

УДК 618.2–018:612.017.1

© О. В. Хоперская, Е. В. Енькова, Д. А. Атякшин, 2018

<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-3-75-80>

## Оценка популяции децидуальных макрофагов у пациенток с неразвивающейся беременностью

О. В. Хоперская, Е. В. Енькова, Д. А. Атякшин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко»  
Минздрава России, Воронеж, Россия

Актуальность поиска новых патогенетических механизмов формирования неразвивающейся беременности обусловлена высокой частотой встречаемости заболевания и отсутствием тенденции к снижению, несмотря на проводимые современные реабилитационные мероприятия.

*Цель исследования:* обосновать подходы к реабилитационной терапии пациенток, перенесших неразвивающуюся беременность, на основании полученных данных о количественном и качественном составе макрофагов в их децидуальной ткани.

*Материал и методы.* Исследовали децидуальную ткань пациенток с неразвивающейся беременностью и пациенток, прервавших беременность по собственному желанию. Макрофаги определяли при помощи мышиных моноклональных антител (Anti-CD68 antibody [KP1], #ab955, разведение 1:200) и кроличьих моноклональных антител (Anti-CD163 antibody [EPR19518], #ab182422, разведение 1:500) с использованием методики множественного иммуномаркирования.

*Результаты.* При неразвивающейся беременности количество макрофагов возрастает двукратно по сравнению с физиологически протекающей гестацией. Изменяется соотношение макрофагов M1 и M2 в сторону возрастания числа первых. Максимальное количество CD68+ клеток, а также макрофагов с одновременной экспрессией факторов дифференцировки CD68 и CD163 определяется при неразвивающейся беременности, сопровождающейся явлениями децидуита.

*Заключение.* Децидуальные макрофаги участвуют в патогенезе неразвивающейся беременности за счет увеличения их числа и изменения вектора поляризации по классическому пути активации, характеризующегося активной выработкой клетками провоспалительных цитокинов и цитотоксических молекул, участием в реализации Т-хелперных иммунных реакций 1 типа. Патогенетически обосновано назначение препаратов, способных репрограммировать макрофагальный ответ, у пациенток перенесших неразвивающуюся беременность, в составе комплексной реабилитационной терапии.

*Ключевые слова:* неразвивающаяся беременность, децидуальные макрофаги, децидуит.

© О. В. Khoperskaya, E. V. En'kova, D. A. Atyakshin, 2018

Voronezh N.N. Burdenko State Medical University, Voronezh, Russia

Assessment of Decidual Macrophages Population in Patients with Non-Developing Pregnancy

The relevance of the search for new pathogenetic mechanisms of non-developing pregnancy is due to the high incidence of the disease and the lack of a downward trend, despite the current rehabilitation measures.

*The purpose of the study:* to substantiate approaches of rehabilitation therapy patients with non-developing pregnancy, based on the data on the quantitative and qualitative composition of macrophages in their decidual tissue.

*Material and methods.* The decidual tissue of patients with non-developing pregnancy and patients who terminated pregnancy at their own will was studied. Macrophages were determined using mouse monoclonal antibodies (Anti-CD68 antibody [KP1], #ab955, dilution 1:200) and rabbit monoclonal antibodies (Anti-CD163 antibody [EPR19518], #ab182422, dilution 1:500) using multiple immunomarkation technique.

*Results.* In missed miscarriage, the number of macrophages is increased twice as compared with physiological course of gestation. Changes in the ratio of macrophages M1 and M2 in the direction of increasing the number of the first. The maximum number of CD68+ cells, as well as macrophages with simultaneous expression of differentiation factors CD68 and CD163 is determined in non-developing pregnancy accompanied by deciduitis.

*Conclusion.* Decidual macrophages participate in the pathogenesis of non-developing pregnancy by increasing their number and changing the polarization vector along the classical pathway of activation, characterized by the active production of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic molecules by cells, participation in the implementation of t-helper immune reactions of type 1. Pathogenetically justified the appointment of drugs that can reprogram the macrophage response in patients who have undergone non-developing pregnancy as part of complex rehabilitation therapy.

*Key words:* non-developing pregnancy, decidual macrophages, deciduitis.

