

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МАКРОФАГОВ В ТКАНИ МИОМАТОЗНОГО УЗЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МРТ-КАРТИНЫ

Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Воронин Д.Н., Нагорный С.Н.,
Воскресенская Д.Л.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова»
Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Резюме. Известно, что дифференцировка макрофагов регулируется специфическим микроокружением, сформированным тканями в которые они инвазируют. Однако, несмотря на многочисленные исследования, посвященные патогенезу лейомиомы матки, являющейся распространенным вариантом доброкачественной опухоли репродуктивной системы, особенности поляризации макрофагов непосредственно в тканях узла до сих пор остаются недостаточно изученными. Целью исследования было выявить особенности дифференцировки макрофагов, инвазирующих ткани миоматозных узлов, у пациенток с лейомиомой матки различного типа в зависимости от МРТ-картины. Было проведено обследование 42 пациенток репродуктивного возраста с интрамуральной лейомиомой матки. Всем пациенткам проводилось МРТ-исследование органов малого таза. 12 образцов эндометрия от здоровых женщин фертильного возраста без каких-либо признаков миомы матки использовались в качестве контроля. Материалом для исследования служили биоптаты лейомиомы матки и эндометрия, расположенного в его проекции. Фенотип макрофагов эндометрия и миоматозного узла оценивали методом многоцветной проточной цитофлюориметрии. Экспрессию мРНК Activin A и RAR α в макрофагах эндометрия и миоматозного узла, а также экспрессию мРНК коллагена 1-го типа в ткани лейомиомы оценивали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Концентрация коллагена 1-го типа в ткани миоматозных узлов оценивалась методом ИФА. Было выявлено что, как и моноциты крови, так и макрофаги эндометрия и миоматозного узла распределяются по трем различным субпопуляциям в зависимости от уровня экспрессии мембранных рецепторов CD14 и CD16. В эндометрии, расположенном в проекции миоматозного узла была повышена доля «промежуточных» макрофагов с фенотипом CD14⁺⁺CD16⁺ и CD36⁺ альтернативно активированных макрофагов, что может негативно влиять на реализацию репродуктивной функции у женщин с лейомиомой матки. Непосредственно в ткани миоматозного узла было выявлено смещение дифференцировки макрофагов от «классических», в пользу «промежуточных» и «неклассических», макрофагов, ассоциированных с альтернативной активацией макрофагов, однако в ткани миоматозного узла снижался процент макрофагов, экспрессирующих скавенджер рецепторы – CD36 и CD206. Усиленная экспрессия мРНК RAR α наблюдалась в макрофагах, инвазирующих клеточные миоматозные узлы, а синтез Activin A был выше в макрофагах инвазирующих лейомиомы с МРТ-картиной простых и дегенеративных узлов. Нарушение баланса между «промежуточными» и «неклассическими» макрофагами, инвазирующими лейомиому, ассоциировалось с фиброзированием или дегенеративными изменениями в ткани узла, что, вероятно, является важным звеном в патогенезе формирования различных клинических вариантов миомы матки.

Ключевые слова: макрофаги, дифференцировка, RAR α , Activin A, лейомиома, МРТ, эндометрий

Адрес для переписки:

Сотникова Наталья Юрьевна
ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт
материнства и детства имени В.Н. Городкова»
Министерства здравоохранения РФ
153045, Россия, г. Иваново, ул. Победы, 20.
Тел.: 8 (4932) 33-62-63.
Факс: 8 (4932) 33-62-56.
E-mail: sniimid.immune@mail.ru

Address for correspondence:

Sotnikova Natalia Yu.
V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and
Childhood
153045, Russian Federation, Ivanovo, Pobedy str., 20.
Phone: 7 (4932) 33-62-63.
Fax: 7 (4932) 33-62-56.
E-mail: sniimid.immune@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Ю. Сотникова, А.И. Малышкина, Д.Н. Воронин,
С.Н. Нагорный, Д.Л. Воскресенская «Дифференцировка
макрофагов в ткани миоматозного узла в зависимости
от МРТ-картины» // Российский иммунологический
журнал, 2021. Т. 24, № 1. С. 69-76.
doi: 10.46235/1028-7221-243-MDI
© Сотникова Н.Ю. и соавт., 2021

For citation:

N.Yu. Sotnikova, A.I. Malysheva, D.N. Voronin,
S.N. Nagorny, D.L. Voskresenskaya "Macrophage
differentiation in the tissues of myomatous nodes, depending
on MRI pattern", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 69-76.
doi: 10.46235/1028-7221-243-MDI
DOI: 10.46235/1028-7221-243-MDI

MACROPHAGE DIFFERENTIATION IN THE TISSUES OF MYOMATOUS NODES, DEPENDING ON MRI PATTERN

Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I., Voronin D.N., Nagornyi S.N., Voskresenskaya D.L.

