

## Особенности морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона мыши на ранних сроках экспериментального невынашивания беременности

К.А. Артемьева<sup>1</sup>, И.М. Богданова<sup>1</sup>, И.И. Степанова<sup>1</sup>, М.Н. Болтовская<sup>1</sup>, А.А. Степанов<sup>1</sup>,  
Е.А. Пономаренко<sup>1</sup>, О.В. Калюжин<sup>2</sup>, А.Е. Земляков<sup>3</sup>, С.В. Дамбаева<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

<sup>4</sup> Университет медицины и науки имени Розалинд Франклин, Северный Чикаго, США

**Введение.** Основная доля случаев привычного невынашивания беременности тесно связана с нарушениями материнской иммунной толерантности. Для изучения патогенеза ранних репродуктивных потерь широко используются экспериментальные модели аборт у мышей, на которых установлены критические сроки, определяющие прогрессирование беременности. Однако взаимосвязь развития эмбриона и экстраэмбриональных структур с иммунным микроокружением изучена недостаточно. Цель исследования – сравнительная оценка морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона в ранние сроки беременности при экспериментальных спонтанных, индуцированных и потенцированных абортах.

**Материалы и методы.** Для воспроизведения аллогенной физиологической беременности использовали комбинацию мышей ♀СВА×♂BALB/c, спонтанные аборты воспроизводили при скрещивании ♀СВА×♂DBA/2. Иммунозависимые индуцированные или потенцированные аборты моделировали, соответственно, в комбинациях ♀СВА×♂BALB/c или ♀СВА×♂DBA/2 внутрибрюшинным введением иммуномодулятора β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) на 5-й и 7-й день гестации. Мышей выводили из эксперимента на 8-й день беременности, выделяли рога матки и маточно-плацентарные единицы. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и проводили стандартную обработку для гистологического исследования. На препаратах экваториальных срезов измеряли площадь сечения маточно-плацентарных единиц, анализировали материнские, зародышевые и внезародышевые структуры. Для выявления макрофагов проводили иммуногистохимическую реакцию с кроличьими поликлональными анти-CD68 антителами, определяли плотность CD68<sup>+</sup> клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади децидуальной оболочки.

**Результаты.** На 8-й день беременности отмечали уменьшение площади поперечного сечения маточно-плацентарных единиц в группах индуцированных и потенцированных аборт по сравнению с физиологической беременностью и спонтанными абортами. При спонтанных абортах наблюдали окклюзированные материнские сосуды, окруженные отечными и вакуолизированными клетками трофобласта, при индуцированных и потенцированных абортах – расширение сосудов в зоне мезометриальной decidua и застой крови в них, уплотнение трофобласта и кровоизлияния в decidua basalis. На раннем сроке моделирования спонтанных и иммунозависимых аборт выявляли нарушения в развитии эмбриона и экстраэмбриональных структур от начальных признаков резорбции до полного разрушения зародыша и мембран.

Показатели плотности CD68<sup>+</sup> макрофагов в децидуальной оболочке маточно-плацентарных единиц жизнеспособных эмбрионов при всех вариантах невынашивания беременности статистически значимо не различались, при резорбции эмбрионов CD68<sup>+</sup> клетки не выявлялись.

**Заключение.** Воздействие иммуномодулятора С7МДП в гестационных сроках 5 и 7 суток (после завершения имплантации и до формирования зрелой плаценты), индуцирующее и потенцирующее аборты у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c и DBA/2, соответственно, приводит к уменьшению площади маточно-плацентарных единиц, гемоциркуляторным расстройствам в децидуальной оболочке, нарушениям морфогенеза хориона и развития эмбриона вплоть до его полной резорбции, отсутствию CD68<sup>+</sup> макрофагов в микроокружении резорбированных эмбрионов на 8-й день беременности.

**Ключевые слова:** невынашивание беременности, модели, β-гептилгликозид мурамилдипептида, маточно-плацентарная единица, макрофаги, иммунотолерантность

**Для корреспонденции:** Ксения Александровна Артемьева. E-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru

**Для цитирования:** Артемьева К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Степанов А.А., Пономаренко Е.А., Калюжин О.В., Земляков А.Е., Дамбаева С.В. Особенности морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона мыши на ранних сроках экспериментального невынашивания беременности. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):50–60. DOI:10.31088/SEM2020.9.3.50-60

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А17-117013050049-3).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 18.05.2020. Получена после рецензирования 03.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Morphofunctional features of the uteroplacental unit and mouse embryo in the early stages of experimental miscarriage

K.A. Artemyeva<sup>1</sup>, I.M. Bogdanova<sup>1</sup>, I.I. Stepanova<sup>1</sup>, M.N. Boltovskaya<sup>1</sup>, A.A. Stepanov<sup>1</sup>, E.A. Ponomarenko<sup>1</sup>, O.V. Kalyuzhin<sup>2</sup>, A.E. Zemlyakov<sup>3</sup>, S.V. Dambaeva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

<sup>3</sup>V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

<sup>4</sup>Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, USA

**Introduction.** The majority of cases of habitual miscarriage are closely related to impaired maternal immune tolerance. Experimental mice models of abortion, where the critical time points are established to monitor pregnancy progression, are widely used to study the pathogenesis of early reproductive loss. However, the relationship between the embryonic development and extraembryonic structures with the immune microenvironment is not well understood. The aim of the study is to compare the morphofunctional characteristics of the uteroplacental unit and embryo in early pregnancy in mice with experimental spontaneous, induced, and potentiated abortions.

**Materials and methods.** Allogeneic physiological pregnancy was modeled using ♀CBA × ♂BALB/c mice mating. Spontaneous abortions were reproduced by mating ♀CBA × ♂DBA/2 mice. Induced abortions and potentiated abortions were triggered by intraperitoneal administration of the immunomodulator β-heptylglycoside muramyl dipeptide (MDP) to pregnant females on gestation day (gd) 5 and gd 7 mated in following combinations ♀CBA × ♂BALB/c and ♀CBA × ♂DBA/2, respectively. Mice were withdrawn from the experiment on gd 8, then uterine horns and uteroplacental units were isolated. The material was fixed in 10% neutral formalin, and standard processing was performed for histological examination. In equatorial sections, the cross-sectional area of uteroplacental unit was measured, and maternal, embryonic, as well as extraembryonic structures were analyzed. An immunohistochemical assay with rabbit polyclonal anti-CD68 antibodies was conducted to detect macrophages, then the density of CD68<sup>+</sup> cells per 1 mm<sup>2</sup> of the decidual area was determined.

