

©Коллектив авторов

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ IL-6, IL-8, TNF- α , IL-4 И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МАКРОФАГАМИ CD86 И CD163 В ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ИМЕЕТ ОБРАТНУЮ КОРРЕЛЯЦИЮ СО СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

А.М. Красный^{1,2}, А.А. Садекова¹, Т.Г. Сефиханов¹, В.В. Вторушина¹,
Л.В. Кречетова¹, Е.Г. Хилькевич¹, А.С. Аракелян¹, С.В. Павлович¹*

¹Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4; *эл. почта: alexred@list.ru

²Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

Исследована концентрация восьми различных цитокинов и уровень экспрессии макрофагами CD86 и CD163 в перитонеальной жидкости у женщин с эндометриозом. Установлено, что содержание как провоспалительных (IL-6, IL-8, TNF- α), так и противовоспалительного цитокина (IL-4), а также уровень экспрессии макрофагами провоспалительного маркера CD86 и противовоспалительного маркера CD163 в перитонеальной жидкости повышается у женщин с лёгкими формами наружного генитального эндометриоза (1-2 ст.); у женщин с тяжёлыми формами эндометриоза (3-4 ст.) исследуемые маркеры не отличаются от контрольной группы. Содержание IL-2, IL-10, CM-CSF и IFN- γ в перитонеальной жидкости у женщин с эндометриозом не имело значимых различий с контрольной группой. Результаты исследования свидетельствуют о том, что в основе развития наружного генитального эндометриоза может лежать недостаточная как воспалительная, так и противовоспалительная активность макрофагов в перитонеальной жидкости.

Ключевые слова: эндометриоз; перитонеальная жидкость; цитокины; макрофаги; CD86; CD163

DOI: 10.18097/PBMC20196505432

ВВЕДЕНИЕ

Эндометриоз – гинекологическое заболевание, характеризующееся наличием желёз и стромы эндометрия в пределах брюшной полости. Распространённость эндометриоза у женщин репродуктивного возраста составляет 10-15% [1]. Эндометриоз сопровождается хроническим воспалением [2]. Несмотря на существование многих теорий формирования эндометриоза, патогенез этого заболевания до сих пор остаётся неясным, при этом теория ретроградной менструации Сампсона является наиболее распространённым объяснением возникновения эндометриоза [3, 4]. Перитонеальная жидкость (ПЖ) содержит множество свободно плавающих клеток, включающих макрофаги, естественные киллеры (NK-клетки), лимфоциты, эозинофилы, мезотелиальные и тучные клетки. Макрофаги являются наиболее распространённым типом клеток в перитонеальной жидкости. Обычно перитонеальная жидкость содержит 0,5–2,0 млн. лейкоцитов в 1 мл, из которых 85% составляют макрофаги [5]. После активации макрофаги могут выделять цитокины, простагландины, компоненты комплемента и протеолитические ферменты. Макрофаги способны удалять эритроциты, повреждённые фрагменты ткани и эндометриальные клетки, которые попадают в брюшную полость [6, 7]. Известно, что макрофаги проявляют фенотипическую пластичность в зависимости от микроокружения, крайними состояниями которой является M1 (классически активированное состояние) или

M2 (альтернативно активированное состояние) [8, 9]. M1- и M2-макрофаги обладают различными функциями [7]. Так, M1-макрофаги продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов и специализируются на уничтожении микроорганизмов и дефектных клеток, а M2-макрофаги модулируют адаптивный иммунный ответ, способствуют ангиогенезу и восстановлению тканей, а также участвуют в элиминации клеточного дебриса. Макрофаги M1 характеризуются поверхностным фенотипом, включающим TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, iNOS и MHC-II. Эти клетки высвобождают различные цитокины и хемокины (например, TNF- α , IL-6, IL-12). Макрофаги M2 могут быть идентифицированы по экспрессии поверхностных маркеров, таких как CD163, CD209, IZZ1 и Ym1/2. Макрофаги M2 экспрессируют цитокины и хемокины, такие как IL-10, TGF- β , CCL1, CCL17 и CCL18 [8, 9]. Статус поляризации макрофагов M1-M2 при эндометриозе остаётся спорным. Одни авторы сообщают о том, что макрофаги M2 более распространены в перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом по сравнению с пациентками, перенесшими операцию по поводу лейомиомы матки [10]. Другие авторы, наоборот, сообщили об отсутствии различий в содержании перитонеальных макрофагов M2 у пациенток с эндометриозом и у женщин с другими доброкачественными гинекологическими заболеваниями [11].