V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russian Federation

Abstract. Macrophage differentiation is known to be regulated by specific microenvironment invaded by these cells. However, despite numerous studies on pathogenesis of uterine leiomyoma, a common benign tumor of reproductive system, the features of macrophage polarization within myoma nodes are still scarcely studied. The aim of our work was to reveal some differentiation features of macrophages which invade the tissues of myomatous nodes in the patients with different types of uterine leiomyoma (UL) dependent on MRI patterns observed. We have performed a study of 42 patients in their reproductive age with intramural UL. All the patients were subjected to MRI of pelvic area. Twelve samples of endometrium have been taken from healthy women without any signs of UL, being used as controls. UL biopsies and endometrium in its projection served as study material. Phenotype of endometrial and UL-invading macrophages was evaluated by means of multi-color flow cytometry. Expression of Activin A and RAR α mRNAs was estimated in endometrial and myoma node macrophages. Likewise, collagen type 1 mRNA expression was evaluated by means of reverse-transcription real time PCR. The collagen type 1 concentration in myomatous nodes was assessed by ELISA technique. We have revealed that peripheral blood monocytes, macrophages in endometrium, and UL nodes each consist of three different subpopulations, dependent on expression levels of expression levels of CD14 and CD16 membrane receptors. For endometrium projected onto myomatous node, the ratios of “intermediate” macrophages (CD14⁺⁺CD16⁺), and alternatively activated macrophages (CD36⁺) was increased, thus exerting potentially negative effects upon reproductive functions in women with uterine leiomyoma. Immediately in myomatous tissue, we have found a shift of macrophage differentiation from ‘classic’ forms towards “intermediate” and “non-classical” macrophages associated with alternative activation. However, the percentage of scavenger receptor-expressing macrophages (CD36⁺, CD206⁺) was decreased in the myoma nodes. Enhanced expression of RAR α mRNA was observed in macrophages invading the myomatous nodes, whereas Activin A synthesis was higher in the macrophages invading leiomyomas with MRI pattern of simple and degenerative nodes. Imbalance between “intermediate” and “non-classical” UL-invading macrophages was associated with fibrosis, or degenerative changes of myomatous tissues, thus, probably, representing an important pathogenetic link in development of different clinical variants of uterine leiomyoma.

Keywords: macrophages, differentiation, RAR α , Activin A, leiomyoma, MRI, endometrium

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00405 А.

Введение

Функциональная пластичность макрофагов, проникающих в ткани, позволяет им формировать поляризованные популяции, которые выполняют провоспалительные или противовоспалительные функции. Недавние исследования показали, что резидентные тканевые макрофаги подвергаются воздействию сложного комплекса сигналов и не могут быть сгруппированы в простые поляризованные группы [4]. В то же время многие функциональные характеристики, которые приобретают макрофаги при активации и поляризации, имеют решающее значение при повреждении и восстановлении тканей [14]. Также опухоль-ассоциированные макрофаги, инфильтрирующие новообразования, различаются в зависимости от типа опухоли. Помимо проопухолевых эффектов опухоль-ассоциированные макрофаги могут иметь противоопухолевые эффекты, которые в некоторых случаях могут преобладать.

В связи с этим необходимо понимать гетерогенность опухоли и то, как она развивается во время прогрессирования до стадии злокачественной опухоли или на фоне терапии [2]. Можно предположить, что развитие лейомиомы матки как доброкачественной опухоли связано с изменением направленности дифференцировки тканевых макрофагов и с усилением активности опухолевых макрофагов. Несмотря на то, что лейомиома матки является самым распространенным вариантом доброкачественной опухоли репродуктивной системы женщин, данные о популяционном составе макрофагов в ткани самой миомы в литературе отсутствуют. Известно, что в тканях миоматозного узла и эндометрии женщин с лейомиомой матки одновременно повышена концентрация противовоспалительных и провоспалительных цитокинов [1]. Поскольку тканевые макрофаги являются источниками большого количества цитокинов и факторов роста, обладающих потенциальным стимулирующим действием, как в отношении клеточной пролиферации, так и в отношении продукции компонентов внеклеточ-

ного матрикса, можно предположить, что они обладают регуляторным действием в отношении различных типов клеток миоматозных узлов, в том числе и в отношении фибробластов [1]. Так, известно, что макрофаги являются одними из основных продуцентов Activin A, ответственного за активацию миофибробластов и обладающего про-фибротическим действием на клетки лейомиомы [3]. Магнитно-резонансная томография (МРТ) позволяет выделить различные варианты лейомиомы матки, отличающиеся между собой по гистопатологическим данным [6]. Однако исследований, посвященных изучению взаимосвязи продукции Activin A тканевыми макрофагами у женщин с различными вариантами лейомиомы матки, до настоящего времени не проводилось.

