е — ультратонкие срезы,  $\times 3800$ .

ворсин было обнаружено увеличенное количество макрофагов, слабая рассеянная инфильтрация лимфоцитами (см. рис. 2 Г; табл.).

### Результаты электронной микроскопии

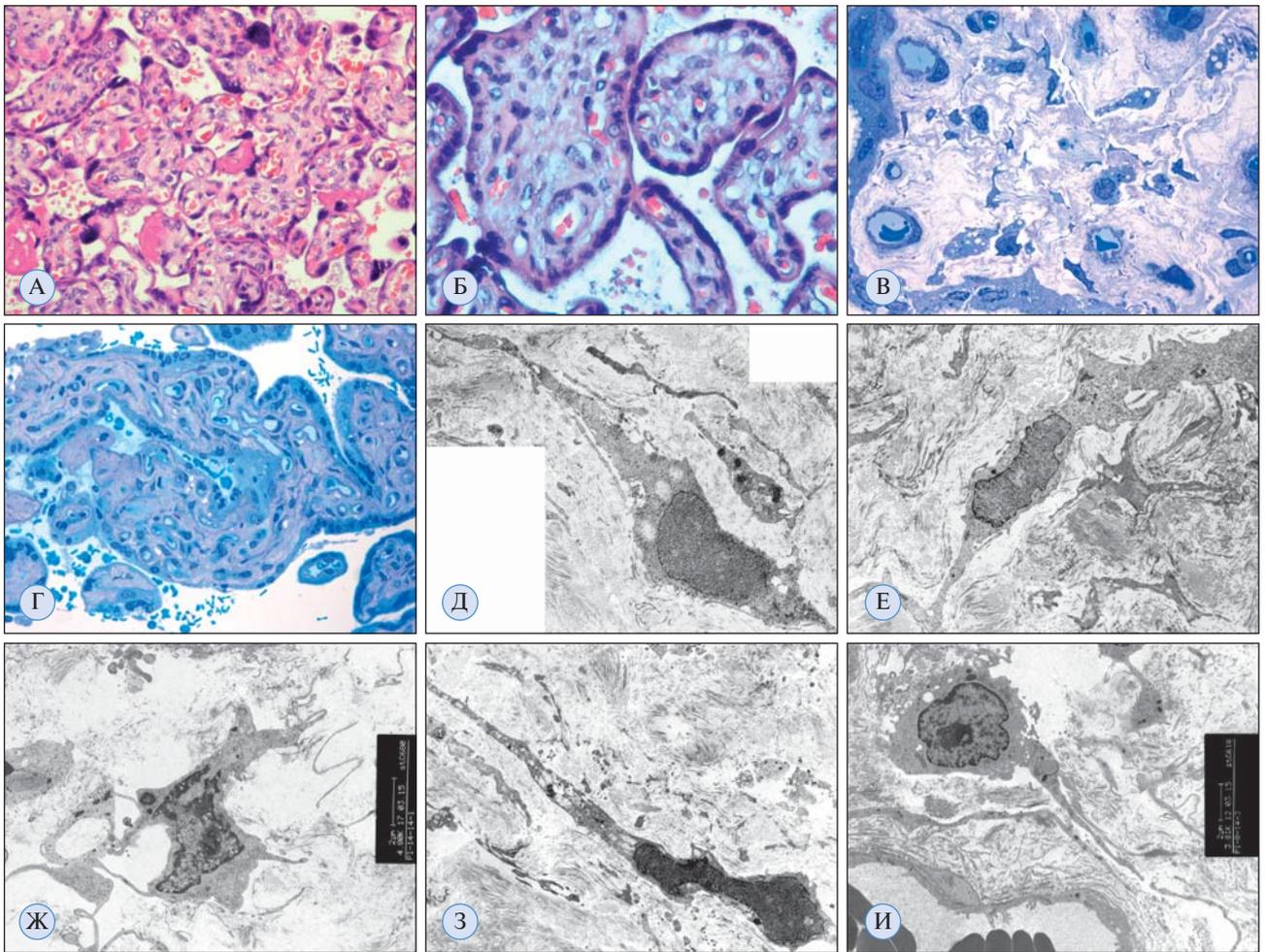
На ультраструктурном уровне в строме ворсин хориона контрольной группы имели место веретеновидные и звездчатые клетки с длинными тонкими ветвящимися отростками толщиной  $0,23 \pm 0,08$  мкм, посредством которых они контактировали друг с другом. Отростки клеток образовывали сеть и в зависимости от типа ворсины либо ограничивали пространство формирующегося кровеносного сосуда (в незрелых промежуточных ворсинах), либо располагались рядом с кровеносным сосудом (в зрелых