### Введение

Частота неразвивающейся беременности (НБ) составляет 10–20% от всех случаев зачатия и, по данным ряда исследователей, в последние годы наблюдается тенденция к увеличению заболеваемости [4, 5]. НБ в анам-

незе является предиктором неблагоприятных перинатальных исходов последующих беременностей, и в 27.4% случаев – причиной привычного невынашивания [3, 4].

Изучение патогенетических механизмов заболевания на молекулярно-клеточном уровне необходимо для рациональной реби-

литации после перенесенной НБ с целью улучшения перинатальных исходов последующих беременностей.

Макрофаги являются второй по численности (после натуральных киллеров) популяцией иммунокомпетентных клеток (35%), представленной в децидуальной ткани [8]. Согласно литературным данным, их количество в эндометрии возрастает при наступлении беременности и на протяжении первого триместра, оставаясь постоянным во втором, и увеличиваясь к родам, что доказывает их участие в процессах формирования и поддержания физиологической беременности. Децидуальные макрофаги являются частью системы мононуклеарных фагоцитов и имеют костномозговое происхождение. Их пул пополняется за счет моноцитов периферической крови, мигрирующих в эндометрий под влиянием хемокинов, синтезируемых клетками трофобласта, плодных оболочек и самими децидуальными клетками [6, 7].

В литературе описаны два пути активации макрофагов: классический, приводящий к формированию CD68+ иммунофенотипа, характеризующегося активной выработкой провоспалительных цитокинов и создающего иммунный ответ по Th1 типу, и альтернативный, соответствующий противовоспалительному M2-иммунофенотипу (CD163). Классическая активация происходит в ответ на стимуляцию толл-подобных рецепторов, воздействие ФНО и  $\gamma$ -интерферона, а воздействие прогестерона, глюкокортикоидов, витамина D, СЭФР, ИЛ-4 и ИЛ-13 способствуют активации макрофагов по альтернативному пути. Доказано, что количественное преобладание CD68+ макрофагов в децидуальной ткани обуславливает высокую вероятность невынашивания беременности, тогда как преобладание CD163+ макрофагов способствует физиологическому течению беременности за счет их иммуномодулирующих свойств. M2-макрофаги реализуют Th2-опосредованный иммунный ответ посредством выработки противовоспалительных цитокинов. К функциям децидуальных макрофагов также относятся поддержание тканевого гомеостаза, регуляция активности других видов лейкоцитов, защита от инфекционных агентов, контроль цитотрофобластической инвазии и участие в моделировании спиральных артерий [1, 7].

### Материал и методы исследования

С целью изучения патогенетических особенностей НБ были сформированы следующие группы пациенток:

I группа (основная) – 76 беременных женщин с установленным диагнозом НБ первого триместра.

II группа (группа контроля) – 40 здоровых женщин с физиологически протекающей

беременностью первого триместра, прервавших беременность по собственному желанию.

Гистологический материал из полости матки по изучаемым нозологиям был собран после прерывания беременности, фиксирован в 10% формалине. Спустя 24–48 часов после момента фиксации биоматериал подвергали стандартной процедуре пробоподготовки для заливки образцов органов в парафин, после чего для гистохимического окрашивания готовили гистологические среды толщиной 5 мкм, для иммуноморфологического окрашивания – толщиной 1 мкм. Микропрепараты для обзорного анализа были окрашены гематоксилином Майера и эозином [9].

В зависимости от результатов морфологического исследования в основной группе образцов децидуальной ткани, было выделено две подгруппы:

Ia подгруппа – 46 женщин (60.53%) с НБ и явлениями децидуита (наличие в гистологическом материале воспалительных инфильтратов, микроабсцессов, присутствие плазматических клеток, склерозирование спиральных артерий, фиброз стромы);

Ib подгруппа – 30 женщин (39.47%) с НБ без признаков воспалительного процесса (отсутствие в исследованном гистологическом материале плазматических клеток, воспалительных инфильтратов).