Имеющиеся литературные данные позволяют предположить, что регуляция фиброза в лейомиоме матки в большей степени определяется функциональным состоянием альтернативно активированных макрофагов, так как именно эта популяция макрофагов участвует в процессах заживления ран и формировании рубца. Однако в литературе мало данных о дифференцировке макрофагов при различных вариантах формирования миоматозного узла.

Целью исследования было выявить особенности дифференцировки макрофагов, инвазирующих эндометрий и ткани миоматозных узлов, у пациенток с лейомиомой матки различного типа в зависимости от МРТ-картины.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили биоптаты эндометрия, расположенного в проекции миоматозного узла, и биоптаты миоматозных узлов, полученных от 42 пациенток репродуктивного возраста с интрамуральной лейомиомой матки. Материал был получен в ходе планового оперативного вмешательства в объеме гистероскопии и миомэктомии лапароскопическим доступом на 5-8-й день менструального цикла. В качестве контроля использовались 12 образцов эндометрия, полученных методом пайпель-биопсии от здоровых женщин без пролиферативных заболеваний матки на момент исследования, обратившихся к гинекологу с целью подбора метода контрацепции.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России и проводилось с информированного согласия пациенток.

Всем пациенткам делали МРТ-исследование органов малого таза с оценкой их расположения и структуры на магнитно-резонансном томографе GE SignaHDxt (General Electric, США).

Мононуклеарные клетки эндометрия выделяли механическим бесферментативным методом

с последующим центрифугированием на градиенте плотности (d-1,078). Первичную клеточную культуру тканей миоматозного узла получали ферментативным методом в собственной модификации [7]. Полученные клеточные фракции в дальнейшем использовали для фенотипирования методом проточной цитофлюорометрии.

Макрофагальный гейт строился по CD68⁺ клеткам. Мы оценивали экспрессию мембранных маркеров CD14 (ко-рецептор к липополисахаридам) и CD16 (FcγRIII) эндометриальными и узловыми макрофагами для выделения трех функционально различных субпопуляций моноцитов/макрофагов: «классические» CD14⁺⁺CD16⁻; «промежуточные» CD14⁺⁺CD16⁺ и «неклассические» CD14⁺CD16⁺⁺ [15]. Для оценки доли альтернативно активированных макрофагов использовали сканенджер рецепторы: CD36 и CD206 [11]. Фенотипирование макрофагов осуществлялось методом проточной цитофлюорометрии с применением моноклональных антител: анти-CD14-APC, анти-CD16-PreCP5,5, анти-CD36-PE, анти-CD45-FITC, анти-CD68-FITC, анти-CD206-PE (Becton Dickinson, США). Не менее 10 000 клеток анализировалось в каждом образце. Для анализа неспецифического окрашивания использовали Simultest Control (мышинные IgG1-FITC + IgG2a-PE) (Becton Dickinson, США). Анализ результатов проводили в программе BD FACSDiva Software (Becton Dickinson, США).

Для оценки уровня экспрессии мРНК RARα и Activin A макрофагами в тканях узла и эндометрии, расположенном в его проекции, методом магнитной сепарации выделяли чистую популяцию CD14⁺ макрофагов с использованием “Dyna bead CD14” (Life Technologies AS, Норвегия). Для получения тотальной РНК макрофагов и тканей миоматозного узла применяли гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформный метод. Затем РНК переводили в кДНК и в полученных образцах с использованием серии 10-кратных разведений стандартов изучаемых генов определяли количество копий пар нуклеотидов. В образцах макрофагов определяли экспрессию мРНК β2-microglobulin («ген домашнего хозяйства»), RARα (рецептора ретиноевой кислоты α) и Activin A, а в образцах тканей миоматозного узла мРНК ACTB («ген домашнего хозяйства») и коллагена 1-го типа (Фрактал Био, Россия). Полученные результаты представлены как нормализованное относительно «гена домашнего хозяйства» значение копий пар нуклеотидов 1000 для всех специфических генов.