промежуточных ворсинах) (см. рис. 1 Д). Ядра мезенхимальных клеток окружал тонкий слой цитоплазмы, в которой различали цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, немногочисленные митохондрии (см. рис. 1 Е). Следует отметить, что в строме некоторых промежуточных ворсин при физиологическом течении беременности мезенхимальные клетки стромы ворсин трансформировались в фибробласты: наблюдались увеличенный объем цитоплазмы, повышенное количество цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, диаметр отростков превышал 1,1 мкм. В терминальных ворсинах мезенхимальных клеток в строме не отмечено. В медию крупных сосудов стволовых ворсин (стволовые ворсины составляют каркас плаценты) группы физиоло-

Таблица. Морфологические характеристики плаценты при пороках развития плода

| Признак*                                                     | Группа          |               | P      |
|--------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|--------|
|                                                              | ВГР (%)<br>n=30 | К (%)<br>n=16 |        |
| Преждевременное созревание ворсинчатого дерева               | 10              | 0             | 0,267  |
| Отставание развития ворсинчатого дерева                      | 73              | 0             | 0,000  |
| Преобладание разветвленного типа ангиогенеза                 | 10              | 0             | 0,267  |
| Преобладание неразветвленного типа ангиогенеза               | 66              | 14            | 0,001  |
| Фиброзирование стромы промежуточных ворсин                   | 90              | 14            | 0,0005 |
| Присутствие бессосудистых ворсин                             | 86              | 26            | 0,001  |
| Отек ворсин                                                  | 26              | 0             | 0,022  |
| Наличие афункциональных зон со спавшимися капиллярами ворсин | 76              | 20            | 0,005  |
| Кисты хориальной пластинки                                   | 20              | 0             | 0,063  |
| Признаки хронического виллита**                              | 60              | 0             | 0,000  |

*Примечание.* \* — признак считался положительным при анализе не менее 3 полей зрения из 10 при  $\times 100$ . \*\* — согласно классификации Redline, 2007 (представлено фокальным и мультифокальным вариантом). К — контрольная группа, ВГР — группа с врожденными пороками развития плода.



**Рис. 2.** Ворсины плаценты женщин с пороками развития плода

*Примечание.* А, Б — ворсинчатое дерево плаценты (промежуточные ворсины с наличием афункциональных зон и выраженным фиброзированием стромы); В — промежуточные ворсины; Г — присутствие повышенного количества макрофагов, единичных лимфоцитов; Д–И — тело фибробластоподобной клетки увеличено в размере, с деформированным увеличенным ядром, короткими отростками, вакуолизированной, содержащей капли жира цитоплазмой. Хорошо развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум располагается около ядра и в зоне локальных расширений отростков. А, Б — окраска гематоксилином-эозином: А —  $\times 200$ , Б —  $\times 400$ ; В, Г — полутонкие срезы промежуточных ворсин, окрашенных реактивом Шиффа с докраской метиленовым синим: В —  $\times 600$ , Г —  $\times 400$ ; Д–И — ультратонкие срезы: Д —  $\times 6500$ , Е —  $\times 4800$ , Ж —  $\times 4800$ , З —  $\times 3800$ , И —  $\times 3800$ .

гической беременности можно было наблюдать концентрически расположенные клетки с отростками толщиной от  $0,23 \pm 0,1$  мкм (см. рис. 1 Г). В указанном типе клеток отмечены ультраструктурные признаки как фибробластов, так и гладкомышечных клеток.