**Results.** On day 8 of pregnancy, in the groups of induced and potentiated abortions cross-sectional area of the uteroplacental units was decreased compared with the groups of physiological pregnancy and spontaneous abortions. Induced and potentiated abortions demonstrated vasodilation in the mesometric decidua zone and stagnation of blood in the blood vessels, compaction of trophoblast, and hemorrhage in decidua basalis whether spontaneous abortions showed occluded maternal vessels surrounded by edematous and vacuolated trophoblast cells.

At the early stages of modeling of spontaneous and immuno-dependent abortions, disturbances in the development of the embryo and extraembryonic structures were revealed, ranging from initial signs of resorption to the destruction of the embryo and membranes.

In viable embryos, density indices of CD68<sup>+</sup> macrophages in the decidual membrane of the uteroplacental units did not differ significantly in all miscarriage cases, CD68<sup>+</sup> cells were not detected in cases of embryonal resorption.

**Conclusions.** The MDP treatment in a period after completion of implantation and before forming a mature placenta (gd 5–7) results in the inducing or the potentiating abortions in CBA females mated with by Balb/c or DBA/2 males, respectively. In both cases, we revealed disturbed chorion morphogenesis and embryonic development to the extent of its complete resorption and the absence of CD68<sup>+</sup> macrophages in resorbed embryos' microenvironment on day 8 of pregnancy.

**Keywords:** miscarriage, models, muramyl dipeptide β-heptylglycoside, uteroplacental unit, macrophages, immunotolerance

**For citation:** Artemyeva K.A., Bogdanova I.M., Stepanova I.I., Boltovskaya M.N., Stepanov A.A., Ponomarenko E.A., Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E., Dambaeva S.V. Morpho functional features of the uteroplacental unit and mouse embryo in the early stages of experimental miscarriage. Clin. exp. morphol. 2020;9(3):50–60 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.50-60

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A17-117013050049-3).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 18.05.2020. **Received in revised form** 03.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

Самопроизвольный аборт является наиболее частой патологией беременности у человека. Около 10–15% беременностей заканчивается выкидышами в течение первого триместра, 1–5% ранних репродуктивных потерь составляют привычные самопроизвольные аборты (как минимум три последовательных выкидыша до 20 недель беременности) [1]. Основная доля случаев привычного невынашивания связана с нарушениями материнской иммунной толерантности, особенно с местными иммунными реакциями в маточно-плацентарной области [2–5]. Макрофаги (МФ) представляют вторую по численности (20–30%) после естественных киллерных клеток (70% в ранние сроки беременности) популяцию децидуальных лейкоцитов, число которых остается относительно постоянным в течение всего срока гестации. Децидуальные МФ локализованы в тесной ассоциации с инвазирующим трофобластом, взаимодействие с которым осуществляется через связывание лигандов, представленных на клетках трофобласта с соответствующими рецепторами, экспрессируемыми на МФ. Макрофаги материнского и фетального происхождения играют важную роль на всех стадиях гестационного процесса, включая децидуализацию стромы эндометрия, имплантацию эмбриона, формирование плаценты, роды и последующую инволюцию матки. Состояние активации и функции МФ в маточно-плацентарной зоне зависит от локального тканевого микроокружения. Нарушения в маточном микроокружении, особенно на ранних сроках беременности, могут влиять на активность МФ и приводить к осложнениям и неблагоприятному исходу беременности [6]. Важными характеристиками МФ являются их функциональная гетерогенность, то есть способность опосредовать воспалительную и противовоспалительную функции, и высокая степень пластичности, о чем свидетельствует способность МФ изменять фенотип и статус активации для поддержания специфической функциональной программы под действием сигналов микроокружения. При взаимодействии с локальным микроокружением некоммутированные МФ моноцитарного происхождения могут быть примированы соответствующими цитокинами и поляризованы в две основные популяции с разными фенотипическими и функциональными характеристиками – классически активированные М1 МФ и альтернативно активированные М2 МФ. Индукторами М1 МФ являются цитокины Т-клеток хелперов (ТХ)-1, таких как интерферон- $\gamma$  и бактериальный липополисахарид. М1 МФ вырабатывают и секретируют

высокий уровень провоспалительных цитокинов, в том числе фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкины ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-23 и экспрессируют хемокиновые рецепторы CCR1 и CCR5 [7]. Альтернативную активацию МФ индуцируют цитокины ТХ-2, главным образом ИЛ-4 и ИЛ-13. Цитокины, ростовые факторы и протеазы, секретируемые М2 МФ, участвуют в тканевом ремоделировании и создании материнской толерантности к антигенам трофобласта, а также в его дифференцировке. Клетки трофобласта секретируют различные хемокины, которые способны специфически привлекать МФ [8]. *In vivo* МФ, локализованные в decidua basalis в тесной близости с трофобластом, имеют характерные признаки, ассоциированные с альтернативной М2 активацией, включая экспрессию таких маркеров, как Stabilin-1, FХIIIa, VEGF и IL-10 [9]. Способность децидуальных МФ ремоделировать ткани и секретировать более 100 ростовых факторов и цитокинов дает основания предполагать их участие в таких процессах, как регуляция активности клеток иммунной системы, инвазия цитотрофобласта, ангиогенез и тканевое ремоделирование. Альтернативно активированный статус децидуальных МФ свидетельствует об их важной роли в регуляции воспалительного ответа, супрессии материнского иммунного ответа на фетальные антигены и индукции толерантности. Нарушение процессов дифференцировки, поляризации и активации маточных МФ в локальном микроокружении тесно связано с патофизиологией беременности [10].

