

УДК: 618.3-06:616.379-008.64]-056.257-092.18

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МАКРОФАГІВ У ПЛАЦЕНТАХ ЖІНОК З ОЖИРІННЯМ ТА ГЕСТАЦІЙНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

*Лазуренко В.В.¹, Железняков О.Ю.¹,
Мирошніченко М.С.¹, Железнякова Е.Ю.²*

¹Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

²Харківський національний економічний університет імені Семена Кузнеця,
Харків, Україна

Серед механізмів, які лежать в основі розвитку плацентарної дисфункції у жінок з ожирінням та гестаційним цукровим діабетом, може бути дисбаланс клітин макрофагального ряду та зміни їх морфо-функціонального стану. Метою роботи було визначення імуногістохімічних особливостей макрофагів у плацентах жінок з ожирінням та гестаційним цукровим діабетом. Матеріалом для морфологічного дослідження були плаценти від 40 жінок з доношеною вагітністю: 1 група – 10 плацент від жінок з нормальним індексом маси тіла та фізіологічним перебігом вагітності, 2 група – 10 плацент від жінок, у яких перебіг вагітності ускладнився гестаційним цукровим діабетом, 3 група – 10 плацент від жінок з ожирінням, 4 група – 10 плацент від жінок з ожирінням, перебіг вагітності яких ускладнився гестаційним цукровим діабетом. При підрахунку абсолютної кількості CD68⁺-клітин було відмічено їх збільшення ($p < 0,05$) у групах 2–4 (група 2 – $(55,4 \pm 2,06)$, група 3 – $(84,9 \pm 1,58)$, група 4 – $(127,6 \pm 3,03)$) порівняно з групою 1 ($30,3 \pm 1,21$). У групах 2–4 порівняно з групою 1 порушувалося співвідношення між M1 та M2 макрофагами, про що свідчило превалювання ($p < 0,05$) абсолютної кількості M1 макрофагів над абсолютною кількістю M2 макрофагів. Наявність ожиріння у вагітної жінки, гестаційного цукрового діабету та їх поєднання призводять, по-перше, до збільшення кількості CD68⁺-макрофагів; по-друге, до зменшення кількості M2 макрофагів та збільшення кількості M1 макрофагів з відповідним порушенням балансу між ними у плодовій та материнській частинах плацент. Виявлений авторами макрофагальний дисбаланс у плацентах був мінімально вираженим при гестаційному цукровому діабеті, помірно вираженим при ожирінні у матері та максимально вираженим при поєднанні ожиріння і гестаційного цукрового діабету.

Ключові слова: вагітність, плацентарна дисфункція, дисбаланс клітин.



Цитуйте українською: Лазуренко ВВ, Железняков ОЮ, Мирошніченко МС, Железнякова ЕЮ. Імуногістохімічні особливості макрофагів у плацентах жінок з ожирінням та гестаційним цукровим діабетом. Експериментальна і клінічна медицина. 2024;93(4):16-23. <https://doi.org/10.35339/ekm.2024.93.4.lzm>

Cite in English: Lazurenko VV, Zhelezniakov OYu, Miroshnychenko MS, Zhelezniakova EYu. Immunohistochemical features of macrophages in placentas of obese women with gestational diabetes mellitus. Experimental and Clinical Medicine. 2024;93(4):16-23. <https://doi.org/10.35339/ekm.2024.93.4.lzm> [in Ukrainian].

© Лазуренко В.В., Железняков О.Ю.,
Мирошніченко М.С.,
Железнякова Е.Ю., 2024

CC BY-NC-SA

© Lazurenko V.V., Zhelezniakov O.Yu.,
Miroshnychenko M.S.,
Zhelezniakova E.Yu., 2024

Відповідальний автор: Лазуренко В.В.
✉ Україна, 61022, м. Харків,
пр. Науки, 4, ХНМУ.
E-mail: vlazur13@gmail.com

Corresponding author: Lazurenko V.V.
✉ Ukraine, 61022, Kharkiv,
Nauki ave., 4, KhNMU.
E-mail: vlazur13@gmail.com

Вступ

Макрофаги в плаценті є гетерогенною популяцією імунних клітин, що представлені клітинами Кашенко-Гофбауера та асоційованими з плацентою материнськими макрофагами [1].