**Результаты иммуногистохимического исследования**

При иммуногистохимическом исследовании в строме стволых и промежуточных ворсинах хориона в группе с врожденными пороками развития визуализировались клетки, экспрессирующие CD90, CD44, CD73, CD105. В строме промежуточных ворсин при анализе CD105 имели место значимые отличия в виде снижения интенсивности окрашивания мезенхимальных клеток стромы в группе с врожденными пороками развития ( $0,058 \pm 0,0049$ ) в отличие от группы сравнения ( $0,088 \pm 0,0039$ ) ( $p < 0,05$ ), а также имела место тенденция к снижению окрашивания CD44 ( $p = 0,069$ ). Наряду с этим достоверного различия в количественном анализе интенсивности окрашивания по сравнению с физиологической нормой для CD73 и CD90 не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Однако при электронной микроскопии в образцах плацент группы с врожденными пороками развития отме-

чены депозиты коллагена как в центре, так и под синцитием подавляющего количества ворсин, что вызывало их деформацию, нарушение васкуляризации ворсинчатого дерева, а также утолщение гематоплацентарного барьера. В строме промежуточных ворсин хориона присутствовали деформированные, увеличенные в размерах клетки, сходные с фибробластами, с укороченными утолщенными отростками, с нарушением контактов друг с другом и другими клетками, с крупными гиперхромными ядрами, вакуолизированной цитоплазмой и наличием липидных капель (рис. 2 Д–И).

**Обсуждение**

**Резюме основного результата исследования**

В результате исследования в образцах ткани плаценты в группе с врожденными пороками развития отмечены значительное фибрирование стромы ворсин, наличие бессосудистых ворсин, отставание развития ворсинчатого дерева ворсин плаценты, повышенная инфильтрация стромы макрофагами и лимфоцитами ( $p < 0,01$ ). При электронной микроскопии обнаружено, что интерстициальные

клетки группы с врожденными пороками развития имели фибробластическую дифференцировку. Наряду с этим при анализе маркеров CD73, CD90 и CD44 значимого различия в интенсивности окрашивания клеток по сравнению с группой контроля не выявлено ( $p > 0,05$ ); анализ CD105 показал достоверное снижение окрашивания ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение основного результата исследования

Все ворсины плаценты снаружи выстланы синцитиотрофобластом и омываются материнской кровью, внутри стромы ворсин расположены сосуды, по которым течет кровь плода. В строме ворсин присутствуют мезенхимальные клетки, составляющие ее каркас. Ввиду отсутствия единой терминологии и классификации клетки стромы незрелых промежуточных ворсин называли ретикулярными клетками [7], фетальными фибробластами, фетальной мезенхимой [2, 8], юкстгемангиобластными [7], фибробластоподобными клетками [2, 9]; клетки стромы стволых ворсин — миофибробластами [10, 11]. В последнее время появились отдельные работы, свидетельствующие о наличии в структурах плаценты так называемых телочитов [12–14].

Телочиты впервые описаны в стенке кишки как фибробластоподобные веретеновидные клетки, обладающие пейсмейкерной активностью, что обуславливает сокращение гладкомышечных клеток; предполагается, что в плаценте они, вероятно, регулируют сосудистый тонус [13, 15]. В работе L. Suciú и соавт. описаны телочиты в плаценте как клетки веретеновидной /звездчатой формы с ядром, окруженным тонким слоем цитоплазмы, 2–3 длинными тонкими отростками (диаметром 0,1–0,5 мкм), которыми они контактируют друг с другом и с другими клетками [12]. Кроме того, ранее нами было отмечено, что телочиты тесно связаны с ангиогенезом ворсинчатого дерева: в незрелых промежуточных ворсинах они ограничивают пространство формирующегося сосуда, а их повреждение вызывает снижение ангиогенеза и фиброзирование стромы [14]. Наличие фибробластической дифференцировки телочитов в строме ворсин плаценты при физиологической беременности свидетельствует о том, что телочиты стромы ворсин хориона обладают достаточной пластичностью, значительно меняясь под действием ряда факторов, в том числе гипоксии, оксидативного стресса, трансформируясь в фибробласты при увеличении концентрации провоспалительных цитокинов [14, 15]. В литературе описана способность телочитов регулировать ангиогенез и трансформироваться в фибробласты [16], что в свою очередь может представлять часть запрограммированного механизма при беременности плодом с аномалиями и патологией развития, при этом фиброзирование стромы ворсин, обуславливающее снижение ангиогенеза, может стать причиной плацентарной недостаточности и гибели плода. Кроме того, наличие слабой рассеянной инфильтрации лимфоцитами увеличенным количеством макрофагов может быть расценено как проявление хронического виллита, часто наблюдаемого при иммунном конфликте матери и плода [17, 18].