Концентрация коллагена 1-го типа оценивалась иммуноферментным методом с использованием набора “ELISA Kit for Collagen Type I” (Cloud-Clone Corp., США).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 13.0. При статистической обработке результатов

по мембранной экспрессии рецепторов макрофагами и экспрессии мРНК изучаемых генов макрофагами в различных тканях была проведена оценка нормальности распределения данных в выборках с использованием критерия Колмогорова–Смирнова и Лиллиефорса. Было установлено, что распределение в выборках отличалось от нормального, поэтому при расчете достоверности различий в группах использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Все полученные данные по уровню экспрессии мРНК генов представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей — Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Корреляционные связи между показателями оценивали с помощью коэффициента Спирмена (r). Сила корреляционной связи оценивалась по шкале Чеддока. Различия в группах рассматривались, как статистически значимые, при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты работы показали, что, как моноциты крови, так и макрофаги эндометрия и миоматозного узла с точки зрения экспрессии CD14/CD16 распределяются по трем различным субпопуляциям. Мы установили, что миоматозный узел влияет на дифференцировку макрофагов не только в ткани узла, но и в эндометрии, расположенном в его проекции (табл. 1). Непосредственно в ткани миоматозного узла, на фоне снижения доли CD14⁺⁺CD16⁻ «классических» макрофагов, наблюдалось увеличение доли «промежуточных» CD14⁺⁺CD16⁺ и CD14⁺CD16⁺⁺ «неклассических» макрофагов. В эндометрии, расположенном в проекции миоматозного узла, был выше процент макрофагов с фенотипом CD14⁺⁺CD16⁺, по сравнению с эндометрием женщин без лейомиомы.

Нами было установлено, что в миоматозном узле снижалась доля макрофагов, экспрессирующих как рецептор-мусорщик класса В — CD36, так и маннозный рецептор — CD206, по сравнению с макрофагами, инвазирующими эндометрий, расположенный в проекции миоматозного узла. В свою очередь, эндометрий здоровых фертильных женщин не имел статистически значимых отличий в доле CD36⁺ макрофагов, по сравнению с тканью миоматозного узла, но при этом данный показатель был ниже такового в эндометрии, расположенном в проекции миоматозного узла. Напротив, эндометрий здоровых фертильных женщин отличался от ткани миоматозного узла более высоким содержанием CD36⁺ макрофагов, но не имел статистически значимых отличий в доле этих клеток в сравнении с эндометрием, расположенным в проекции миоматозного узла.

Для получения более полного представления о возможном регуляторном действии тканевых макрофагов в отношении выработки компонентов ЭЦМ, в популяции эндометриальных макрофагов мы определяли уровень экспрессии ими мРНК Activin A. Нами было выявлено, что

макрофаги, инвазирующие ткани миоматозного узла, отличаются высоким синтезом Activin A (42,13 (2,84–82,31) норм. кп 1000) по сравнению с макрофагами, инвазирующими эндометрий здоровых фертильных женщин (0,97 (0,00;30,58) норм. кп 1000; $p = 0,024$).

При расчете корреляционных связей было установлено, что процент классически активированных макрофагов в ткани узла имел сильную прямо пропорциональную зависимость от синтеза коллагена в ткани узла ($r = 0,83$; $p = 0,000$). Также стоит отметить, что уровень CD36⁺ макрофагов, инвазирующих миоматозный узел, обратно пропорционально соотносился с концентрацией коллагена 1-го типа в ткани миоматозного узла ($r = -0,58$; $p = 0,014$), а уровень эндометриальных CD206⁺ макрофагов, напротив, имел заметную прямо пропорциональную зависимость от концентрации коллагена 1-го типа в ткани миоматозного узла ($r = 0,56$; $p = 0,020$).

Основываясь на классификации, предложенной Funaki и соавт. [5], мы разделили лейомиомы на 3 группы, в зависимости от их МРТ-картины, на основе интенсивности сигнала на T2 взвешенных изображениях (T2W) по отношению к скелетным мышцам и абдоминальному жиру:

- 7 клеточных миом, имевших изоинтенсивный сигнал на T2ВИ, характерный для тканей с преобладанием клеточного компонента;
- 12 простых миом, отличавшихся гипоинтенсивным сигналом на T2ВИ, характерным для тканей с преобладанием соединительнотканного матрикса;
- 6 дегенеративных миом, имевших гиперинтенсивный сигнал на T2ВИ, что характерно для кистозной, геморрагической или миксоидной дегенерации миоматозных узлов.