Клітини макрофагального ряду відіграють важливу роль в імплантації ембріона, формуванні плаценти та сталості її морфо-функціональних показників, внутрішньоутробному розвитку плода, пологах [2]. Макрофагальний дисбаланс у плаценті може спричиняти розвиток різних ускладнень під час вагітності та пологів, негативно впливати на стан здоров'я плода та новонародженого [3].

Участь плацентарних макрофагів у різних фізіологічних та патологічних процесах обумовлена їх пластичністю, тобто здатністю змінювати свій фенотип та функціональні характеристики [4]. Макрофаги традиційно поділяють на класично активовані (M1) та альтернативно активовані (M2). Останні, в свою чергу, поділяються на чотири підтипи: M2a, M2b, M2c і M2d [1].

M1 макрофаги приймають участь у прозапальних процесах, в той час як M2 макрофаги – у протизапальних процесах. M1 макрофаги продукують прозапальні цитокіни (ІЛ-12, ІЛ-23), активні форми кисню та ін. M2 макрофаги продукують протизапальні цитокіни (ІЛ-10), сприяють ремоделюванню та репарації тканин, що були ушкоджені внаслідок дії M1 макрофагів [5; 6].

Ожиріння у вагітних жінок є актуальною проблемою сьогодення в Україні та

світі. В Європі 28,8 % жінок репродуктивного віку мають надмірну вагу та 13,8 % ожиріння. В Україні зайву вагу мають 35,0 % жінок, на ожиріння страждають 18,3 % українок [7]. Згідно з прогнозами учених до кінця 2025 року понад 21,0 % жінок будуть страждати на ожиріння [8]. Наявність ожиріння у жінки значно збільшує частоту розвитку різних ускладнень вагітності та пологів. Одним із таких ускладнень може бути гестаційний цукровий діабет. Ученими доведено, що ризик розвитку гестаційного цукрового діабету збільшується в 1,3–3,8 рази у жінок з ожирінням порівняно з жінками з нормальним індексом маси тіла [9].

Поєднання ожиріння та гестаційного цукрового діабету призводять до змін морфо-функціонального стану плаценти [10; 11]. Серед механізмів, які лежать в основі розвитку плацентарної дисфункції у жінок з ожирінням та гестаційним цукровим діабетом, може бути дисбаланс клітин макрофагального ряду та зміни їх морфо-функціонального стану. Ретельно проведений нами аналіз даних літератури не дозволив виявити досліджень, присвячених вивченню плацентарних макрофагів у жінок з ожирінням та гестаційним цукровим діабетом.

Метою роботи було визначення імуністохімічних особливостей макрофагів у плацентах жінок з ожирінням та гестаційним цукровим діабетом.

Матеріали та методи

Матеріалом для морфологічного дослідження були плаценти від 40 жінок

з доношеною вагітністю. Усі випадки були розподілені на 4 групи (по 10 випадків у кожній групі). До групи 1 були віднесені плаценти від жінок з нормальним індексом маси тіла та фізіологічним перебігом вагітності. До групи 2 увійшли плаценти від жінок, у яких перебіг вагітності ускладнився гестаційним цукровим діабетом. До групи 3 були віднесені плаценти від жінок з ожирінням. До групи 4 увійшли плаценти від жінок з ожирінням, перебіг вагітності яких ускладнився гестаційним цукровим діабетом.

У кожному випадку з плаценти вирізали два шматочки (один з периферії, а один з центральної частини), які фіксували в 10 % розчині формаліну. Ущільнення тканин, фіксованих у формаліні, досягалося проведенням через спирти зростаючої концентрації, розчин Нікіфорова (96 % спирт та діетиловий ефір у співвідношенні 1:1), хлороформ та заливанням у парафін. З виготовлених блоків були зроблені серійні зрізи товщиною $[4-5] \times 10^{-6}$ м для наступного забарвлення гематоксиліном та еозином.