В строме ворсин плаценты менее 0,1% составляют мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, являющиеся недифференцированными мезенхимальными клетками, сохраняющие потенциал к развитию в одном или разных направлениях [2, 3, 5]. Считается, что наиболее специфичными маркерами мезенхимальных стволых клеток для выделения в культуре являются CD90, CD73, CD105, CD44 [5]. Учитывая, что морфология клеток может подвергаться изменениям в клеточной культу-

ре, то не всегда можно точно определить клеточную принадлежность (миофибробласты, фибробласты, телочиты, перичиты). Телочиты экспрессируют маркеры стволых клеток (C117, CD44, nestin, vimentin и др.) [13, 15] и, вероятно, могут являться частью клеток «нулевого» пассажа. Наряду с этим попытки культивирования образцов плаценты с гистологическими изменениями, в частности образцы плаценты с фиброзированной стромой ворсин, показали, что выход клеток в культуру крайне низкий, а в ряде случаев получить даже «нулевой» пассаж культуры не представлялось возможным [16].

Известно, что в опухолях различной локализации присутствуют клетки, экспрессирующие CD105, CD90, CD73 [19, 20]. Кроме того, в последнее время выполнен ряд работ, направленных на редактирование генома стволых клеток: в частности, A. Mark и соавт. опубликовали исследование по редактированию генома стволых клеток при серповидно-клеточной анемии [21], что свидетельствует о том, что *только* экспрессия иммуногистохимических маркеров не может являться единственным критерием для оценки функционального состояния стволых клеток; вероятно, на эти показатели влияет большее количество факторов. Малый выход клеток при культивировании из образцов ворсин хориона с наличием фиброзированной стромы может быть объяснен, в частности, «замуровыванием» клеток среди депозитов коллагена и нарушением их трофики. В нашем исследовании в строме ворсин в образцах плацент группы с врожденными пороками развития клеток с признаками телочитов не определялось.

Можно предположить, что телочиты являются регуляторами роста и дифференцировки ворсинчатого дерева, а в плаценте группы с врожденными пороками развития плода этот резерв значительно уменьшен или поврежден, что может влиять на функциональную активность стволых клеток. Появление бессосудистых ворсин в оптически плотной гиперклеточной строме промежуточных ворсин с выраженным склерозом, сниженным ангиогенезом получило название фетальной васкулопатии [2, 22], что может быть вероятной причиной плацентарной недостаточности и внутриутробной задержки роста плода.

### Ограничение исследования

В настоящем исследовании группа с врожденными пороками развития была достаточно гетерогенной: не всегда можно было исключить хромосомную патологию. Хотя при цитогенетическом анализе во время беременности и определялся нормальный кариотип, тем не менее не следует пренебрегать и мозаичными формами хромосомных и генетических нарушений [23], которые часто остаются нераспознаваемыми. Для их идентификации необходимо определение кариотипа разных тканей, а не только кариотипа лейкоцитов крови, как это делается согласно стандартной методике. Известно, что несоответствие кариотипа плаценты и кариотипа плода наблюдается до 5% случаев [23]. Нами были описаны случаи хромосомного мозаицизма даже у однояйцевых близнецов, в том числе у плодов из монохориальной триамниотической тройни [24]. Тканевой хромосомный мозаицизм плода и плаценты может быть нераспознанной причиной осложнений течения беременности, в том числе внутриутробной задержки роста плода [23, 25]. Морфологические изменения клеток стромы ворсин хориона образцов плаценты от матери с удвоением матки свидетельствуют о гораздо более тесных взаимовлияниях системы мать–плацента–плод.