Цитокины являются основными медиаторами и коммуникаторами между клетками иммунной системы. Исходя из их иммунорегуляторной роли,

цитокины классифицируются как провоспалительные или противовоспалительные. Провоспалительные цитокины, такие как TNF- α , IFN- γ , GM-CSF и IL-2, инициируют и усиливают воспалительный ответ на инфекции или травмы. Противовоспалительные цитокины, такие как IL-4 и IL-10, главным образом, регулируют интенсивность и продолжительность воспалительного ответа, подавляя эффекты провоспалительных цитокинов, хотя некоторые из них также играют воспалительную роль [12]. TNF- α в основном продуцируется активированными макрофагами, NK-клетками и Th1-клетками [12]. Есть данные о более высоких уровнях TNF- α в ПЖ у женщин с эндометриозом [13, 14], но только на лёгких или ранних стадиях заболевания. IL-6 обладает выраженными воспалительными и противовоспалительными функциями, что затрудняет понимание его роли в эндометриозе. Показано, что у пациенток с эндометриозом уровни IL-6 в ПЖ повышены по сравнению с контрольной группой [15, 16]. IL-10 является противовоспалительным цитокином, способным ингибировать синтез воспалительных цитокинов IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- β и GM-CSF [12]. Было обнаружено повышение уровня IL-10 в ПЖ у женщин с эндометриозом [17]. IL-8 – хемокин, способный привлекать иммунные клетки к участку повреждения и стимулировать их к выработке цитокинов. Имеются данные о корреляции между уровнем IL-8 и стадией заболевания, причём более высокие уровни IL-8 отмечались на ранних стадиях эндометриоза по сравнению с более поздними стадиями [19].

Целью данной работы было изучение про- и противовоспалительной активности макрофагов в перитонеальной жидкости у женщин с лёгкими (1-2 стадии) и тяжёлыми (3-4 стадии) формами наружного генитального эндометриоза (НГЭ). Для этого была изучена экспрессия макрофагами провоспалительного маркера классической активации CD86 и противовоспалительного маркера альтернативной активации CD163, а также исследован уровень восьми цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF и IFN- γ в перитонеальной жидкости.

МЕТОДИКА

Все пациентки, принявшие участие в исследовании, проходили плановое оперативное лечение в отделениях отдела оперативной гинекологии и общей хирургии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Пациентки были разделены на три группы. В 1-ю и 2-ю группы были включены пациентки с НГЭ, в зависимости от степени тяжести заболевания: 23 пациентки с 1-2 стадией эндометриоза и 12 пациенток с 3-4 стадией, соответственно. Стадию эндометриоза устанавливали согласно пересмотренной классификации американского общества фертильности 1985 г. (rAFS) [19]. В случае лёгких форм эндометриоза наблюдали только генитальные поверхностные очаги. Тяжёлые формы характеризовались очагами разных размеров и распространением процесса на брюшину

прямокишечно-маточного пространства с выраженной инфильтрацией. В 3-ю – контрольную группу были включены 37 пациенток с миомой тела матки, у которых при оперативном вмешательстве не было выявлено признаков эндометриоза. Миома является доброкачественным капсулированным образованием, не контактирующим с ПЖ непосредственно, однако для минимизации возможного влияния миомы на цитокины и макрофаги ПЖ пациентки с субсерозным расположением узла в исследование не включались. Оперативное лечение проводили в секреторную фазу менструального цикла – на 16-22 сутки.

Определение концентрации цитокинов

Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α в ПЖ проводили мультиплексным методом с использованием стандартной 8-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex Assay (“Bio-Rad”, США) на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 System (“Bio-Rad”). Результаты обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6.0 Properties (“Bio-Rad”). Содержание цитокинов представлено в пг/мл.