Даже в случаях сохранения плода ранние гестационные экзо- и эндогенные нарушения в материнском организме, в том числе иммунные, могут негативно влиять на формирование плаценты и впоследствии приводить к плацентарной недостаточности [11]. Некоторые исследования показали, что малая площадь поверхности плаценты и ее низкая масса связаны с задержкой развития плода, перинатальной заболеваемостью и смертностью. Определение при ультразвуковом исследовании таких параметров, как площадь поверхности, объем и масса плаценты по отношению к массе тела плода, могут помочь в скрининговой диагностике задержки его роста и развития [12–14].

Для изучения механизмов невынашивания беременности широко используются модели на мышах, обладающих сходными с человеком гемохориальным типом плаценты, характером материнского и плодного кровообращения, структурой маточно-плацентарной области [15, 16]. На моделях установлен критический

период (E8.5–E9.5), определяющий прогрессирование беременности – от формирования хориоаллантоисной плаценты до начала фетального кровообращения. Нарушение координации между темпами развития эмбриона и экстраэмбриональных структур (трофобласта и производных мезодермы) может стать причиной гибели зародыша, хотя внеэмбриональные структуры могут сохраняться в течение некоторого времени [17]. С целью разработки и оценки эффективности методов коррекции иммунозависимого невынашивания нами были созданы модели индуцированных и потенцированных абортотворных с высокой частотой эмбриональных потерь, вызванных введением самкам мышьяк β-гептилгликозида мурамилдипептида (С7МДП) – вещества с четко определенным механизмом иммуномодулирующего действия [18]. Однако структура маточно-плацентарных единиц, развитие эмбрионов, формирование плаценты на ранних сроках после иммуномодулирующего воздействия не исследованы. Цель работы – сравнительная оценка морфофункционального состояния маточно-плацентарной единицы и эмбриона в ранние сроки беременности при спонтанных, индуцированных и потенцированных абортотворных.

## Материалы и методы исследования

### *Моделирование физиологической беременности, спонтанных и мурамилдипептид-зависимых абортотворных*

В исследовании использовали самок линии СВА (Н-2к) и самцов линий DBA/2 (Н-2d), Balb/c (Н-2d) с массой тела 20–25 граммов, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к лабораторному корму и воде. Эксперименты осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года, и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), а также правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267). На проведение исследования было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 6 А от 19 октября 2009 года).

Моделирование прогрессирующей аллогенной беременности и вариантов ее невынашивания проводили, как описано ранее [18]. Коротко, для получения датированной беременности самок в стадии проэструс–эструс подсаживали на ночь к самцам в соотношении 3:1. День появления копулятивной пробки обозначали как 1-й день гестации (ДГ). Физиологическую беременность получали комбинацией ♀СВА×♂Balb/c, спонтанные абортотворные – скрещиванием ♀СВА×♂DBA/2, индуцированные абортотворные – внутрибрюшинным введением С7МДП самкам СВА, оплодотворенным самцами Balb/c, на 5-й

ДГ (завершение имплантации) и 7-й ДГ (до образования хориоаллантоисной плаценты) в дозе 20 мкг в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl на одно животное (≈1 мг/кг), потенцированные абортотворные – введением С7МДП по той же схеме самкам СВА, оплодотворенным самцами DBA/2.

Выведение мышей из эксперимента проводили на 8-й ДГ (начало формирования лабиринта плаценты) путем цервикальной дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом.

### *Гистологические и иммуногистохимические методы*

После выведения животных из эксперимента выделяли рога матки, маточно-плацентарные единицы (МПЕ). Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, после стандартной гистологической проводки в гистопроцессоре Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США), заливали в парафин на приборе Tissue-Tek TEC (Sakura, США), изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США) после депарафинирования окрашивали их гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия).

Общую популяцию макрофагов выявляли методом иммуногистохимического окрашивания с использованием кроличьих поликлональных анти-CD68 антител (1:100, ab 125212, Abcam, Великобритания) и системы детекции Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer/DAB Plus Chromogen (TL-015-ND, Thermo Scientific, Великобритания). По окончании инкубации с антителами срезы докрасивали гематоксилином Майера.

### *Морфометрические методы*

Морфометрическое исследование выполняли на микроскопе Leica DM 2500 с цифровой фотокамерой с использованием программы ImageScopeM (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Площадь экваториального поперечного сечения МПЕ измеряли при помощи графического планшета. В маточно-плацентарных единицах анализировали стенку матки, децидуальную оболочку, зародышевые и внезародышевые структуры. Подсчитывали плотность CD68<sup>+</sup> клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади децидуальной оболочки при ×200.

### *Статистическая обработка результатов*

Данные анализировали в программе Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., США). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Использовали метод парных сравнений. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Анализ распределения площади экваториальных срезов МПЕ (табл. 1) позволил выявить исходно высокий



Площадь среза маточно-плацентарных единиц, мм<sup>2</sup>, Me (Q1;Q3) |  
 Uteroplacental units section area, mm<sup>2</sup>, Me (Q1; Q3)

Физиологическая беременность   Physiological pregnancy (n=30)	Спонтанные аборт   Spontaneous abortion (n=24)	Индукцированные аборт   Induced abortion (n=24)	Потенцированные аборт   Potentiated abortion (n=23)
3,52 (3,3; 3,6)	7,82 (5,03; 8,93)	2,65 (1,42; 3,96)	3,9 (3,44; 4,48)
Статистическая значимость   Statistical significance p1-2<0,001 p1-3=0,03 p2-4=0,002 p3-4=0,027			

показатель в группе спонтанных абортов в сравнении с группой физиологической беременности. Очевидно, это объясняется индивидуально-линейными различиями самцов в комбинациях DBA/2 и Balb/c, соответственно. Иммуномодулирующее воздействие приводило к значимому уменьшению площади среза МПЕ как в группе индуцированных абортов по сравнению с физиологической беременностью, так и в группе потенцированных абортов по сравнению со спонтанными. Возможно, это отражает нарушения плацентации и развития эмбриона.