Макрофаги в подгруппах основной группы и в контрольной группе выявляли мышинными моноклональными антителами (Anti-CD68 antibody [KP1], #ab955, разведение 1:200) и кроличьими моноклональными антителами (Anti-CD163 antibody [EPR19518], #ab182422, разведение 1:500). Все иммуногистохимические протоколы выполняли в соответствии со стандартными процедурами пробоподготовки. Связанные первичные антитела детектировали соответствующими вторичными, конъюгированными с пероксидазой хрена, которые, в свою очередь, детектировали реактивом AmpliStain™ Horseradish Peroxidase conjugates (SDT GmbH, Baesweiler, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. В дальнейшем ферментную метку визуализировали набором с 3,3'-диаминобензидином в качестве субстрата (DAB substrate kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), ядра контрастировали гематоксилином Майера и заключали в монтажную среду. Окрашенные срезы изучены на аппаратно-программном комплексе для биологических исследований ZEISS Axio Imager.A2 (Carl Zeiss Microscopy, Германия). Изображения документировали с помощью камеры ZEISS Camera Axio cam 506 color либо ZEISS Axio cam 503 mono (для флуоресцентной детекции) и подвергали анализу на программном обеспечении ZEN 2.3 (blue edition, Carl Zeiss, Germany). Количество макрофагов в децидуальной ткани определяли в полях зре-

Таблица 1

**Содержание макрофагов в образцах децидуальной ткани обследованных женщин (иммуногистохимическое окрашивание, в поле зрения)**

| Группа пациентов | CD68+          | CD163+          |
|------------------|----------------|-----------------|
| Подгруппа Ia     | 136.10±9.03*   | 82.13±3.22*     |
| Подгруппа Ib     | 74.66±2.50*,** | 159.16±8.52*,** |
| Группа контроля  | 54.24±3.32     | 112.44±4.47     |

Примечание: \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, \*\* – по сравнению с группой Ia.

Таблица 2

**Поляризация децидуальных макрофагов, множественное иммуномаркирование, (в поле зрения, в %)**

| Группа пациентов | M1<br>CD68+CD163- | Смешанный иммуно-<br>фенотип CD68+CD163+ | M2<br>CD68-CD163+ |
|------------------|-------------------|--|-------------------|
| Подгруппа Ia     | 33.21±4.81*       | 54.21±4.92*                              | 12.60±1.81*       |
| Подгруппа Ib     | 11.82±2.30**      | 45.22±3.11*,**                           | 43.04±3.33**      |
| Группа контроля  | 15.70±2.71        | 33.53±2.91                               | 50.80±3.82        |

Примечание: \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, \*\* – по сравнению с группой Ia.

ния размером 700×500 мкм при использовании объектива ×20, при этом анализировали не менее 20 полей зрения в каждом срезе для получения достаточного объема данных. При обработке данных множественного иммуномаркирования результаты содержания макрофагов с иммунофенотипами CD68+CD163-, CD68+CD163+ и CD68-CD163+ абсолютные показатели количества клеток на поле зрения переводили в относительные показатели, вычисляя процент содержания (в %).

**Результаты и их обсуждение**

Установлено увеличение количества макрофагов в децидуальной ткани пациенток с НБ в 1.36 раза (в обеих подгруппах) в сравнении с группой контроля и возрастание числа клеток, экспрессирующих CD68. При наличии сопутствующих явлений децидуита преобладают макрофаги M1, составляя 62.37% всей популяции (рис. 1, 2). При отсутствии децидуита, несмотря на соответствующее Ia подгруппе увеличение количества клеток, преобладающим иммунофенотипом является M2. В контрольной группе общее число макрофагов ниже, 67.5% экспрессируют CD163 (табл. 1).

Интересно отметить, что в подгруппе Ia в больших количествах экспрессировали фактор дифференцировки CD68 не только макрофаги, но и децидуальные клетки, что не наблюдалось ни у пациенток подгруппы Ib, ни в группе контроля (рис. 2B).

Множественное иммуномаркирование позволяет определять экспрессию обоих факторов дифференцировки одной клеткой и позволяет установить вектор поляризации децидуальных макрофагов, являясь наиболее информативным методом оценки состояния их

популяции. Оценка результатов свидетельствует о достоверном возрастании экспрессии CD68 в макрофагах при неразвивающейся беременности. Так, их доля в общем пуле макрофагов возрастала не только за счет CD68+ клеток, но и за счет начала экспрессии данного фактора дифференцировки в макрофагах с иммунофенотипом CD163 (табл. 2, рис. 3, 4). Данный факт свидетельствует о динамике процесса поляризации макрофагов в сторону M1, вероятно, для потенцирования воспалительных реакций.