Імуногістохімічне дослідження було проведено на адгезивних скельцях Super Frost Plus ("Menzel", Німеччина). Використовували систему детекції Master Polymer Plus Detection (Peroxidase, хромоген ДАБ) (Master Diagnostica, Spain), для високотемпературної обробки епітопів антигенів цитратний буфер (pH 6,0), EDTA буфер (pH 8,0). Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням мишиного МоноКлонального Антитіла (МКА) до CD68 (клон KP-1, Master Diagnostica, Spain) (маркер клітин макрофагального ряду), кролячого МКА до CD163 (клон EP324, Master Diagnostica, Spain) (маркер M2 макрофагів), мишиного МКА до CD86 (клон GL1, Thermo Fisher Scientific, USA) (маркер M1 макрофагів). Імуногістохімічні реакції оцінювали шляхом підрахунку абсолютної кількості

імунопозитивних клітин у полі зору мікроскопа $\times 100$.

Показники в групах обробляли статистично за допомогою програми PAST (version 4.15, Natural History Museum, University of Oslo, Norway). Середні значення показників у групах порівнювали за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважалися значимими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

При оглядовій мікроскопії препаратів плацент у групах 1–4 у пластинці хоріона, ворсинчастому хоріоні, міжворсинчастому просторі, децидуальній оболонці визначалися нерівномірно розташовані CD68+-клітини, які є маркером клітин макрофагального ряду (рис. 1). Імунопозитивні клітини мали різну форму та розміри, що свідчило про їх різний морфофункціональний стан.

При підрахунку абсолютної кількості CD68+-клітин було відмічено їх збільшення ($p < 0,05$) у групах 2–4 (група 2 – $(55,4 \pm 2,06)$, група 3 – $(84,9 \pm 1,58)$, група 4 – $(127,6 \pm 3,03)$) порівняно з групою 1 ($30,3 \pm 1,21$). У групах 2–4 абсолютна кількість зазначених клітин збільшувалася ($p < 0,05$) у напрямку від групи 2 до групи 4. Отже, макрофагальна інфільтрація в плаценті була мінімально вираженою при гестаційному цукровому діабеті, помірно вираженою при ожирінні та максимально вираженою при поєднанні цих двох патологічних станів.

Метаболічні порушення, такі як гестаційний цукровий діабет та ожиріння, тісно пов'язані із системним запаленням, у тому числі і в плаценті [12; 13]. На сьогодні механізми, що індукують запальні зміни при ожирінні та гестаційному цукровому діабеті, є дискусійними та потребують подальшого вивчення.

Доведено, що гіперглікемія при гестаційному цукровому діабеті стимулює TLR (Toll Like Receptors) – залежні за-