Низкая площадь поверхности плаценты является одним из морфометрических параметров, достоверно связанным с гипоксемией, гипогликемией и задержкой внутриутробного развития и роста плода [19, 20]. Вероятно, выраженное уменьшение площади плаценты на ранних сроках может привести не только к замедлению роста, но и к гибели эмбриона вследствие нарушения функций, выполняемых этим органом.

Структура МПЕ при физиологической беременности представлена слоем миометрия, мезометриальной и антимезометриальной decidua (рис. 1 А), трофобластом и первичными гигантскими клетками трофобласта. В маточно-плацентарных единицах самок со спонтанными абортами наблюдали окклюзированные материнские сосуды, окруженные отечными и вакуолизированными клетками трофобласта (рис. 1 В). При индуцированных и потенцированных абортах отмечены расширение сосудов в зоне мезометриальной decidua (вплоть до формирования гигантских полостей) и застой крови в них, а также конденсация трофобласта и геморрагии в decidua basalis (рис. 1 С, D, E). В просвете маточной крипты в некоторых случаях наблюдали значительное скопление лимфоцитов (рис. 1 F).

Для развивающейся беременности характерны наличие полноценного эмбриона и сохранность зародышевых листков. На сроке 8 ДГ хорошо различается мембрана Рейхерта, эктоплацентарный конус имеет характерную заостренную форму. Четко визуализированы гигантские клетки трофобласта, расположенные по периметру эмбриональной полости на границе с decidua basalis (рис. 2 А).

У самок с самопроизвольным, индуцированным и потенцированным невынашиванием беременности

наблюдали начальные признаки резорбции эмбриона [21], такие как задержка роста с небольшой зародышевой полостью (рис. 2 В), выраженные нарушения строения эктоплацентарного конуса – уплощение (рис. 2 В, С) или исчезновение (рис. 2 D). В ряде случаев отмечали отсутствие структур эмбриона, за исключением мембраны Рейхерта (рис. 2 E), полное разрушение зародыша, заполнение эмбриональной полости аморфным клеточным материалом и единичными гигантскими клетками трофобласта с вакуолизированной цитоплазмой (рис. 2 F), исчезновение эмбриональных полостей. D.A. Clark et al. также отмечали начало резорбции эмбриона на модели спонтанных абортов в сроке E 8.5 [22].

Выявленные на моделях спонтанных и иммунозависимых абортов нарушения эмбриогенеза и формирования экстраэмбриональных структур можно рассматривать как эмбриохориальную недостаточность – сочетанную патологическую реакцию эмбриона и экстраэмбриональных структур на различные экзо- и эндогенные нарушения материнского организма. У женщин нарушения эмбриогенеза и морфогенеза хориона в сроках до 9 недель гестации являются причиной потери беременности или ее осложнений, перинатальной заболеваемости и летальности [11].

Механизмы гибели плода до конца не выяснены. На модели спонтанных абортов показано, что усиление продукции провоспалительных цитокинов приводит к активации протромбиназы fg12, вызывающей нарушения гемодинамики в материнских сосудах и ишемию плаценты [22, 23]. Высокий уровень резорбции эмбрионов при индуцированном и потенцированном невынашивании беременности (46,7 и 50,0%, соответственно) уже через 72 часа после начала воздействия иммуномодулятора, очевидно, обусловлен способностью С7МДП стимулировать клеточный иммунный ответ и дифференцировку ТХ в направлении ТХ1 [24]. Показатели частоты резорбции на 8-й ДГ практически совпадали с нашими результатами определения уровня эмбриональных потерь при индуцированных и потенцированных абортах на 14-й ДГ [18, 24].

В случаях сохранения эмбриона наблюдаемые на ранних сроках беременности нарушения строения или отсутствие эктоплацентарного конуса, клетки которого