### Заключение

В результате проведенного исследования установлены гистологические и ультраструктурные изменения плаценты при врожденных пороках развития плода: нарушение формирования ворсинчатого дерева плаценты преимущественно в виде задержки или ускорения созревания (относительно срока гестации), снижение васкуляризации ворсин и усиление фиброзирование стромы, значительные вариации размеров и формы интерстициальных клеток, длины и формы их цитоплазматических отростков, степени дистрофических изменений клеток, что является структурной основой нарушения взаимодействия в системе плацента—плод. Однако при врожденных пороках развития плода и матери выделять мезенхимальные стромальные клеточки из плаценты у таких пациентов нецелесообразно, и следует воспользоваться клетками донора. Для получения клеточной культуры необходимо тщательно подбирать плаценты, исключая образцы плацент с отягощенным акушерским анамнезом, соматической и врожденной патологией матери и плода. Вероятно, применения аутоклеток, культивируемых из других источников (например, из пуповинной крови), требует дополнительного изучения.

Таким образом, источником для культивирования мезенхимальных стромальных клеток ворсинчатого дерева плаценты является строма промежуточных и стволовых

ворсин плаценты. Исключение патологических изменений ворсинчатого дерева определяет необходимость проведения гистологического исследования образцов плаценты, что позволит отобрать образцы с патологическими изменениями, непригодные для культивирования.

### Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-25-00179.

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### Выражение признательности