Нами не было выявлено статистически значимых различий в доле классически активированных макрофагов, инвазирующих лейомиому (табл. 2). Для простой лейомиомы было характерно снижение содержания «промежуточных» макрофагов с фенотипом CD14⁺⁺CD16⁺, в сравнении с клеточным типом лейомиомы. В свою очередь, лейомиомы с выраженными дегенеративными изменениями были ассоциированы с низким процентом «неклассических» макрофагов. Мы не выявили статистически значимых отличий в экспрессии рецепторов-мусорщиков макрофагами миоматозного узла в зависимости от особенностей МРТ-картины.

В ходе проведенного исследования было установлено, что уровень экспрессии мРНК Activin A был выше в макрофагах, инвазирующих простые и дегенеративные лейомиомы, по сравнению с таковым в макрофагах клеточных миоматозных узлов (табл. 3). Напротив, синтез RAR α был выше в макрофагах, инвазирующих лейомиомы клеточного типа, по сравнению с макрофагами дегенеративных миоматозных узлов.

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА МАКРОФАГОВ МИОМАТОЗНОГО УЗЛА И ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С ЛЕЙОМИОМОЙ МАТКИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PHENOTYPE FEATURES OF MACROPHAGES OF LEIOMYOMATOUS NODE AND ENDOMETRIUM IN WOMEN WITH UTERINE LEIOMYOMA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Макрофаги, % Macrophages, %	Эндометрий контрольной группы Control group endometrium (n = 12)	Эндометрий в проекции узла Endometrium in the projection of the node (n = 42)	Лейомиома Leiomyoma (n = 25)
CD14⁺CD16⁻	79,50 (76,04-84,37)	77,00 (69,14-82,83)	44,40 (33,92-49,80) p ₁ = 0,000* p ₂ = 0,000**
CD14⁺CD16⁺	10,86 (10,63-13,20)	16,50 (12,00-19,62) p ₁ = 0,026	33,61 (15,66-38,45) p ₁ = 0,001 p ₂ = 0,003
CD14⁻CD16⁺	3,34 (2,40-7,00)	5,11 (2,80-9,30)	18,11 (14,74-37,70) p ₁ = 0,000 p ₂ = 0,000
CD36⁺	33,00 (25,90-41,90)	47,10 (38,20-55,80) p ₁ = 0,045	29,65 (22,20-33,51) p ₂ = 0,000
CD206⁺	40,30 (35,80-55,70)	46,05 (40,75-56,25)	13,20 (8,90-15,50) p ₁ = 0,000 p ₂ = 0,000

Примечание. * p₁ – различия в сравнении с контрольным эндометрием, ** p₂ – различия в сравнении с эндометрием в проекции узла.

Note. * p₁, differences in comparison with the control endometrium; ** p₂, differences in comparison with the endometrium in the projection of the node.

ТАБЛИЦА 2. ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА МАКРОФАГОВ МИОМАТОЗНОГО УЗЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МРТ-КАРТИНЫ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PHENOTYPE FEATURES OF LEIOMYOMATOS NODE MACROPHAGES DEPENDING ON THE MRI-PICTURE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Макрофаги, % Macrophages, %	Клеточная лейомиома Cellular leiomyoma (n = 7)	Простая лейомиома Simple leiomyoma (n = 12)	Дегенеративная лейомиома Degenerative leiomyoma (n = 6)
CD14⁺CD16⁻	33,92 (30,49-44,40)	45,09 (42,50-63,53)	44,47 (43,55-47,92)
CD14⁺CD16⁺	31,81 (25,50-39,26)	15,66 (11,34-21,24) p ₁ = 0,041*	38,19 (36,67-38,85) p ₂ = 0,027**
CD14⁻CD16⁺	24,70 (20,70-37,70)	19,62 (16,60-47,69)	14,01 (12,82-15,54) p ₁ = 0,019 p ₂ = 0,050
CD36⁺	31,41 (28,40-34,75)	26,30 (17,20-33,88)	26,10 (21,76-31,69)
CD206⁺	15,50 (8,90-16,80)	13,10 (8,90-13,40)	14,20 (10,00-17,20)

Примечание. * p₁ – различия в сравнении с клеточной лейомиомой матки, ** p₂ – различия в сравнении с простой лейомиомой матки.

Note. * p₁, differences in the comparison with cellular uterine leiomyoma; ** p₂, differences in the comparison with simple uterine leiomyoma.

ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ мРНК ACTIVIN A И RAR α МАКРОФАГАМИ МИОМАТОЗНОГО УЗЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МРТ-КАРТИНЫ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. ACTIVIN A AND RAR α mRNAs EXPRESSION BY MACROPHAGES OF LEIOMYOMATOUS NODE DEPENDING ON THE MRI-PICTURE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, копий пар $\times 1000$ Copies of pairs index $\times 1000$	Клеточная лейомиома Cellular leiomyoma (n = 7)	Простая лейомиома Simple leiomyoma (n = 12)	Дегенеративная лейомиома Degenerative leiomyoma (n = 6)
мРНК Activin A Activin A mRNA	0,00 (0,00-3,61)	30,32 (3,76-68,09) p = 0,019*	5,98 (2,09-19,62) p = 0,027
мРНК RAR α RAR α mRNA	700,76 (549,52-703,01)	123,42 (63,50-1053,81)	99,55 (42,09-122,67) p = 0,011

Примечание. * p – различия в сравнении с клеточной лейомиомой матки.

Note. * p, differences in comparison with cellular uterine leiomyoma.

Обсуждение

В ткани эндометрия, расположенного в проекции миоматозного узла, наблюдалось увеличение процента «промежуточных» макрофагов с фенотипом CD14⁺⁺CD16⁺. Также в эндометрии пациенток с лейомиомой матки был увеличен процент макрофагов, экспрессирующих сквенджер рецепторы CD36, что подтверждает повышение доли альтернативно активированных макрофагов. «Промежуточные» макрофаги способны оказывать как про- так и противовоспалительное действие, которое чаще всего рассматривают как маркер хронического воспаления [15]. Данные изменения в эндометрии, по-видимому, могут играть ключевую роль в неудаче имплантации и повторном невынашивании беременности. В обследованной нами группе 18,1% женщин с лейомиомой имели выкидыш и (или) замершую беременность в анамнезе. У каждой шестой пациентки с миомой матки был диагноз бесплодие. Даже при отсутствии деформации полости матки, наличие миоматозного узла может вызвать воспаление в эндометрии [6], за которым следуют изменения в экспрессии стероидных рецепторов и нарушение функции иммунокомпетентных клеток, участвующих в регуляции «окна имплантации» и децидуализации эндометрия [9]. Хронический провоспалительный эффект, оказываемый клетками-предшественниками лейомиомы, может объяснить, почему даже небольшие миомы или диффузный лейомиоматоз на ранней стадии препятствуют имплантации эмбриона [9]. По данным литературы, лейомиомы матки присутствуют у 27% женщин, обращающихся за репродуктивной помощью, а миомэктомия с использованием минимально инвазивных методов увеличивает частоту наступления беременности у 68% пациенток, ранее страдавших от бесплодия [10]. Полученные нами результаты исследования позволяют предположить, что микроокружение, формируемое в ткани лейомиомы, распространяет свое влияние и

на эндометрий, расположенный в проекции узла. Под этим влиянием происходит сдвиг дифференцировки эндометриальных макрофагов в сторону увеличения доли альтернативно активированных макрофагов, поэтому большой интерес представляют особенности дифференцировки макрофагов, инвазирующих ткани лейомиомы.

Непосредственно в ткани миоматозного узла доля «классических» макрофагов была ниже, чем в эндометрии, расположенном в его проекции, за счет сдвига дифференцировки в пользу «промежуточных» и «неклассических» макрофагов. Помимо этого нами было выявлено усиление экспрессии мРНК Activin A в макрофагах лейомиомы. Однако в ткани лейомиомы был снижен процент альтернативно активированных макрофагов, экспрессирующих рецепторы CD36 и CD206, по сравнению с эндометрием, расположенным в проекции миоматозного узла. Сама по себе инфильтрация ткани опухолей макрофагами ассоциируется с плохим прогнозом и коррелирует с устойчивостью к химиотерапии при большинстве видов опухолей [2]. Накопление в миоматозном узле «промежуточных» и «неклассических» макрофагов, ассоциированных с альтернативной активацией данных фагоцитов, может быть обусловлено формированием пула опухоль-ассоциированных макрофагов, дифференцирующихся в специфическом микроокружении ткани лейомиомы.

Согласно данным последних лет, популяция альтернативно активированных макрофагов не является однородной. Существует классификация M2-клеток с выделением IL-4, IL-13-активированных M2 α , активированных иммунными комплексами M2b- и IL-10-деактивированных M2c-макрофагов [13]. Другие авторы подразделяют M2-популяцию на макрофаги, участвующие в заживлении ран, и регуляторные макрофаги [12]. В то же время многие исследователи признают достаточно условными эти деления на субпопуляции, так как макрофаги часто

одновременно обладают свойствами различных субпопуляций. Тканевая среда сама по себе является основным регулятором фенотипа макрофагов и может влиять на экспрессию многих генов [4]. Так, опухоль-ассоциированные макрофаги имеют свойства как регуляторных, так и участвующих в заживлении ран клеток [12].