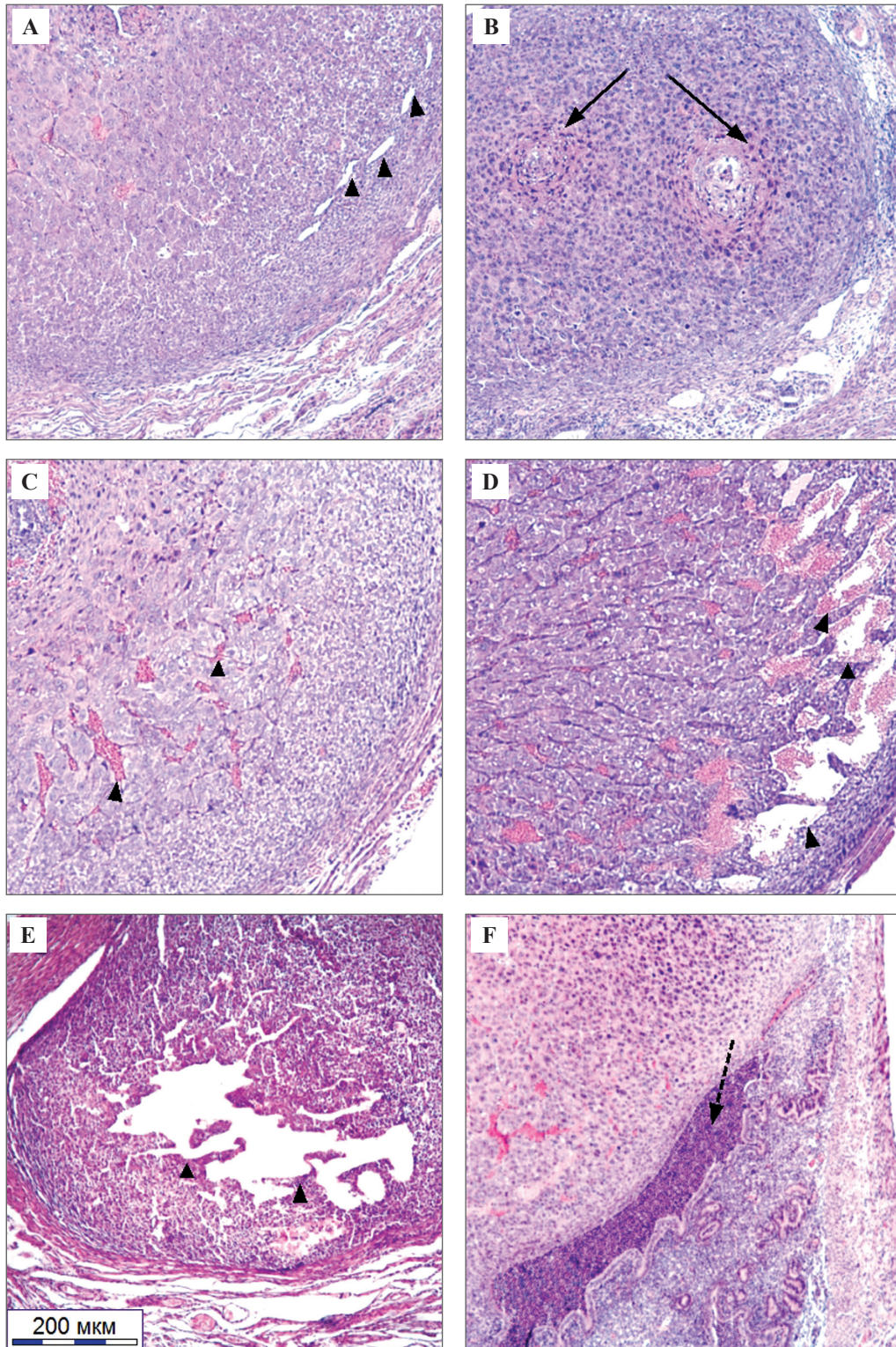


Рис. 1. Строение маточно-плацентарной единицы самок мышей СВА на 8-й день гестации.

А – физиологическая беременность, В – спонтанные аборты, С, Е – индуцированные аборты, D, F – потенцированные аборты. Сплошные стрелки – окклюзированные материнские сосуды, окруженные отечными и вакуолизированными клетками трофобласта, пунктирная стрелка – скопление лимфоцитов в просвете маточной крипты, наконечники стрелок – материнские лакуны. Окрасивание гематоксилином и эозином,  $\times 50$

Fig. 1. The uteroplacental units structure in CBA mice on the gestation day 8.

A – physiological pregnancy, B – spontaneous abortion, C, E – induced abortion, D, F – potentiated abortion. The solid arrows indicate the occluded maternal vessels surrounded by edematous and vacuolated cells, the dotted arrow indicates is the accumulation of lymphocytes in the lumen of the uterine crypt, and the arrowheads demonstrate the mother's lacunae. H&E stain,  $\times 50$