Максимальное количество клеток с одновременной экспрессией CD68 и CD163 обнаружено при НБ, сочетающейся с децидуитом, меньшее – при НБ, не сопровождающейся явлениями децидуита, и минимальное – в группе контроля.

Обращает на себя внимание высокое содержание макрофагов с одновременной экспрессией CD68 и CD163.

НБ на клеточном уровне характеризуется возрастанием числа макрофагов и изменением экспрессии ими факторов дифференцировки в сторону преобладания CD68, особенно выраженное при сопутствующем децидуите. Увеличение количества M1-макрофагов приводит к активной выработке ими провоспалительных цитокинов и цитотоксических молекул, первоначально направленных на борьбу с инфекционным агентом, а впоследствии, создающих патологический симптомокомплекс по механизму положительной обратной связи, препятствующий благоприятному развитию беременности. Поэтому, необходимо прервать каскад воспалительных реакций, что делает оправданным назначение пациенткам противовоспалительной терапии и препаратов, способных репрограммировать макрофагальный ответ.

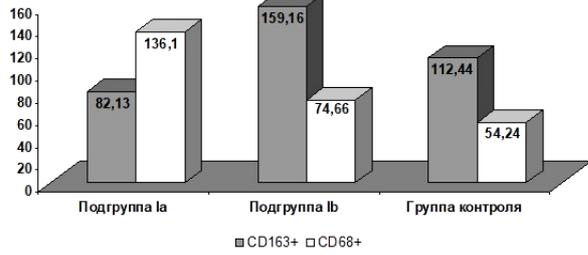


Рис. 1. Соотношение иммунофенотипов макрофагов в децидуальной ткани пациенток исследованных групп.

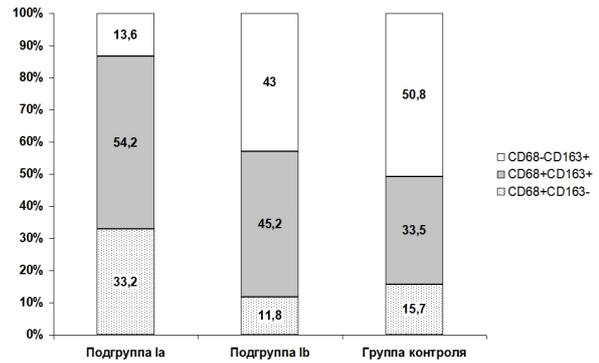


Рис. 3. Поляризация децидуальных макрофагов в изученных группах.