На основании собранных данных, мы можем предположить, что в ткани миоматозного узла происходит увеличение количества альтернативно активированных макрофагов, не экспрессирующих рецепторы CD206 и CD36, и (или) повышается активность альтернативно активированных макрофагов, связанная с секрецией Activin A.

В исследовании нами проводилось разделение миоматозных узлов на три наиболее распространенных типа лейомиомы по МРТ-картине, в зависимости от преобладания и структуры распределения компонентов, составляющих миоматозные узлы. Самым часто встречаемым типом опухоли, который, по нашим данным, составлял 48%, была простая лейомиома, отличающаяся преобладанием в ткани узла соединительнотканых компонентов, среди которых чаще всего выделяют коллаген 1-го типа [5]. Повышенный процент «классических» макрофагов в ткани узла ассоциировался с усилением синтеза коллагена, однако мы не выявили статистически значимых различий в доле CD14⁺⁺CD16⁻ макрофагов в зависимости от типа лейомиомы. В простых миоматозных узлах было выявлено снижение процента «промежуточных» макрофагов, происходящее, по всей видимости, за счет смещения дифференцировки макрофагов в сторону «классических» клеток, но при этом в макрофагах усиливался синтез Activin A.

У 28% пациенток по данным МРТ исследования была выявлена клеточная лейомиома, характеризующаяся преобладанием клеточного элемента в ткани узла. Рост таких узлов происходит преимущественно за счет пролиферации лейомиоцитов. В ткани узла наблюдался баланс между «промежуточными» и «неклассическими» макрофагами, при этом в макрофагах отмечалась высокая экспрессия мРНК RAR α , а экспрессия мРНК Activin A, напротив, была минимальной.

На дегенеративные лейомиомы приходилось 24% клинических случаев, которые рассматривались в данном исследовании. Особенностью данного типа узлов являются кистозное и (или) миксоидное перерождение ткани узла. Макрофаги, выделенные из ткани миоматозных узлов данного типа, отличались низким процентом CD14⁺CD16⁺⁺ клеток, в сравнении с макрофагами других типов узлов. Однако, как и в макрофагах, выделенных из простой лейомиомы, в них фиксировался высокий уровень синтеза Activin A при снижении синтеза RAR α .

По-видимому, для поддержания клеточной пролиферации и выживаемости клеток в ткани

лейомиомы необходимо присутствие альтернативно активированных макрофагов, среди которых была повышена экспрессия RAR α , а сдвиг дифференцировки макрофагов со снижением доли «промежуточных» или «неклассических» клеток запускает процесс фиброобразования лейомиомы или кистозного и миксоидного изменения тканей узла.

Известно, что действие на макрофаги агонистов RAR α подавляет синтез провоспалительных цитокинов при последующем воздействии липополисахаридов [8]. Повышенная экспрессия RAR α макрофагами может быть важным элементом в патогенезе формирования клеточного миоматозного узла, за счет подавления воспалительных реакций, которые могли бы осуществлять резидентные макрофаги.

В литературе было показано, что Activin A значительно снижает пролиферацию неизмененных клеток миометрия, но не клеток лейомиомы, однако под его влиянием наблюдается значительное увеличение экспрессии мРНК фибронектина, коллагена 1A1 и версикана в первичных клетках лейомиомы [3]. Данный эффект реализуется и может активно поддерживаться макрофагами в ткани простой и, в меньшей степени, дегенеративной лейомиомах.

Мы не выявили значимых различий в проценте макрофагов, экспрессирующих рецепторы CD206 и CD36, в ткани миоматозного узла, однако процент клеток, экспрессирующих данные рецепторы, имел разнонаправленную корреляционную зависимость по отношению к концентрации коллагена 1-го типа в ткани узла. Если в лейомиомах с высокой концентрацией коллагена процент CD206⁺ макрофагов чаще был выше, то доля макрофагов, экспрессирующих рецептор CD36, напротив, была ниже. Мы не выявили значимых различий в количестве макрофагов, экспрессирующих данные сканенджер рецепторы, в зависимости от типа узла по МРТ-картине.