Проточная цитометрия

Макрофаги выделяли из образцов ПЖ, полученной у пациенток из прямокишечно-маточного углубления в процессе оперативного лечения. Для иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела CD86 и CD163 (“Biolegend”, США). Макрофагальный гейт выделяли по данным прямого и бокового светорассеяния. Для более точного определения макрофагов использовали метод, предложенный Liao и соавт., согласно которому мононуклеарные фагоциты от гранулоцитов отделяются с помощью моноклональных антител к HLA-DR [20]. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (“BD”, США) с использованием программного обеспечения “CellQuest Pro”. Для оценки уровня экспрессии CD86 и CD163 определялась средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для каждого маркера в каждом образце.

Статистическая обработка

В зависимости от типа распределения полученных данных результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля или в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение. Статистическую значимость выявленных различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для сравнения трёх независимых групп по одному количественному признаку применялся дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для статистической обработки результатов и построения графиков использовали программы “Attestat” (Россия) и “OriginPro 8.5” (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациенток, включённых в исследование, составил $32,6 \pm 3,4$; $34,1 \pm 3,7$ и $34,8 \pm 4,2$ года соответственно в группах 1, 2 и 3 ($p > 0,05$). Результаты мультиплексного анализа содержания цитокинов в ПЖ обследованных групп женщин представлены на рисунке 1. Было установлено, что концентрация четырёх из них (IL-4, IL-6, IL-8 и TNF- α) была значимо выше в группе пациенток с НГЭ 1-2 стадии по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В группе пациенток с эндометриозом 3-4 стадии по уровню

исследуемых цитокинов статистически значимых различий с контрольной группой выявлено не было. Содержание IL-2, IL-10, GM-CSF и IFN- γ в ПЖ у женщин с эндометриозом не имело статистически значимых отличий от контрольной группы вне зависимости от тяжести заболевания.

Для оценки экспрессии макрофагами CD86 и CD163 использовали как среднюю интенсивность флуоресценции CD86 и CD163, так и их соотношение CD86/CD163 (рис. 2). Установлено, что уровень экспрессии макрофагами провоспалительного маркера CD86 и противовоспалительного маркера CD163 значимо выше у женщин