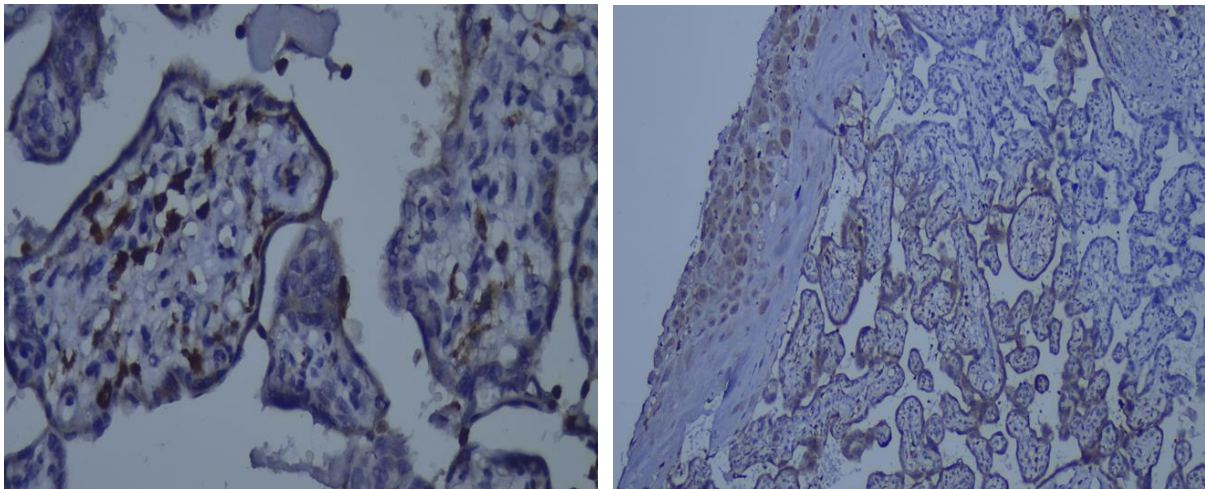


Рис. 1. CD68⁺-клітини у ворсинчастому хоріоні, міжворсинчастому просторі та у децидуальній оболонці у групі 2. Імуногістохімічна реакція з МКА до CD68, а) $\times 400$, б) $\times 100$.

пальні шляхи, у тому числі TLR2, TLR4, що призводить до надмірної продукції прозапальних цитокінів макрофагами [13]. IL-1 β шлях також має значення в індукції запальних змін у плаценті при гестаційному цукровому діабеті.

У жінок з гестаційним цукровим діабетом доведено збільшення вмісту в плаценті таких прозапальних цитокінів, як ФНП- α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8 та IL-15 [12].

У жінок з ожирінням у жировій тканині збільшується вміст імунних клітин, які характеризуються гіперпродукцією прозапальних цитокінів. Останні призводять до розвитку системного хронічного слабко вираженого запалення, яке маніфестує, в тому числі, запальними змінами і в плаценті [9].

Деякі одиничні дослідження довели, що запальні зміни в плаценті максимально виражені при гестаційному цукровому діабеті порівняно з ожирінням [9]. Однак у проведеному нами дослідженні було виявлено більш виражену макрофагальну інфільтрацію в плаценті при ожирінні порівняно з гестаційним цукровим діабетом.

При дослідженні мікропрепаратів, де ставилися імуногістохімічні реакції з МКА до CD86 та CD163, в групах 1–4 у плодовій та материнській частинах плацент візуалізувалися CD86⁺- та CD163⁺-клітини, тобто M1 та M2 макрофаги (рис. 2, 3). Результати підрахунку абсолютної кількості імунопозитивних клітин зазначені на *рисунку 4*.

У групі 1 було виявлено превалювання ($p < 0,05$) абсолютної кількості M2 макрофагів над M1 макрофагами, що співпадає з результатами вчених, які досліджували доношені плаценти при фізіологічному перебігу вагітності [14]. Ученими доведено, що у здорових жінок у «вікні» періоду імплантації та в I триместрі макрофаги не диференціюються на фенотипи. Після успішного завершення інвазії трофобласта макрофаги переключаються на змішаний профіль M1/M2, коли маткові судини піддаються другій хвилі трофобластичної модифікації спіральних артерій. У II триместрі і в ранній фазі III триместру поляризація макрофагів зміщується в бік M2, що, відповідно, забезпечує нормальний перебіг вагітності та розвиток плода [6].

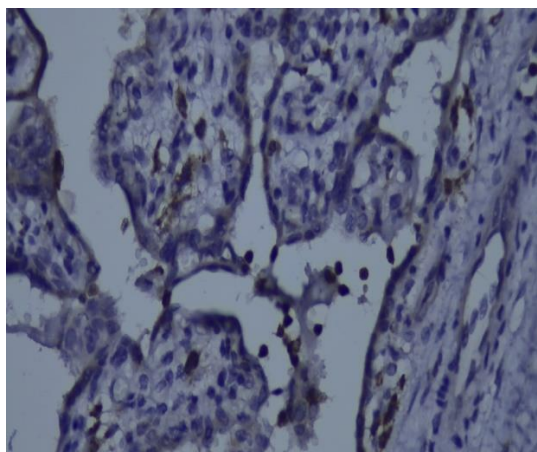


Рис. 2. CD86+-клітини у ворсинчастому хоріоні та міжворсинчастому просторі у групі 2. Імуногістохімічна реакція з МКА до CD86, $\times 400$.