Заключение

Таким образом, микроокружение, формируемое в ткани миоматозного узла, может приводить к сдвигу дифференцировки инвазирующих его макрофагов в сторону альтернативно активированных клеток. Данный эффект распространяется на эндометрий, расположенный в проекции миоматозного узла, что может быть причиной нарушения репродуктивной функции у женщин с лейомиомой матки. Нарушение баланса между «промежуточными» и «неклассическими» макрофагами, инвазирующими лейомиому, приводит к фиброобразованию или дегенеративным изменениям в ткани узла, что, вероятно, является важным звеном в патогенезе формирования различных клинических вариантов миомы матки.

Список литературы / References

1. Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Красильникова А.К. Иммуные механизмы быстрого роста миомы матки. Иваново: Иваново, 2010. 270 с. [Malyschkina A.I., Sotnikova N.Yu., Antsiferova Yu.S., Krasilnikova A.K. Immune mechanisms of rapid growth of uterine fibroids]. Ivanovo: Ivanovo, 2010. 270 p.
2. Cassetta L., Pollard J.W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2018, Vol. 17, no. 12, pp. 887-904.
3. Ciarmela P., Islam M.S., Reis F.M., Gray P.C., Bloise E., Petraglia F., Vale W., Castellucci M. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum. Reprod. Update*, 2011, Vol. 17, no. 6, pp. 772-790.
4. Davies L.C., Taylor P.R. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*, 2015, Vol. 144, no. 4, pp. 541-548.
5. Funaki K., Fukunishi H., Funaki T., Kawakami C. Mid-term outcome of magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery for uterine myomas: from six to twelve months after volume reduction. *J. Minim. Invasive Gynecol.*, 2007, Vol. 14, no. 5, pp. 616-621.
6. Islam M.S., Catherino W.H., Protic O., Janjusevic M., Gray P.C., Giannubilo S.R., Ciavattini A., Lamanna P., Tranquilli A.L., Petraglia F., Castellucci M., Ciarmela P. Role of activin-A and myostatin and their signaling pathway in human myometrial and leiomyoma cell function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014, Vol. 99, no. 5, pp. E775-E785.
7. Koohestani F., Braundmeier A.G., Mahdian A., Seo J., Bi J., Nowak R.A. Extracellular matrix collagen alters cell proliferation and cell cycle progression of human uterine leiomyoma smooth muscle cells. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 9, e75844. doi: 10.1371/journal.pone.0075844.
8. Nagy L., Szanto A., Szatmari I., Széles L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol. Rev.*, 2012, Vol. 92, no. 2, pp. 739-789.
9. Miura S., Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K., Moriyama S., Masuzaki H., Samejima T., Fujishita A., Ishimaru T. Differential infiltration of macrophages and prostaglandin production by different uterine leiomyomas. *Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 21, no. 10, pp. 2545-2552.
10. Orciani M., Caffarini M., Biagini A., Lucarini G., Delli Carpini G., Berretta A., Di Primio R., Ciavattini A. Chronic inflammation may enhance leiomyoma development by the involvement of progenitor cells. *Stem Cells Int.*, 2018, Vol. 13, 1716246. doi: 10.1155/2018/1716246.
11. Shrivastava R., Shukla N. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. *Life Sci.*, 2019, Vol. 224, pp. 222-231.
12. Tugal D., Liao X., Jain M.K. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013, Vol. 33, no. 6, pp. 1135-1144.
13. Whynott R.M., Vaught K.C.C., Segars J.H.. The effect of uterine fibroids on infertility: a systematic review. *Semin. Reprod. Med.*, 2017, Vol. 35, no. 6, pp. 523-532.
14. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 3, pp. 450-462.
15. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 16, pp. e74-e80.
16. Zhong C., Pu L., Fang M., Rao J., Wang X. ATRA regulates innate immunity in liver ischemia/reperfusion injury via RAR α /Akt/Foxo1 Signaling. *Biol. Pharm. Bull.*, 2018, Vol. 41, no. 4, pp. 530-535.

Авторы:

Сотникова Н.Ю. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Малышкина А.И. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Воронин Д.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Нагорный С.Н. — врач-рентгенолог второй категории рентгенологического диагностического отделения ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Воскресенская Д.Л. — к.м.н., врач акушер-гинеколог ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ, г. Иваново, Россия

Поступила 12.01.2021

Принята к печати 22.03.2021

Authors:

Sotnikova N.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Immunology, V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russian Federation

Malyschkina A.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russian Federation

Voronin D.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russian Federation

Nagornyi S.N., Clinical Radiologist, Department of X-ray Diagnostics, V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russian Federation

Voskresenskaya D.L., PhD (Medicine), Obstetrician-Gynecologist, V. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russian Federation

Received 12.01.2021

Accepted 22.03.2021