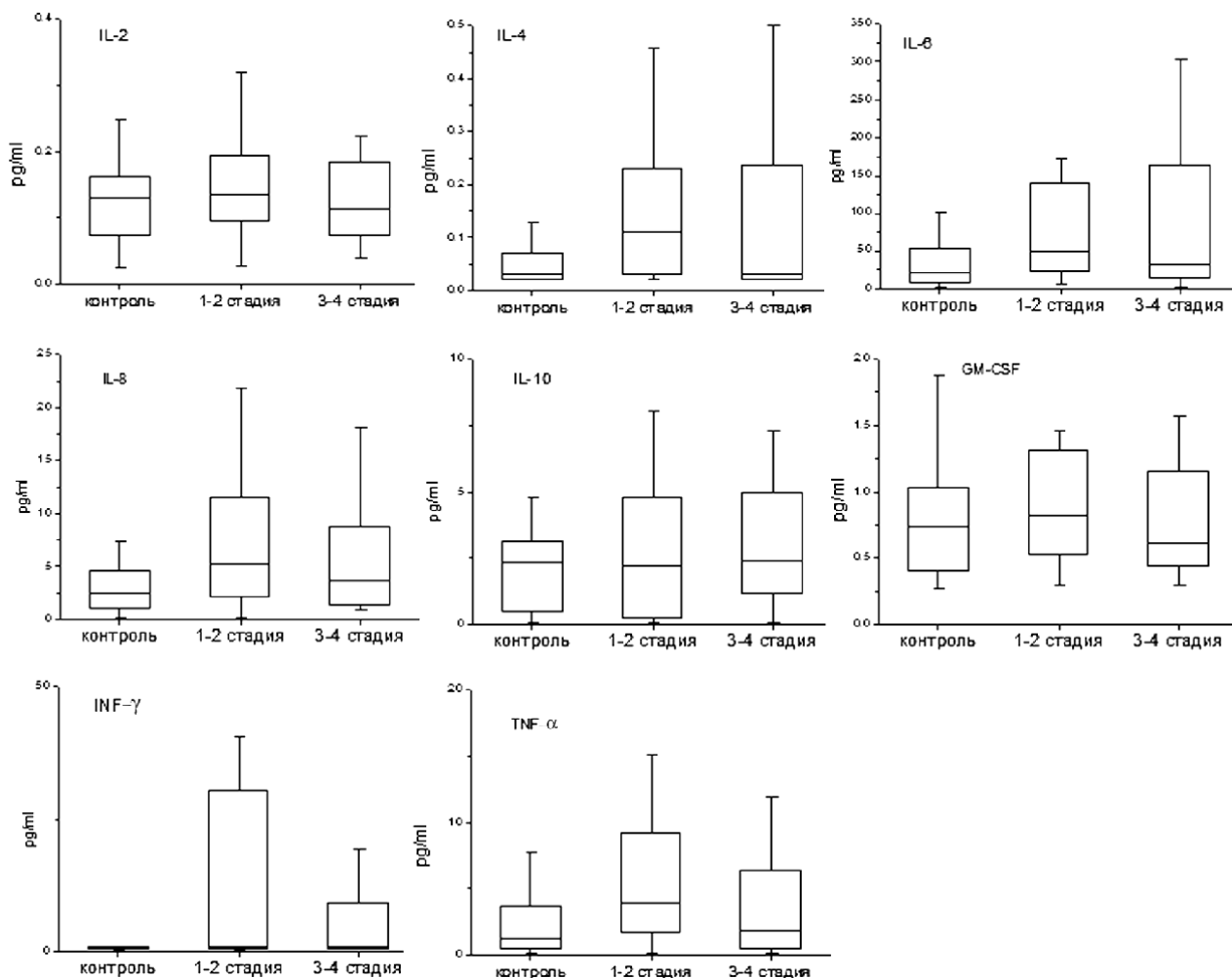


Рисунок 1. Содержание цитокинов в перитонеальной жидкости у женщин с эндометриозом и в контрольной группе.

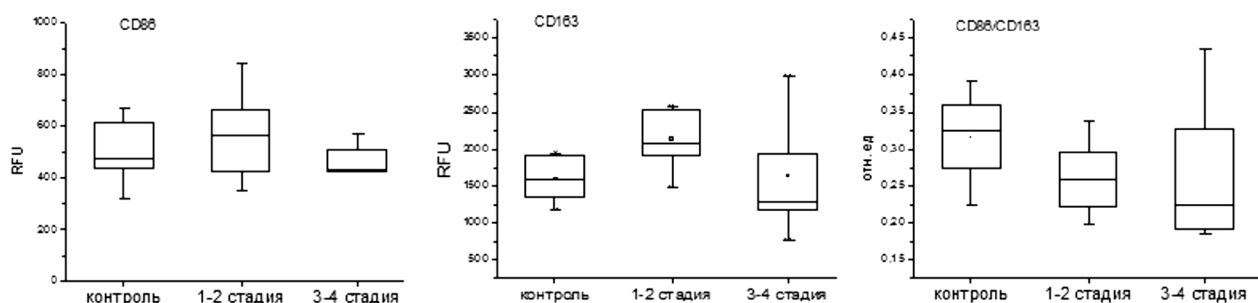


Рисунок 2. Уровень экспрессии макрофагами CD86 и CD163 в перитонеальной жидкости. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) представлена в виде относительных единиц флуоресценции (RFU).