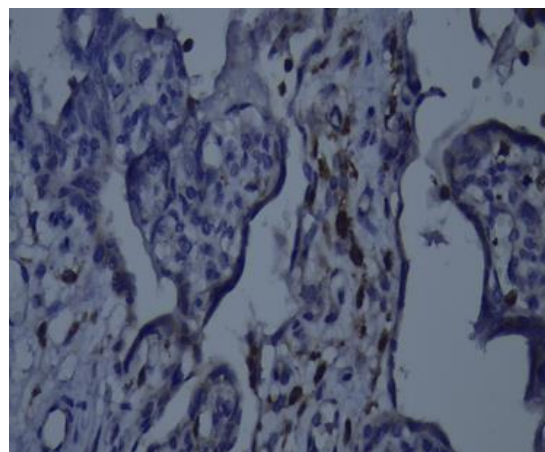


Рис. 3. CD163+-клітини у ворсинчастому хоріоні та міжворсинчастому просторі у групі 4. Імуногістохімічна реакція з МКА до CD163, $\times 400$.

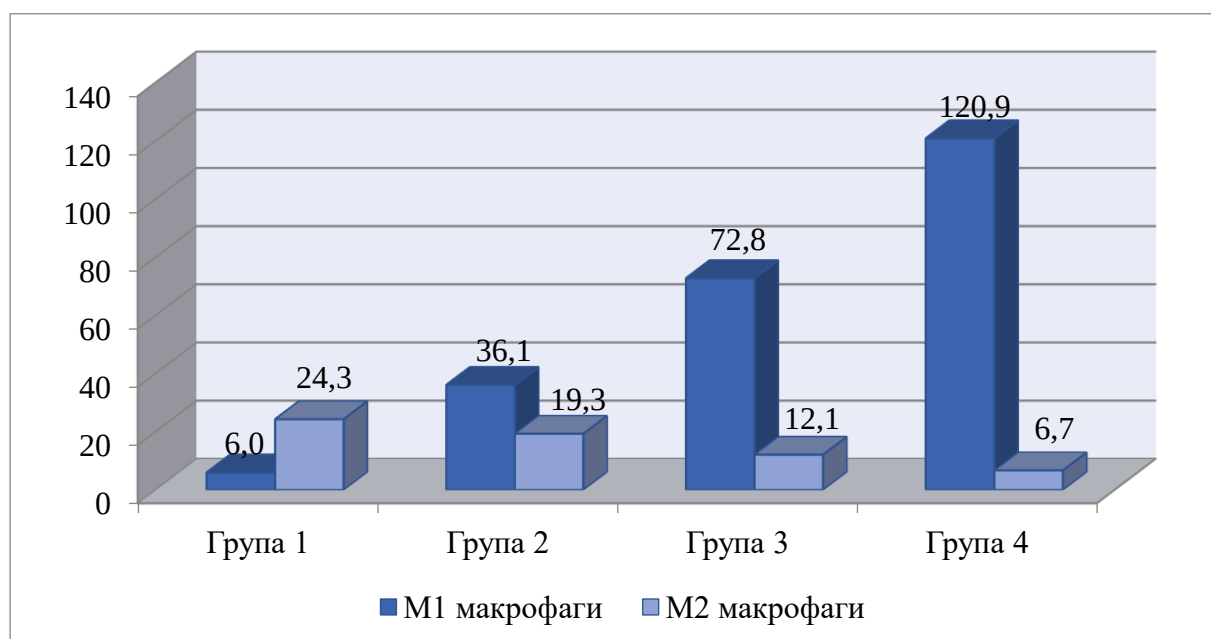


Рис. 4. Середні значення абсолютної кількості M1 та M2 макрофагів у плацентах у групах 1–4.

У групах 2–4, порівняно з групою 1, порушувалося співвідношення між M1 та M2 макрофагами, про що свідчило превалювання ($p < 0,05$) абсолютної кількості M1 макрофагів над абсолютною

кількістю M2 макрофагів. У напрямку від групи 2 до групи 4 збільшувалася ($p < 0,05$) абсолютна кількість M1 макрофагів та зменшувалася ($p < 0,05$) абсолютна кількість M2 макрофагів.