Красному Алексею Михайловичу, руководителю лаборатории цитологии ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России за консультационную помощь в проведении иммуногистохимического исследования.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Щеголев А.И., Дубова Е.А., Павлов К.А. *Морфология плаценты*. — М.; 2010. — 48 с. [Shchegolev AI, Dubova EA, Pavlov KA. *Morfologiya platsenty*. Moscow; 2010. 48 p. (In Russ).]
2. Benirschke K, Burton GJ, Waergen RN, eds. *Pathology of human placenta*. 6th ed. New York (NY): Springer; 2012. 941 p. doi: 10.1007/978-3-642-23941-0.
3. Полтавцева Р.А., Бобкова Н.В., Самохин А.Н., Сухих Г.Т. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных и нейтральных стволовых клеток человека на память мышей с нейродегенерацией альцгеймеровского типа / Материалы II Национального конгресса по регенеративной медицине. Москва, 3–5 декабря 2015. — С. 148–149. [Poltavtseva RA, Bobkova NV, Samokhin AN, Sukhikh GT. Vliyaniye transplantatsii mul'tipotentnykh mezenkhimal'nykh i neiral'nykh stvolovykh kletok cheloveka na pamyat' myshei s neurodegeneratsiei al'tsgeimerovskogo tipa. (Congress proceedigs) II national congress on regenerative medicine; 2015 Dec 3–5; Moscow. p. 148–149. (In Russ).] Доступно по: [http://www.mediexpo.ru/fileadmin/user\\_upload/content/pdf/thesis/thesis\\_nkrm2015.pdf](http://www.mediexpo.ru/fileadmin/user_upload/content/pdf/thesis/thesis_nkrm2015.pdf). Ссылка активна на 12.12.2016.
4. Romanov YA, Balashova EE, Volgina NE, et al. Optimized protocol for isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from human umbilical cord. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;160(1):148–154. doi: 10.1007/s10517-015-3116-1.
5. Rylova YV, Milovanova NV, Gordeeva MN, Savilova AM. Characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells from human terminal placenta. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;159(2):253–257. doi: 10.1007/s10517-015-2935-4.
6. Сухачева Т.В., Егорова И.Ф., Серов Р.А. Морфологические особенности миокарда правого предсердия больных ишемической болезнью сердца // *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН: Сердечно-сосудистые заболевания*. — 2005. — Т.6. — №5 — С. 13–19. [Sukhacheva TV, Egorova IF, Serov RA. Morfologicheskie osobennosti miokarda pravogo predserdiya bol'nykh ishemicheskoi bolezniyu serdtsa. *Serdечно-sosudistye zabolovaniya: Byulleten' NTSSKh im. A.N. Bakuleva RAMN*. 2005;6(5):13–19. (In Russ).]
7. King BF. Ultrastructural and differentiation of stromal and vascular components in early macaque placental villi. *Am J Anat*. 1987;178(1):30–44. doi: 10.1002/aja.1001780105.
8. Challier JC, Galtier M, Kacemi A, Guillaumin D. Pericytes of term human foeto-placental microvessels: ultrastructure and visualization. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)*. 1999;45(1):89–100.
9. Castellucci M, Kaufmann P. A three-dimensional study of the normal human placental villous core: II. Stromal architecture. *Placenta*. 1982;3(3):269–285. doi: 10.1016/s0143-4004(82)80004-0.
10. Feller AC, Schneider H, Schmidt D, Parwaresch MR. Myofibroblast as a major cellular constituent of villous stroma in human placenta. *Placenta*. 1985;6(5):405–415. doi: 10.1016/s0143-4004(85)80017-5.
11. Kohlen G, Kertschanska S, Demir R, Kaufmann P. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol*. 1996;105(6):415–429. doi: 10.1007/bf01457655.
12. Suci L, Popescu LM, Gherghiceanu M, et al. Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(5):325–339. doi: 10.1159/000319467.
13. Низяева Н.В., Щеголев А.И., Марей М.В., Сухих Г.Т. Интерстициальные пейсмекерные клеточки // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2014. — Т.69. — №7–8 — С. 17–24. [Nizyaeva NV, Marei MV, Sukhikh GT, Shchegolev AI. Interstitial pacemaker cells. 2014;69(7–8):17–24. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2014;69(7–8):17–24. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn.v69i7-8.1105.
14. Nizyaeva N, Sukhacheva T, Kulikova G, et al. Ultrastructure features of placenta villi in cases of preeclampsia. *Virchows Arch*. 2016;469(Suppl 1):S184.
15. Popescu LM, Nicolescu MI. Chapter 11 - *Telocytes and stem cells*. In: Goldenberg RCS, de Carvalho ACC, editors. *Resident stem cells regenerative therapy*. Elsevier Inc: Academic Press; 2013. pp. 205–231.
16. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García PM, et al. Telocytes as a source of progenitor cells in regeneration and repair through granulation tissue. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(5):395–403. doi: 10.2174/1574888X10666151001115111.

