Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт морфологии человека»

На правах рукописи

Косырева
Анна Михайловна

ПОЛОВЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Научный консультант:
д.м.н., проф. Макарова О.В.

Москва – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
ПОЛОВЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СИСТЕМНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ И ИММУННОГО ОТВЕТА 13
1.1 Половые различия регуляторных механизмов иммунного ответа 13
1.2 Возрастные морфофункциональные изменения иммунной системы 22
1.3 Половые гистофизиологические различия иммунной системы в разных возрастных группах 34
1.4 Половые и возрастные различия частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний 37
1.5 Молекулярные механизмы, морфологические и иммунологические изменения при системных воспалительных реакциях 47
1.6 Половые и возрастные особенности системных проявлений воспалительного ответа . 51
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 58
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 65
Глава 3 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ВИСТАР ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ 65
3.1 Морфологические проявления и иммунологические нарушения при системном воспалительном ответе у новорожденных самок крыс Вистар 65
3.2 Морфологические проявления и иммунологические нарушения при системном воспалительном ответе у новорожденных самцов крыс Вистар 74
3.3 Половые различия выраженности иммунологических нарушений и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у новорожденных крыс Вистар 83
3.4 Обсуждение 102
Глава 4 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У КРЫС ВИСТАР ПРЕПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ 108
4.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у самок крыс Вистар препубертатного периода 108
4.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар препубертатного периода 124
4.3 Половые различия выраженности иммунологических нарушений и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у десятидневных крыс Вистар 139
4.4 Обсуждение 161
Глава 5 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ 168
5.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла 168
5.2 Обсуждение 187

5.3 Половые различия морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар.....190

5.3.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самок крыс Вистар 191

5.3.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самцов крыс Вистар 209

5.3.3 Половые различия иммунологических нарушений и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у половозрелых крыс Вистар 227

5.3.4 Обсуждение.....255

Глава 6 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫСОКОЙ ДОЗОЙ ЛПС, У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР 261

6.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самок крыс Вистар 261

6.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самцов крыс Вистар 272

6.3 Половые различия морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар.....284

6.4 Обсуждение.....298

6.5 Сравнительная характеристика половых различий морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар при введении низкой и высокой дозы ЛПС.....301

6.6. Обсуждение.....316

Глава 7 МОРФОЛОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС ВИСТАР В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОВАРИЭКТОМИИ 321

7.1 Морфологические изменения и иммунологические нарушения у самок крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии 321

7.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии.....329

7.3 Обсуждение.....361

Глава 8 МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС ВИСТАР В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОРХИЭКТОМИИ..... 366

8.1 Морфологические и иммунологические изменения у самцов крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии.....366

8.2 Морфологические изменения и иммунологические нарушения при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии 375

8.3 Обсуждение.....408

Глава 9 ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ 415

9.1 Возрастные особенности морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у самок крыс Вистар 415

9.2 Обсуждение 426

9.3 Возрастные особенности морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар 430

9.4 Обсуждение 438

Глава 10 ЗАКЛЮЧЕНИЕ 444

Выводы 458

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 461

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Пол и репродуктивный статус во многом определяют морфофункциональное состояние интегративных систем организма – эндокринной, иммунной и нервной у человека и животных, а также предрасположенность к ряду заболеваний и их течение (Regitz-Zagrosek V. et al.,2006; Ober C. et al., 2008; Arnold A.P., 2010; Voskuhl R., 2011). Половые различия морфофункционального состояния иммунной системы в норме и при антигенной стимуляции зависят от кариотипа и непосредственного влияния половых стероидов на рецепторы иммунокомпетентных клеток. Х-хромосома кодирует более чем 1100 идентифицированных генов, часть из которых определяет функционирование иммунной системы (Fish E.N., 2008). Генотип ХХ снижает риск проявления Х-сцепленных иммунодефицитов, но повышает разнообразие (мозаичность) реакций иммунной системы на различные воздействия у гетерозиготных самок (Burgoyne P.S. et al., 2001, Arnold A.P., 2017). Мутации Y-хромосомы коррелируют с нарушением дифференцировки В-лимфоцитов, NK и iNKT клеток, показателями выживаемости и тяжестью течения вызванного вирусом коксаки В3 инфекционного миокардита у самцов мышей, а у человека – тяжестью течения и смертности от ВИЧ-инфекции (Case L.K., Teuscher C., 2015). Половые гормоны оказывают модулирующее действие на иммунный ответ и определяют половые различия его выраженности. Известно, что эстрогены активируют иммунную систему, в то время как тестостерон оказывает иммуносупрессороное действие (Foo Y.Z. et al., 2016; Roved J. et al., 2017). В репродуктивном возрасте частота и тяжесть течения инфекционно-воспалительных заболеваний у мужчин выше, чем у женщин (Klein S.L., Flanagan K.L., 2016).