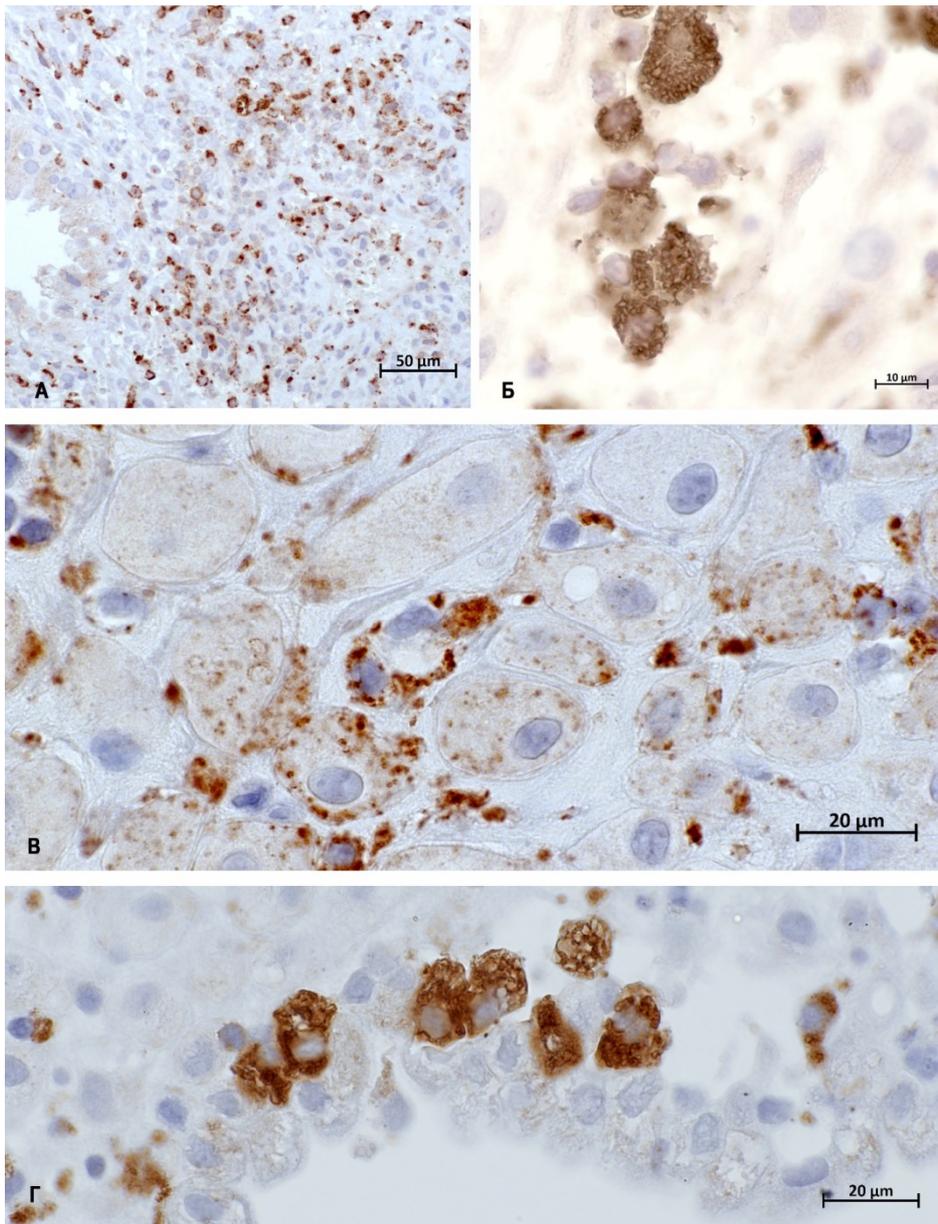


Рис. 2. Децидуальная ткань женщин подгруппы Ia, иммуногистохимическое окрашивание CD68. Определяется высокое содержание CD68+ клеток в децидуальной ткани (A), взаимодействие M1 макрофагов друг с другом в строме (B) и около маточных желез (Г), усиление экспрессии макрофагальных клеток (B).