17. Низяева Н.В., Наговицына М.Н., Куликова Г.В., и др. Условия получения образцов ткани плаценты для культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2016. — Т. 162. — № 10 — С. 500–506. [Nizyaeva NV, Nagovitsyna MN, Kulikova GV, et al. The conditions taking samples from placenta tissue for following cultivation of multipotent mesenchymal stromal cells. *Bull Eksp Biol Med*. 2016;162(10):500–506. (in Russ)].
18. Kim MJ, Romero R, Kim CJ, et al. Villitis of unknown etiology is associated with a distinct pattern of chemokine up-regulation in the fetomaternal and placental compartments: implications for conjoint maternal allograft rejection and maternal anti-fetal graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2009;182(6):3919–3927. doi: 10.4049/jimmunol.0803834.
19. Gao Z, Dong K, Zhang H. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:460654. doi: 10.1155/2014/460654.
20. Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biol*. 2016;37(9):11611–11622. doi: 10.1007/s13277-016-5112-0.
21. Mark A, DeWitt MA, Magis W, Bray NL, et al. Selection — free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*. 2016;8(360):360ra134. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9336.
22. Redline RW. Villitis of unknown etiology: noninfectious chronic villitis in the placenta. *Hum Pathol*. 2007;38(10):1439–1446. doi: 10.1016/j.humpath.2007.05.025.
23. Андропова Н.В., Зарецкая Н.В., Ходжаева З.С., и др. Патология плаценты при хромосомных аномалиях у плода // *Акушерство и гинекология*. — 2014. — №3 — С. 4–8. [Andronova NV, Zaretskaya NV, Khodzhaeva ZS, et al. Placental pathology in fetal chromosome abnormalities. *Akush Ginekol (Mosk)*. 2014;(3):4–8. (In Russ).]
24. Зарецкая Н.В., Муравенко О.В., Низяева Н.В., и др. Соматический тканевой хромосомный мозаицизм у монозиготной тройни в сочетании с ранней преэклампсией // *Акушерство и гинекология*. — 2016. — №7 — С. 111–118. [Zaretskaya NV, Muravenko OV, Nizyaeva NV, et al. Somatic tissue chromosomal mosaicism in monozygotic triplets concurrent with early pre-eclampsia. *Akush Ginekol (Mosk)*. 2016;(7):111–118. (In Russ).] doi: 10.18565/aig.2016.7.111-118.
25. Туманова У.Н., Низяева Н.В., Шувалова М.П., Щеголев А.И. Роль патологии плаценты в развитии перинатальной смерти от врожденных аномалий / Сборник тезисов Всероссийской конференции: «Мать и дитя». Москва, 27–30 сентября, 2016. — С. 107–108. [Tumanova UN, Nizyaeva NV, Shuvalova MP, Shchegolev AI. Rol' patologii platsenty v razvitií perinatal'noi smerti ot vrozhdennykh anomalii. (Conference proceedings) Russian Conference: «Mother and child». 2016 Sep 27–30; Moscow. p. 107–108. (In Russ).] Доступно по: [http://mediexpo.ru/fileadmin/user\\_upload/content/pdf/thesis/thesis\\_md16.pdf](http://mediexpo.ru/fileadmin/user_upload/content/pdf/thesis/thesis_md16.pdf). Ссылка активна на 12.12.2016.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Низяева Наталья Викторовна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, тел.: +7 (495) 438-23-11, e-mail: nizyaeva@gmail.com,  
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5592-5690>, SPIN-код: 9893-2630

**Сухачёва Татьяна Владимировна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела патологической анатомии НЦССХ им. А.Н. Бакулева Минздрава РФ  
 Адрес: 121552, Москва, Рублевское ш., д. 135, e-mail: tatiana@box.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6127-8688>, SPIN: 9948-1550

**Куликова Галина Викторовна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, тел.: +7 (495) 438-23-11, e-mail: Gvlikikova@gmail.com,  
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0594-955X>, SPIN-код: 9533-2649

**Кан Наталья Енкыновна**, доктор медицинских наук, заведующая акушерским наблюдательным отделением ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, тел.: +7 (495) 438-85-08, e-mail: n\_kan@oparina4.ru,  
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5087-5946>, SPIN-код: 5378-8437

**Баев Олег Радомирович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий родильным отделением ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, e-mail: o\_baev@oparina4.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8572-1971>,  
 SPIN-код: 5058-7295

**Павлович Станислав Владиславович**, кандидат медицинских наук, доцент, ученый секретарь ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России; заведующий учебной частью, профессор кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ИПО ФГБОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, тел.: +7 (495) 531-44-44, e-mail: s\_pavlovich@oparina4.ru,  
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1313-7079>, SPIN-код: 2465-1317

**Серов Роман Андреевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом патологической анатомии НЦССХ им. А.Н. Бакулева Минздрава РФ  
 Адрес: 121552, Москва Рублевское ш., д. 135, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7962-7273>, SPIN-код: 7946-0329

**Щеголев Александр Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий патологоанатомическим отделением ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, тел.: +7 (495) 438-23-11, e-mail: ashegolev@oparina4.ru,  
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2111-1530>, SPIN-код: 9061-5983

**Полтавцева Римма Алексеевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, e-mail: rimpol@mail.ru

**Наговицына Марина Николаевна**, младший научный сотрудник патологоанатомического отделения ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России  
 Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, тел.: +7 (495) 438-23-11, e-mail: moremore84@mail.ru,  
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8039-6217>, SPIN-код: 1602-8865