Висновки

Наявність ожиріння у вагітної жінки, гестаційного цукрового діабету та їх поєднання призводять, по-перше, до збільшення кількості CD68⁺-макрофагів; по-друге, до зменшення кількості M2 макрофагів та збільшення кількості M1 макрофагів з відповідним порушенням балансу між ними у плодовій та материн-

ській частинах плацент. Виявлений авторами макрофагальний дисбаланс у плацентах був мінімально вираженим при гестаційному цукровому діабеті, помірно вираженим при ожирінні у матері та максимально вираженим при поєднанні ожиріння та гестаційного цукрового діабету.

Конфлікт інтересів відсутній.

Література

1. Ning J, Zhang M, Cui D, Yang H. The pathologic changes of human placental macrophages in women with hyperglycemia in pregnancy. *Placenta*. 2022;130:60-6. DOI: 10.1016/j.placenta.2022.11.004 PMID: 36417786
2. Yang H, Chelariu-Raicu A, Makri D, Ori C, Ribeiro PCP, Kolben T, et al. Updates of placental macrophages: Origins, molecular markers, functions, and related diseases. *J Reprod Immunol*. 2023;157:103942. DOI: 10.1016/j.jri.2023.103942. PMID: 36989681.
3. Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;67(5):295-309. DOI: 10.1007/s00005-019-00552-7. PMID: 31286151.
4. Yan L, Wang J, Cai X, Liou YC, Shen HM, Hao J, et al. Macrophage plasticity: signaling pathways, tissue repair, and regeneration. *MedComm (2020)*. 2024;5(8):e658. DOI: 10.1002/mco2.658. PMID: 39092292.
5. Brenoe JE, van Hoorn EGM, Beck L, Bulthuis M, Bezemer RE, Gordijn SJ, et al. Altered placental macrophage numbers and subsets in pregnancies complicated with intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) compared to healthy pregnancies. *Placenta*. 2024;153:22-30. DOI: 10.1016/j.placenta.2024.05.129. PMID: 38810541.
6. Ващенко ВЛ, Ліхачова ВК, Акімов ОЄ, Тарановська ОО. Фактори диференціації децидуальних макрофагальних субпопуляцій M1 та M2 у вагітних з прееклампсією, порушення їх співвідношення та пошуки шляхів корекції. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2020;20(3):14-9. DOI: 10.31718/2077-1096.20.3.14.
7. Запорожан ВМ, Марічереда ВГ, Берлінська ЛІ, Петровський ЮЮ, Павловська ОМ, Лавриненко ГЛ. Ускладнення під час вагітності на тлі надмірної ваги та ожиріння. Одеський медичний журнал. 2024;1(186):68-74. DOI: 10.32782/2226-2008-2024-1-11.
8. Quotah OF, Nishku G, Hunt J, Seed PT, Gill C, Brockbank A, et al. Prevention of gestational diabetes in pregnant women with obesity: protocol for a pilot randomised controlled trial. *Pilot Feasibility Stud*. 2022;8(1):70. DOI: 10.1186/s40814-022-01021-3. PMID: 35337389.
9. Pantham P, Aye IL, Powell TL. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta*. 2015;36(7):709-15. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.04.006. PMID: 25972077.
10. Bianchi C, Taricco E, Cardellicchio M, Mandò C, Massari M, Savasi V, et al. The role of obesity and gestational diabetes on placental size and fetal oxygenation. *Placenta*. 2021;103:59-63. DOI: 10.1016/j.placenta.2020.10.013. PMID: 33080447.
11. Bedell S, Hutson J, de Vrijer B, Eastabrook G. Effects of Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus on the Placenta: Current Knowledge and Targets for Therapeutic Interventions. *Curr Vasc Pharmacol*. 2021;19(2):176-92. PMID: 32543363. DOI: 10.2174/1570161118666200616144512.

12. Zgutka K, Tkacz M, Tomasiak P, Piotrowska K, Ustianowski P, Pawlik A, Tarnowski M. Gestational Diabetes Mellitus-Induced Inflammation in the Placenta via IL-1 β and Toll-like Receptor Pathways. *Int J Mol Sci.* 2024;25(21):11409. DOI: 10.3390/ijms252111409. PMID: 39518962.