с лёгкими формами НГЭ (1-2 ст.) ($p < 0,05$); при этом у женщин с тяжёлыми формами эндометриоза (3-4 ст.) исследуемые маркеры не отличались от контрольной группы. Соотношение CD86/CD163 в контрольной группе было выше, чем в обеих группах пациенток с НГЭ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была предпринята попытка оценить активность макрофагов в зависимости от тяжести НГЭ, изучив основные цитокины в перитонеальной жидкости и поверхностные маркеры макрофагов: CD86 (кофактор активации лимфоцитов) как маркер классической активации M1 и сквенджер-рецептор CD163 как маркер альтернативной активации M2. Известно, что CD163 экспрессируется всеми макрофагами, однако уровень его экспрессии у классически активированных макрофагов значительно ниже, чем у альтернативно активированных [11]. Исходя из того, что 85% клеток ПЖ составляют макрофаги, мы предполагали, что данные клетки являются основным источником цитокинов в ПЖ. Было установлено, что в случае лёгких форм эндометриоза в ПЖ повышается как уровень цитокинов, характерных для классической активации IL-6, IL-8 и TNF- α [21], так и уровень IL-4 – фактора, вызывающего альтернативную активацию. При тяжёлых формах НГЭ отличий измеренных показателей от контрольной группы обнаружено не было. Другими авторами также была отмечена обратная корреляция с тяжестью заболевания провоспалительных цитокинов TNF- α [13, 14] и IL-8 [18] в ПЖ. При исследовании поверхностных маркеров поляризации макрофагов были получены результаты, согласующиеся с изменениями содержания цитокинов в ПЖ. Уровни экспрессии CD86 и CD163 макрофагами ПЖ у женщин с лёгкими формами эндометриоза были выше, чем в контроле, а у женщин с тяжёлыми формами заболевания не отличались от контроля. Несмотря на то, что соотношение CD86/CD163 снижалось при увеличении степени тяжести эндометриоза, нами не выявлено даже тенденции к поляризации макрофагов. Более того, было обнаружено, что изменение экспрессии про- и противовоспалительных поверхностных маркеров и цитокинов в перитонеальной жидкости происходило однонаправленно. Данное явление можно объяснить тем, что при ретроградных менструациях макрофагам приходится проявлять как цитотоксическую активность для удаления эндометриальных клеток, проявляя свойства M1 активированных макрофагов, так и очищать ПЖ от эритроцитов и клеточного дебриса, то есть выполнять функции M2 макрофагов. В данном исследовании мы сравнивали измеренные показатели в случае тяжёлых распространенных инвазивных форм эндометриоза и лёгких форм с немногочисленными гетеротопиями, однако только в случае лёгких форм наблюдалось повышение активности макрофагов. Таким образом, в данном исследовании была обнаружена обратная корреляция активности макрофагов с тяжестью заболевания.

Исходя из полученных результатов, выявляется проблема определения первичных факторов, ограничивающих активность макрофагов. Вполне вероятно, что развитие эндометриоза определяется функциональным состоянием иммунной системы и в меньшей степени зависит от поведения клеток эктопического эндометрия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

На проведение исследования получено разрешение комиссии по этике ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России. Перед забором биологического материала все женщины подписали информированное согласие на участие в клиническом исследовании.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках государственного задания “Разработка подходов для неинвазивной диагностики эндометриоза на основе омиксных технологий”, регистрационный номер АААА-А19-119021490132-9.

ЛИТЕРАТУРА

1. Giudice L.C., Kao L.C. (2004) Lancet, **364**(9447), 1789-1799.
2. Brosens I., Benagiano G. (2011) Indian J. Med. Res., **133**(6), 581-593.
3. Acién P., Velasco I. (2013) ISRN Obstetrics Gynecology, **2013**(4), 242149.
4. Красный А.М., Волгина Н.Е., Садекова А.А., Щипицына В.С., Сухих Г.Т., Адамян Л.В., Озернюк Н.Д. (2017) Известия Российской академии наук. Серия биологическая, №2, 77-80. [Krasnyi A.M., Volgina N.E., Sadekova A.A., Shchipsynsya V.S., Sukhih G.T., Adamyan L.V., Ozernyuk N.D. (2017) Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya biologicheskaya, №2, 77-80.]
5. van Furth R., Raeburn J.A., van Zwet T.L. (1979) Blood, **54**(2), 485-500.
6. Gazvani R., Templeton A. (2002) Reproduction, **123**, 217-226.
7. Riccio L.D.G.C., Santulli P., Marcellin L., Abrão M.S., Batteux F., Chapron C. (2018) Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, **50**, 39-49.
8. Sica A., Mantovani A. (2012) J. Clin. Invest., **122**(3), 787-795.
9. Yao Y., Xu X.H., Jin L. (2019) Frontiers Immunol., **10**, 792.
10. Bacci M., Capobianco A., Monno A., Cottone L., Di Puppo F., Camisa B., Mariani M., Brignole C., Ponzone M., Ferrari S., Panina-Bordignon P., Manfredi A.A., Rovere-Querini P. (2009) Am. J. Pathol., **175**(2), 547-556.
11. Itoh F., Komohara Y., Takaishi K., Honda R., Tashiro H., Kyo S., Katabuchi H., Takeya M. (2013) Fertility & Sterility, **99**(6), 1705-1713.
12. Cameron M.J., Kelvin D.J. (2003) Adv. Exper. Med. Biol., **520**, 8-32.
13. Cheong Y.C., Shelton J.B., Laird S.M., Richmond M., Kudesia G., Li T.C., Ledger W.L. (2002) Hum. Reprod., **17**(1), 69-75.
14. Pizzo A., Salmeri F.M., Ardita F.V., Sofo V., Tripepi M., Marsico S. (2002) Gynecologic Obstetric Invest., **54**(2), 82-87.