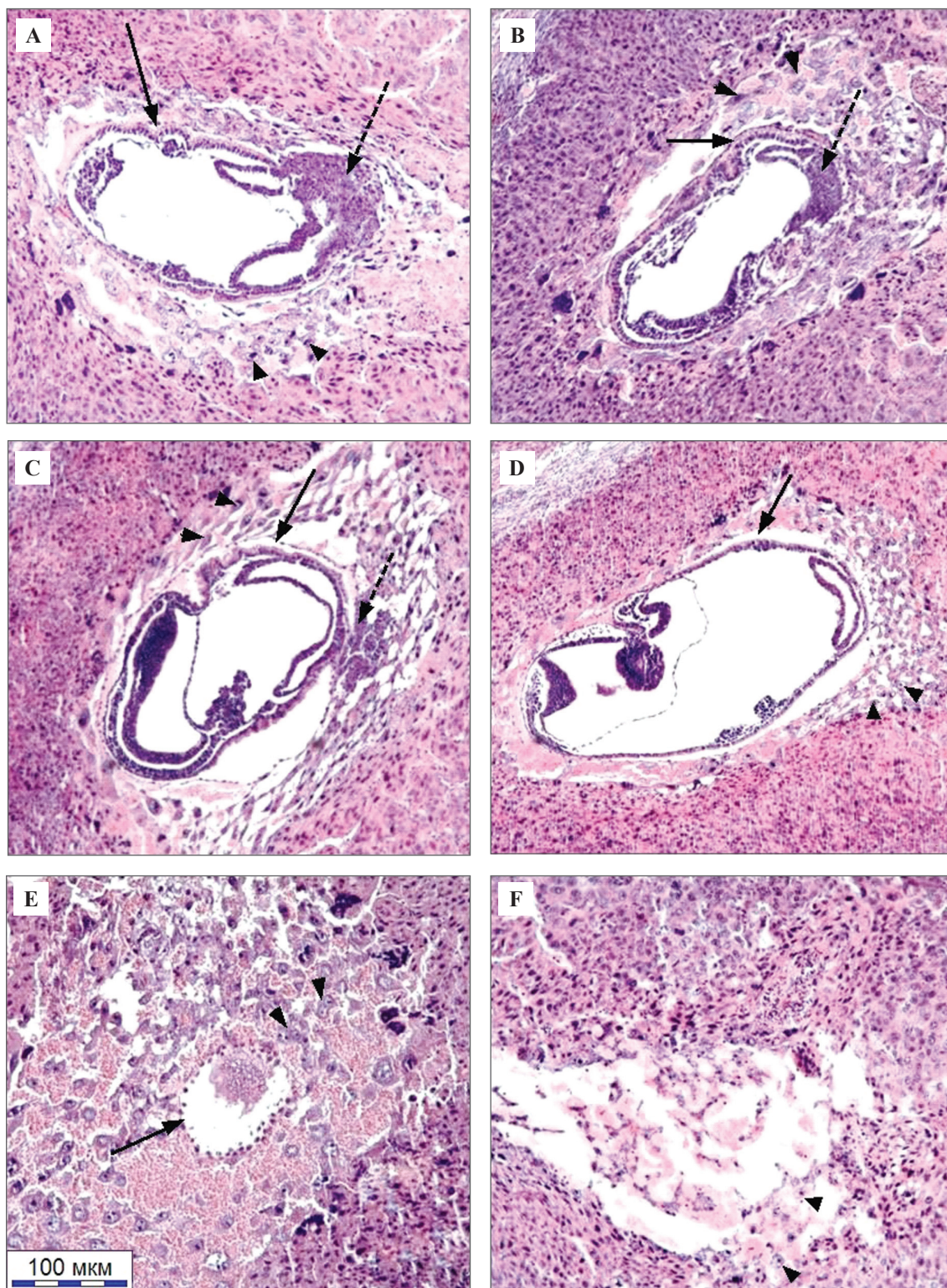


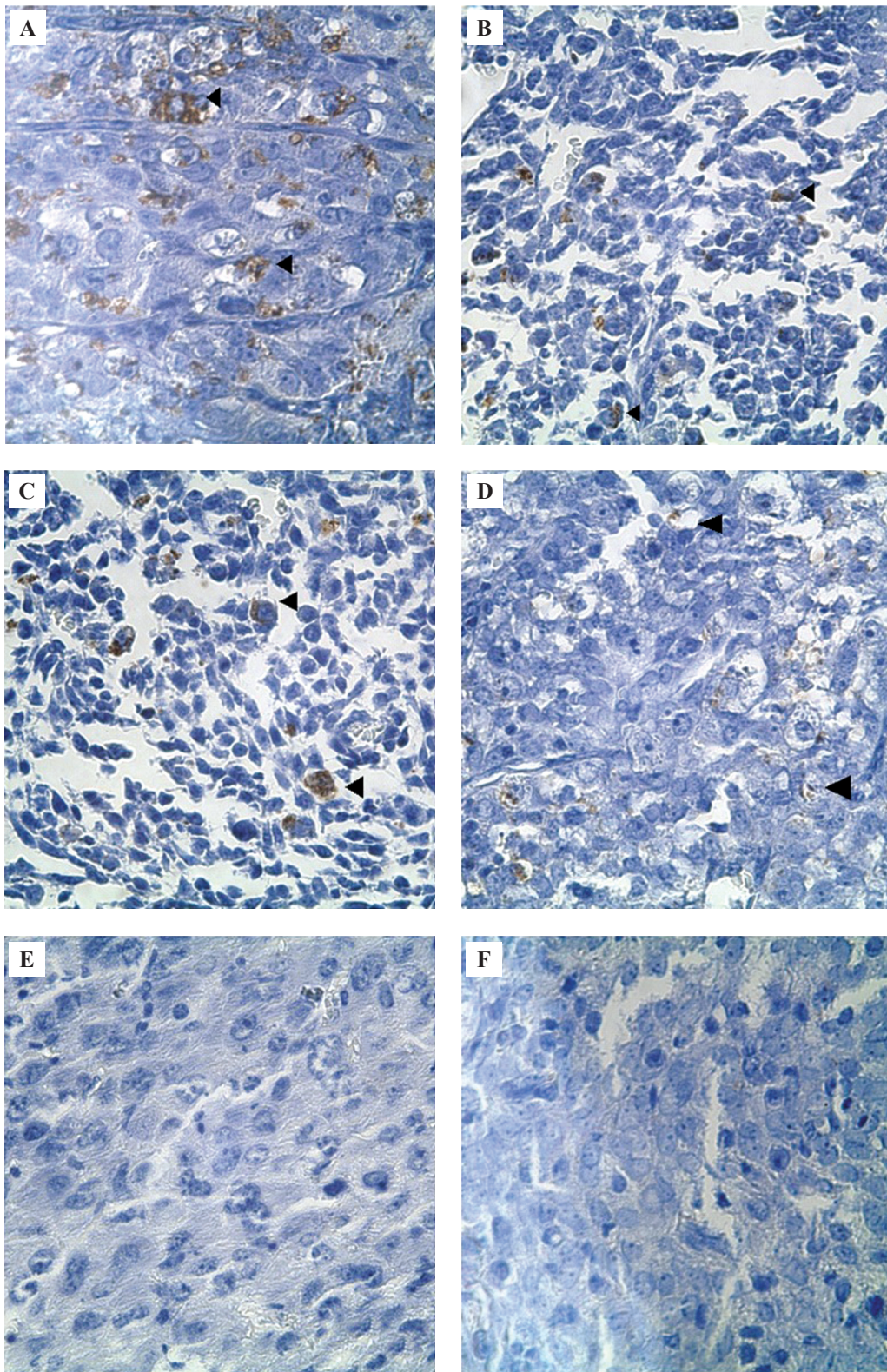
Рис. 2. Сайты имплантации на 8-й день гестации.

А – физиологическая беременность, В – спонтанные аборты, С, Е – индуцированные аборты, D, F – потенцированные аборты. Сплошные стрелки – мембрана Рейхерта, пунктирные стрелки – эктоплацентарный конус, наконечники стрелок – первичные гигантские клетки трофобласта. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Fig. 2. Implantation sites on the gestation day 8.

A – physiological pregnancy, B – spontaneous abortion, C, E – induced abortion, D, F – potentiated abortion. The solid arrows indicate Reichert's membrane, dotted arrows show an ectoplacental cone, arrowheads demonstrate primary giant trophoblast cells. H&E stain,  $\times 100$





*Рис. 3.* Распределение CD68<sup>+</sup> клеток в децидуальной оболочке жизнеспособных (А–D) и резорбированных (Е–F) эмбрионов. А – физиологическая беременность, В – спонтанные аборты, С – индуцированные аборты, D – потенцированные аборты, Е, F – decidua резорбированных эмбрионов. Наконечники стрелок – CD68<sup>+</sup> клетки. Иммуногистохимическая реакция,  $\times 200$

*Fig. 3.* Distribution of CD68 + cells in the decidual membrane of viable (A–D) and resorbed (E–F) embryos. A – physiological pregnancy, B – spontaneous abortion, C – induced abortion, D – potentiated abortion, E, F – decidua of resorbed embryos. Arrowheads indicate CD68<sup>+</sup> cells. Immunohistochemical assay,  $\times 200$