13. Tauber Z, Burianova A, Koubova K, Mrstik M, Jirkovska M, Cizkova K. The interplay of inflammation and placenta in maternal diabetes: insights into Hofbauer cell expression patterns. *Front Immunol.* 2024;15:1386528. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1386528. PMID: 38590527.

14. Sisino G, Bouckennooghe T, Aurientis S, Fontaine P, Storme L, Vambergue A. Diabetes during pregnancy influences Hofbauer cells, a subtype of placental macrophages, to acquire a pro-inflammatory phenotype. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):1959-68. DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.07.009. PMID: 23872577.

Lazurenko V.V., Zhelezniakov O.Yu., Miroshnychenko M.S., Zhelezniakova E.Yu.

IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF MACROPHAGES IN PLACENTAS OF OBESE WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS

Among the mechanisms underlying the development of placental dysfunction in obese women with gestational diabetes mellitus may be an imbalance of macrophage cells and changes in their morphological and functional state. The aim of the study was to determine the immunohistochemical features of macrophages in the placentas of obese women with gestational diabetes mellitus. The material for the morphological study was placentas from 40 women with full-term pregnancies: Group 1 – 10 placentas from women with a normal body mass index and physiological course of pregnancy, Group 2 – 10 placentas from women whose pregnancy was complicated by gestational diabetes mellitus, Group 3 – 10 placentas from obese women, Group 4 – 10 placentas from obese women whose pregnancy was complicated by gestational diabetes mellitus. When calculating the absolute number of CD68+ cells, their increase ($p < 0.05$) was noted in groups 2–4 (Group 2 – (55.4 ± 2.06) , Group 3 – (84.9 ± 1.58) , Group 4 – (127.6 ± 3.03) compared to Group 1 (30.3 ± 1.21). In groups 2–4, compared with Group 1, the ratio between M1 and M2 macrophages was disturbed, as evidenced by the prevalence ($p < 0.05$) of the absolute number of M1 macrophages over the absolute number of M2 macrophages. The presence of obesity in a pregnant woman, gestational diabetes mellitus and their combination lead, firstly, to an increase in the number of CD68+ macrophages; secondly, to a decrease in the number of M2 macrophages and an increase in the number of M1 macrophages with a corresponding imbalance between them in the fetal and maternal parts of the placenta. The macrophage imbalance in the placentas identified by the authors was minimally expressed in gestational diabetes mellitus, moderately expressed in maternal obesity, and maximally expressed in the combination of obesity and gestational diabetes mellitus.

Keywords: pregnancy, placental dysfunction, cell imbalance.

Надійшла до редакції 24.11.2024

Відомості про авторів

Лазуренко Вікторія Валентинівна – доктор медичних наук, професор, завідувачка кафедри акушерства та гінекології № 2 Харківського національного медичного університету, Україна.

Поштова адреса: Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4, ХНМУ.

E-mail: vlazur13@gmail.com

ORCID: 0000-0002-7300-4868.

Железняков Олександр Юрійович – кандидат медичних наук, доцент кафедри акушерства та гінекології № 3 Харківського національного медичного університету, Україна.

Поштова адреса: Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4, ХНМУ.

E-mail: oy.zhelezniakov@knmu.edu.ua

ORCID: 0009-0004-4667-9191.

Мирошниченко Михайло Сергійович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету, Україна.

Поштова адреса: Україна, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4, ХНМУ.

E-mail: ms.myroshnychenko@knmu.edu.ua

ORCID: 0000-0002-6920-8374.

Железнякова Еліна Юріївна – кандидат фізико-математичних наук, доцент кафедри економіко-математичного моделювання Харківського національного економічного університету імені Семена Кузнеця, Україна.

Поштова адреса: Україна, 61165, м. Харків, пр. Науки, 9-А, ХНЕУ ім. С. Кузнеця.

E-mail: elina.zh1511@gmail.com

ORCID: 0000-0001-6409-4761.