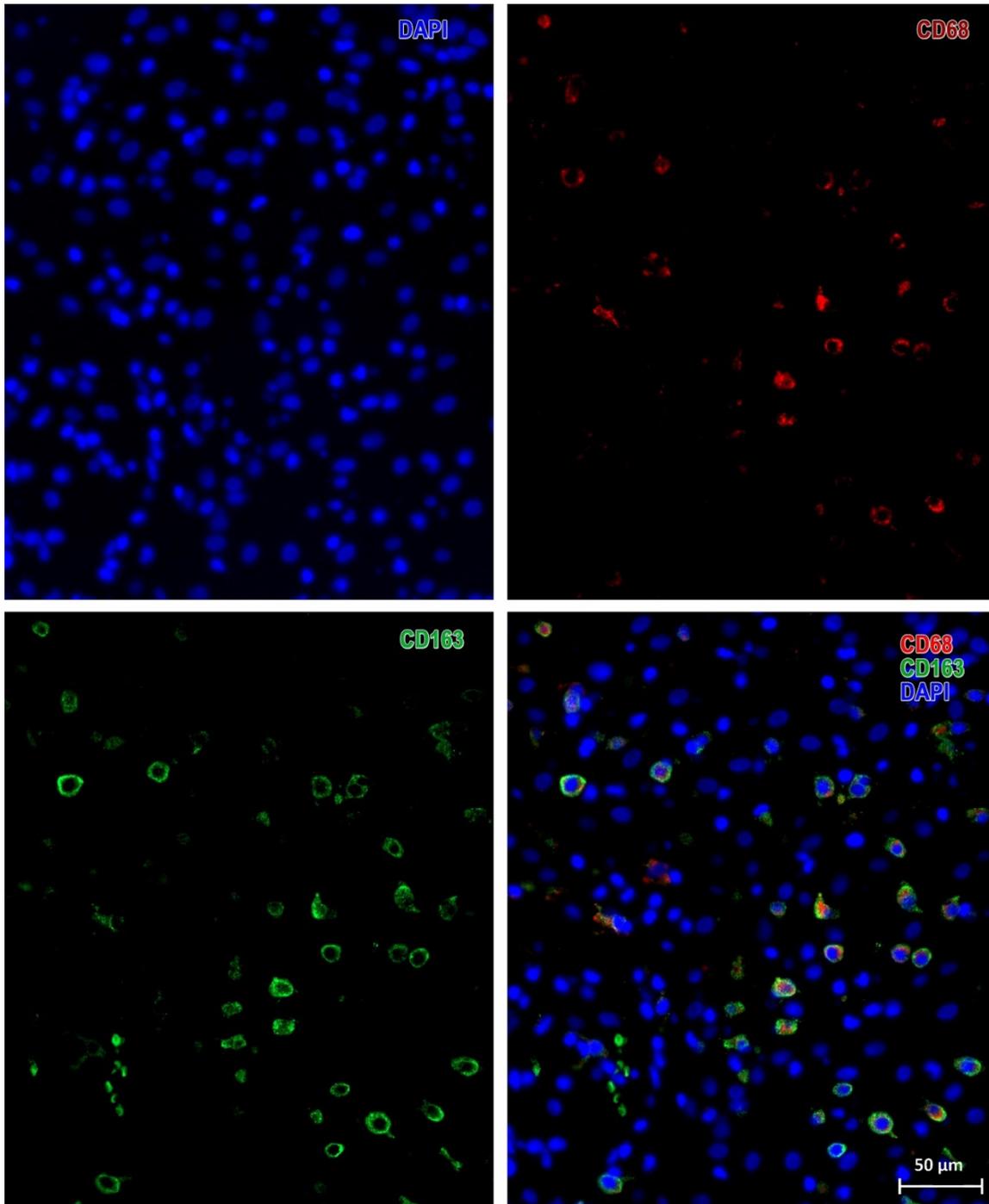


Рис. 4. Децидуальная ткань женщин подгруппы Ia, множественное иммуномаркирование на CD68 и CD163.

### Заключение

В исследовании определены количественные и качественные изменения в популяции децидуальных макрофагов при физиологическом течении беременности и при неразвивающейся беременности, сопровождающейся децидуитом, и без явлений децидуита. Неразвивающаяся беременность является заболеванием, при котором увеличивается количество децидуальных макрофагов, возрастает количество клеток с одновременной экспрессией CD68 и CD163, что свидетельствует о возрастании провоспалительного потенциала

децидуальной ткани. При развитии неразвивающейся беременности на фоне сопутствующего децидуита, наряду с увеличением количества макрофагов, кардинально изменяется вектор их поляризации: преобладает M1-иммунофенотип, в значительно большей степени растёт доля CD68+CD163+ клеток за счет экспрессии макросиалина в CD163+ макрофагах.

Благополучное вынашивание беременности при преобладании M1-иммунофенотипа макрофагов невозможно. Необходимым условием для успешной последующей беременности является нормализация соотношения

CD68+CD163- и CD68-CD163+ клеток, что делает обоснованным назначение противвоспалительной терапии и препаратов, способствующих альтернативному пути активации макрофагов.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Алексеева Н. Т., Ключкова С. В., Никитюк Д. Б., Глухов А. А. Регенерация кожи: актуальные методы воздействия. Воронеж: Научная книга; 2015. 300.
2. Атякшин Д. А., Бурцева А. С., Алексеева Н. Т. Триптаза как полифункциональный компонент секрета тучных клеток. Журнал анатомии и гистопатологии. 2017; 6(1): 121–132.
3. Беременность ранних сроков. От прегравидарной подготовки к здоровой гестации. ред. В.Е. Радзинский, А.А. Оразмуратов. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Редакция журнала StatusPraesens; 2018. 800.
4. Буничева Н. В. Прогнозирование неразвивающейся беременности как основа снижения репродуктивных потерь: дис. ... канд. мед. наук. Пермь; 2016. 197.
5. Доброхотова Ю. Э., Джобова Э. М., Озерова Р. И. Неразвивающаяся беременность: тромбофилические и клинико-иммунологические факторы: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 144.
6. Мамедалиева Н. М., Курманова А. М., Мошколова Г. Н., Ким В. Клинико-иммунологические аспекты невынашивания беременности. Вестник КазНМУ. 2017; 2: 1–5.
7. Павлов О. В. Плацентарные макрофаги: фенотипические характеристики и функциональные особенности: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Санкт-Петербург; 2016. 38.
8. Atiakshin D., SamoiloVA V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. Histochem Cell Biol. 2017; 147(6): 683–694.
9. Lee S. K., Kim C. J., Kim D.-J., Kang J. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. Immune Network. 2015; 15(1): 16–26.