Таблица 2 | Table 2

Плотность распределения CD68<sup>+</sup> клеток  
в децидуальной оболочке на 1 мм<sup>2</sup>, Me (Q1; Q3) |  
Distribution density of CD68<sup>+</sup> cells  
in the decidua per 1 mm<sup>2</sup>, Me (Q1; Q3)

Группы   Groups	Децидуальная оболочка жизнеспособных эмбрионов   Decidua of viable embryos	Децидуальная оболочка резорбированных эмбрионов   Decidua of resorbed embryos
Физиологическая беременность   Physiological pregnancy (n=30)	119,29 (89,78; 335,67), 1	0 (0; 0), (0; 0) 5
Спонтанные аборт   Spontaneous abortion (n=24)	110,37 (74,06; 183,86) 2	0 (0; 0), (0; 0) 6
Индукцированные аборт   Induced abortion (n=24)	116,35 (67,11; 184,21) 3	0 (0; 0), (0; 0) 7
Потенцированные аборт   Potentiated abortion (n=23)	108,76 (99,53; 128,85) 4	0 (0; 0), (0; 0) 8
Статистическая значимость   Statistical significance	<p>p1–2=0,524 p1–3=0,396 p1–4=0,526 p2–4=0,751 p3–4=0,588 p5–6=1,000 p5–7=1,000 p5–8=1,000 p6–8=1,000 p7–8=1,000 p1–5=0,031 p2–6=0,015 p3–7&lt;0,001 p4–8&lt;0,001</p>	

являются предшественниками спонгиозной трофобласты плаценты и вторичных гигантских клеток трофобласта [25], воспалительные и дистрофические изменения в МПЕ, нарушения гемоциркуляции в материнских сосудах могут проявиться на более поздних сроках нарушением формирования плаценты и развитием первичной плацентарной недостаточности.

При иммуногистохимическом и морфометрическом исследовании микроокружения эмбриона на 8-й ДГ было установлено, что максимальная медиана плотности CD68<sup>+</sup> клеток в децидуальной оболочке характерна для физиологической беременности, минимальная – для потенцированных абортов с наибольшей частотой резорбции по сравнению со спонтанными и индуцированными абортами [24]. Показатели плотности CD68<sup>+</sup> клеток в децидуальной оболочке жизнеспособных эмбрионов во всех исследуемых группах статистически

значимо не различались (табл. 2). В микроокружении эмбрионов, находящихся на разных стадиях резорбции, CD68<sup>+</sup> клетки не выявлялись (рис. 3).

Отсутствие различий плотности МФ в децидуальной оболочке жизнеспособных эмбрионов при всех вариантах беременности, как прогрессирующей, так и с высоким уровнем спонтанных и иммунозависимых абортов, позволяет предположить, что выявляемые CD68<sup>+</sup> макрофаги представляют собой популяцию M2, необходимую для благополучного течения беременности. О такой возможности свидетельствует и отсутствие CD68<sup>+</sup> клеток в МПЕ резорбированных эмбрионов. Однако для подтверждения этого необходимо определение фенотипа МФ с применением специфических маркеров. Одним из возможных механизмов эмбриональных потерь, очевидно, является нарушение иммунной толерантности, обусловленное отсутствием альтернативно активированных МФ в маточно-плацентарной единице. Это приводит к активации эффекторов адаптивного иммунитета и цитотоксической атаке на клетки зародыша. Клеточные и молекулярные механизмы, определяющие роль иммунного микроокружения в постимплантационном развитии эмбриона и экстраэмбриональных структур, нарушение которого приводит к прерыванию беременности или формированию плацентарной недостаточности, требуют дальнейшего экспериментального исследования.

## Заключение

Введение иммуномодулятора С7МДП в гестационных сроках 5 и 7 суток (после завершения имплантации и до формирования зрелой плаценты), индуцирующее и потенцирующее аборт у самок СВА, оплодотворенных самцами Valb/c и DBA/2, соответственно, приводит к уменьшению площади маточно-плацентарных единиц, гемоциркуляторным расстройствам в децидуальной оболочке, нарушениям морфогенеза хориона и развития эмбриона вплоть до его полной резорбции, отсутствию CD68<sup>+</sup> макрофагов в микроокружении резорбированных эмбрионов на 8-й день беременности.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К.А. Артемьева, И.М. Богданова, А.Е. Земляков.  
Сбор и обработка материала – К.А. Артемьева, И.М. Богданова, И.И. Степанова, Е.А. Пономаренко, А.А. Степанов.  
Статистическая обработка – К.А. Артемьева.  
Написание текста – К.А. Артемьева, И.М. Богданова.  
Редактирование – М.Н. Болтовская, О.В. Калюжин, С.В. Дамбаева.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – K.A. Artemyeva, I.M. Bogdanova, A.E. Zemlyakov.  
Collected and processed the material – K.A. Artemyeva, I.M. Bogdanova, I.I. Stepanova, E.A. Ponomarenko, A.A. Stepanov.  
Performed the statistical analysis – K.A. Artemyeva.  
Wrote the paper – K.A. Artemyeva, I.M. Bogdanova.  
Edited the manuscript – M.N. Boltovskaya, O.V. Kalyuzhin, S.V. Dambaeva.