15. Harada T., Yoshioka H., Yoshida S., Iwabe T., Onohara Y., Tanikawa M., Terakawa N. (1997) Am. J. Obstetr. Gynecol., **176**(3), 593-597.
16. Волгина Н.Е., Щипицына В.С., Хилькевич Е.Г., Чупрынин В.Д., Адамян Л.В., Озернюк Н.Д., Красный А.М. (2016) Иммунология, **37**(3), 181-184. [Volgina N.E., Shchipitsyna V.S., Khilkevich E.G., Chuprynin V.D., Adamyan L.V., Ozernyuk N.D. Krasnyi A.M. (2016) Immunologiya, **37**(3), 181-184.]
17. Ho H.N., Wu M.Y., Chao K.H., Chen C.D., Chen S.U., Yang Y.S. (1997) Hum. Reprod., **12**(11), 2528-2533.
18. Gazvani M.R., Christmas S., Quenby S., Kirwan J., Johnson P.M., Kingsland C.R. (1998) Hum. Reprod., **13**(7), 1957-1961.
19. Саидданеш Ш.Ф., Чупрынин В.Д., Хилькевич Е.Г., Буралкина Н.А., Павлович С.В., Данилов А.Ю., Чурсин В.В. (2017) Акушерство и гинекология, №5, 39-43. [Saiddanesh Sh.F., Chuprynin V.D., Khilkevich E.G., Buralkina N.A., Pavlovich S.V., Danilov A.Yu., Chursin V.V. (2017) Akusherstvo i ginekologiya, №5, 39-43.]
20. Liao C.T., Andrews R., Wallace L.E., Khan M.W., Kift-Morgan A., Topley N., Fraser D.J., Taylor P.R. (2017) Kidney International, **91**(5), 1088-1103.

Поступила в редакцию: 17. 06. 2019.
После доработки: 01. 09. 2019.
Принята к печати: 02. 09. 2019.

THE CONTENT OF CYTOKINES IL-6, IL-8, TNF- α , IL-4 AND THE LEVEL OF EXPRESSION IN MACROPHAGES CD86 AND CD163 IN PERITONEAL FLUID HAS A REVERSE CORRELATION WITH THE DEGREE OF SEVERITY OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

A.M. Krasnyi^{1,2*}, A.A. Sadekova¹, T.G. Sefihanov¹, V.V. Vtorushina¹,
E.G. Krechetova¹, E.G. Khilkevich¹, A.S. Arakelyan¹, S.V. Pavlovich¹

¹Academician Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
4 Acad. Oparina str., Moscow, 117997 Russia; *e-mail: alexred@list.ru

²Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26 Vavilova str., Moscow, 119334 Russia

Concentrations of eight different cytokines and the level of expression of CD86 and CD163 macrophages were studied in peritoneal fluid in women with endometriosis. It was found that the concentration of both inflammatory (IL-6, IL-8, TNF- α) and anti-inflammatory cytokines (IL-4) as well as the level of macrophage expression of the proinflammatory marker CD86 and anti-inflammatory marker CD163 increased in women with mild external genital endometriosis (1-2 stage), and did not differ from the control group in women with severe endometriosis (3-4 stage). The content of IL-2, IL-10, CM-CSF and IFN- γ in the peritoneal fluid of women with endometriosis did not differ significantly from the control group. The results of the study indicate that the development of external genital endometriosis may be based on insufficient both inflammatory and anti-inflammatory activity of macrophages in the peritoneal fluid.

Key words: endometriosis; peritoneal fluid; cytokines; macrophages; CD86; CD163

Funding. The research was carried out within the state assignment "Development approaches for non-invasive diagnosis of endometriosis based on omics technologies", registration number AAAA-A19-119021490132-9.

Received: 17.06.2019, revised: 01.09.2019, accepted: 02.09.2019.