### References

1. Alekseeva N.T., Klochkova S.V., Nikityuk D.B., Glukhov A.A. Regeneratsiya kozhi: aktual'nye metody vozdeistviya [Skin regeneration: current methods of exposure]. Voronezh: Nauchaya kniga; 2015. 300 (in Russian).
2. Atyakshin D.A., Burtseva A.S., Alekseeva N.T. Triptaza kak polifunktsional'nyi komponent sekre-

- toma tuchnykh kletok [Tryptase as a Multifunctional Component of Mast Cells' Secretome]. Journal of Anatomy and Histopathology. 2017; 6(1): 121–132 (in Russian).
3. Beremennost' rannikh srokov. Ot pregravidarnoi podgotovki k zdorovoi gestatsii. red. V.E. Radzinskii, A.A. Orazmuradov. 3-e izd., pererab. i dop. [Early pregnancy. From pregravid preparation to healthy gestation]. edited by V.E. Radzinskii, A.A. Orazmuradov. 3rd ed., re-developed and additional. Moscow: StatusPraesens; 2018. 800 (in Russian).
4. Bunicheva N.V. Prognozirovaniye nerazvivayushcheyseya beremennosti kak osnova snizheniya reproduktivnykh poter': dis. ... kand. med. nauk [Prediction of non-developing pregnancy as a basis for reducing reproductive losses: Cand. med. sci. diss. abs.]. Perm; 2016. 197 (in Russian).
5. DobrokhotoVA Yu.E., Dzhobava E.M., Ozerova R.I. Nerazvivayushchayasya beremennost': trombofilicheskie i kliniko-immunologicheskie faktory: rukovodstvo [Missed miscarriage: thrombophilic and immunological factors: manual]. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. 144 (in Russian).
6. MamedalievA N.M., Kurmanova A.M., Moshkalova G.N., Kim V. Kliniko-immunologicheskie aspekty nevnashivaniya beremennosti [Clinical and immunological aspects of pregnancy miscarriage]. Vestnik KazNMU. 2017; 2: 1–5 (in Russian).
7. Pavlov O.V. Platsentarnye makrofagi: fenotipicheskie kharakteristiki i funktsional'nye osobennosti: avtoref. dis. ... dokt. med. nauk [Placental macrophages: phenotypic characteristics and functional features: Doct. med. sci. diss. abs.]. Saint-Petersburg; 2016. 38 (in Russian).
8. Atiakshin D., SamoiloVA V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. Histochem Cell Biol. 2017; 147(6): 683–694.
9. Lee S.K., Kim C.J., Kim D.-J., Kang J. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. Immune Network. 2015; 15(1): 16–26.

### Сведения об авторах

**Хоперская Ольга Викторовна** – соискатель кафедры хирургических дисциплин ИДПО ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

**Енькова Елена Владимировна** – д-р мед. наук, профессор кафедры хирургических дисциплин ИДПО ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

**Атякшин Дмитрий Андреевич** – д-р мед. наук, директор НИИ экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10

Поступила в редакцию 24.08.2018 г.

Для цитирования: Хоперская О.В., Енькова Е.В., Атякшин Д.А. Оценка популяции децидуальных макрофагов у пациенток с неразвивающейся беременностью. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018; 7(3): 75–80. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-75-80.

For citation: Khoperskaya O.V., En'kova E.V., Atyakshin D.A. Assessment of decidual macrophages population in patients with non-developing pregnancy. Journal of Anatomy and Histopathology. 2018; 7(3): 75–80. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-75-80.