## Литература/References

1. *Matthiesen L, Kalkunte S, Sharma S*. Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(4):334–40. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2012.01121.x.
2. *Baek KH, Lee EJ, Kim YS*. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med*. 2007;13(7):310–17. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.05.005.
3. *Yin G, Li C, Shan B, Wang W, Chen H, Zhong Y et al*. Insufficient peroxiredoxin-2 expression in uterine NK cells obtained from a murine model of abortion. *J Cell Biochem*. 2011;112(3):773–81. DOI: 10.1002/jcb.22893.
4. *Chen SJ, Liu YL, Sytwu HK*. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012,258391. DOI: 10.1155/2012/258391.
5. *Kuśnierczyk P*. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene associations with autoimmune and allergic diseases, recurrent spontaneous abortion, and neoplasms. *Front Immunol*. 2013;4:8. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00008.
6. *Renaud SJ, Graham CH*. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol Invest*. 2008;37(5):535–64. DOI: 10.1080/08820130802191375.
7. *Murray PJ*. Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:541–66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
8. *Marjono AB, Brown DA, Horton KE, Wallace EM, Breit SN, Manuelpillai U*. Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Placenta*. 2003;24(1):100–6. DOI: 10.1053/plac.2002.0881.
9. *Cupurdija K, Azzola D, Hainz U, Gratchev A, Heitger A, Takikawa O et al*. Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation. *Am J Reprod Immunol*. 2004;51(2):117–22. DOI: 10.1046/j.8755-8920.2003.00128.x.
10. *Svensson-Arvelund J, Ernerudh J*. The role of macrophages in promoting and maintaining homeostasis at the fetal-maternal interface. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(2):100–9. DOI: 10.1111/aji.12357.
11. *Милованов А.П., Ожиганова И.Н.* Эмбриохориальная недостаточность: анатомофизиологические предпосылки, обоснование, дефиниции и патогенетические механизмы. *Архив патологии*. 2014;76(3):4–8.  
*Milvanov AP, Ozhiganova IN*. Embryochorionic insufficiency: anatomic and physiologic prerequisites, rationale, definitions and pathogenetic mechanisms. *Arkhiv Patologii*. 2014;76(3):4–8 (In Russ.).
12. *Monier I, Ancel PY, Ego A, Jarreau PH, Lebeaux C, Kaminski M et al*. Fetal and neonatal outcomes of preterm infants born before 32 weeks of gestation according to antenatal vs postnatal assessments of restricted growth. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;216(5):516.e1–516.e10. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.02.001.
13. *Salavati N, Smies M, Ganzevoort W, Charles AK, Erwich JJ, Plösch T et al*. The possible role of placental morphometry in the detection of fetal growth restriction. *Front Physiol*. 2019;9:1884. DOI: 10.3389/fphys.2018.01884.
14. *Beune IM, Pels A, Gordijn SJ, Ganzevoort W*. Temporal variation in definition of fetal growth restriction in the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019;53(5):569–70. DOI: 10.1002/uog.19189.
15. *Carter AM*. Animal models of human placentation. *Placenta*. 2007;28 (Suppl. A.):S41–47. DOI:10.1016/j.placenta.2006.11.002.
16. *Kwak-Kim J, Bao S, Lee SK, Kim JW, Gilman-Sachs A*. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(2):129–40. DOI: 10.1111/aji.12234.
17. *Papaioannou VE, Behringer RR*. Early embryonic lethality in genetically engineered mice: diagnosis and phenotypic analysis. *Vet Pathol*. 2012;49(1):64–70. DOI: 10.1177/0300985810395725.
18. *Артемова К.А., Болтовская М.Н., Калюжин О.В.* Моделирование индуцированного невынашивания беременности на мышцах с использованием гликозида мурамилдипептида. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2012;2:34–39.  
*Artemyeva KA, Boltovskaya MN, Kalyuzhin OV*. Modelling the immune-dependent miscarriage in mice with the use of a muramyl dipeptide glycoside. *Kursk Scientific and Practical Bulletin «Man and His Health»*. 2012;2:34–39 (In Russ.).
19. *Burton GJ, Jauniaux E*. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(2S):S745–S761. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
20. *Ohgiya Y, Nobusawa H, Seino N, Miyagami O, Yagi N, Hiroto S et al*. MR imaging of fetuses to evaluate placental insufficiency. *Magn Reson Med Sci*. 2016;15(2):212–9. DOI: 10.2463/mrms.mp.2015-0051.
21. *Moser M, Li Y, Vaupel K, Kretzschmar D, Kluge R, Glynn P et al*. Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2004;24(4):1667–79. DOI: 10.1128/MCB.24.4.1667-1679.2004
22. *Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA*. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase. *J Immunol*. 1998;160(2):545–9.
23. *Knackstedt MK, Zenclussen AC, Hertwig K, Hagen E, Dudenhausen JW, Clark DA et al*. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2003;49(4):210–20. DOI: 10.1034/j.1600-0897.2003.01192.x.
24. *Артемова К.А., Богданова И.М., Степанова И.И., Болтовская М.Н., Калюжин О.В., Степанов А.А. и др.* Особенности иммунного микроокружения в плаценте и гравидарном эндометрии у мышей со спонтанными, индуцированными и потенцированными абортми. *Иммунология*. 2019;40(6):26–33. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16004.  
*Artemyeva KA, Bogdanova IM, Stepanova II, Boltovskaya MN, Kalyuzhin OV, Stepanov AA et al*. Features of the immune microenvironment in the placenta and gravidar endometrium in mice with spontaneous, induced and potentiated abortions. *Immunology*. 2019;40(6):26–33 (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16004.
25. *El-Hashash AH, Warburton D, Kimber SJ*. Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. *Mech Dev*. 2010;127(1–2):1–20. DOI: 10.1016/j.mod.2009.09.004.

**Информация об авторах**

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Ирина Марковна Богданова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Ирина Ильдаровна Степанова – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Марина Николаевна Болтовская – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Александр Алексеевич Степанов – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Олег Витальевич Калужин – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Александр Евгеньевич Земляков – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической и биологической химии Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского.

Светлана Владимировна Дамбаева – кандидат медицинских наук, доцент центра клеточной биологии опухолей, иммунологии и инфектологии Университета медицины и науки им. Розалинд Франклин.

**Author information**

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Irina M. Bogdanova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-6529-8149>

Irina I. Stepanova – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Marina N. Boltovskaya – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Alexander A. Stepanov – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.  
<http://orcid.org/0000-0002-9672-7145>

Oleg V. Kalyuzhin – Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.  
<http://orcid.org/0000-0003-3628-2436>

Alexander E. Zemlyakov – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Department of Organic and Biological Chemistry, V.I. Vernadsky Crimean Federal University.  
<http://orcid.org/0000-0003-3536-1618>

Svetlana V. Dambaeva – Cand. Sci. (Med.), Research Assistant Professor Center for Cancer Cell Biology, Immunology and Infection, Rosalind Franklin University of Medicine and Science.  
<https://orcid.org/0000-0002-1145-1814>