В ответ на повреждение, вызванное различными экзогенными и эндогенными агентами, развивается воспаление – сложная комплексная иммунологически обусловленная реакция организма, которая на ранних сроках реализуется механизмами врожденного иммунитета. При воспалении в тканях развиваются локальные воспалительные реакции, которые сопровождаются в той или иной мере выраженным системным воспалительным ответом или системными воспалительными реакциями (Мовет Г.З., 1975; Чернух А.М., 1979; Серов В.В., Пауков В.С., 1995). Системная воспалительная реакция наиболее ярко выражена при инфекционно-воспалительных заболеваниях, вызванных патогенной бактериальной микрофлорой и вирусами, а также при ожогах, обширных травматических повреждениях тканей и др. Литературные сведения о половых различиях тяжести воспалительных заболеваний с выраженными системными проявлениями, и в частности, сепсиса, противоречивы (George R.L. et al., 2003; Endo Y. et al., 2005; Davis D.P. et al., 2006; Coimbra R. et al., 2003; Frink M. et al., 2007). По данным клинических исследований M.K. Angele et al. (2006) и S.L. Klein и K.L. Flanagan (2016), женщины

по сравнению с мужчинами в меньшей мере предрасположены к развитию бактериальных инфекций. Так показатель выживаемости при сепсисе у женщин составляет 74%, а у мужчин – 31% (Schröder J. et al., 1998; Knöferl M.W. et al., 2002), а уровень заболеваемости сепсисом у женщин в постменопаузе повышается по сравнению с женщинами репродуктивного возраста (Beery T.A., 2003). Однако R. Coimbra et al. (2003) и M. Frink et al. (2007) не обнаружили половых различий частоты инфекционно-воспалительных заболеваний у людей репродуктивного возраста. Возможно, причинами этих противоречий являются различия, связанные с возрастом, неоднородностью групп исследования по содержанию половых стероидных гормонов, этнической принадлежности, терапии, сопутствующим заболеваниям (Klein S.L., Flanagan K.L., 2016; Matter M.L. et al., 2017).

Одной из экспериментальных моделей с максимально выраженными системными проявлениями воспаления является индуцированная липополисахаридом (ЛПС) эндотоксинемия. ЛПС используют для моделирования грамотрицательного сепсиса (Писарев В.Б. и соавт., 2008; Mayr F.B. et al., 2014). Поэтому эта модель является наиболее адекватной для изучения общих закономерностей половых и возрастных различий системных проявлений воспалительных реакций разной тяжести.

Степень разработанности темы исследования. Тяжесть течения системных воспалительных реакций определяется, главным образом, эффективностью иммунного ответа и функциональным состоянием органов иммунной системы, включая тимус. В экспериментальных исследованиях показано, что при воспалительных процессах разной тяжести в тимусе наблюдается акцидентальная инволюция, варьирующая от гиперплазии коркового вещества до его опустошения (Макарова О.В. и соавт., 2017; Billard M.J. et al., 2011; Solti I. et al., 2015; Zhou Y.J. et al., 2016). В эксперименте у крыс и при ультразвуковых исследованиях у человека выявлены половые различия морфофункционального состояния иммунной системы в норме (Симонова Е.Ю. и соавт., 2012; Симонова Е.Ю. и соавт., 2014; Araki T. et al., 2016). Показано, что возрастная инволюция тимуса более выражена у мужчин, а корковое вещество у новорожденных и препубертатных самок шире, чем у самцов (Симонова Е.Ю. и соавт., 2012; Симонова Е.Ю. и соавт., 2014; Araki T. et al., 2016). Однако работы, касающиеся половых различий морфофункциональных изменений тимуса и селезенки при системном воспалительном ответе, в литературе отсутствуют. Имеющиеся в литературе сведения о морфологических изменениях органов иммунной системы при системном воспалительном ответе не соотнесены с полом, возрастом и функциональными нарушениями иммунного ответа, в частности цитокиновым профилем, а также тяжестью течения воспаления и содержанием половых стероидов, оказывающих иммуномодулирующее действие.

Известно, что содержание половых гормонов в сыворотке крови у людей и животных в разных возрастных периодах варьирует. Также с возрастом изменяется функциональное состояние иммунной системы, связанное со становлением клеточного и гуморального звеньев иммунитета (Walker J.M., Slifka M.K., 2010). Однако большинство работ по изучению половых различий морфофункционального состояния иммунной системы у людей и животных в норме и при различных заболеваниях касаются, в основном, периода половой зрелости, тогда как подобные исследования, проведенные в другие возрастные периоды, в литературе немногочисленны (Симонова Е.Ю. и соавт., 2014; Kollmann T.R. et al., 2012; O'Connor T.J. et al., 2014;).

Таким образом, литературные сведения о половых различиях морфофункциональных изменений иммунной системы при развитии системных воспалительных реакций у лабораторных животных и человека разных возрастных периодов фрагментарны. В клинических работах, в основном, представлены данные, касающиеся половых различий показателей смертности и частоты воспалительных заболеваний. Поэтому необходимо проведение исследований половых и возрастных различий системных воспалительных реакций и морфофункционального состояния иммунной системы в эксперименте на репрезентативных группах животных, что позволит выявить общие фундаментальные закономерности их течения и особенности иммунного ответа в разные периоды постнатального онтогенеза, а также разработать новые подходы к эффективной профилактике и персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц разного возраста и пола.

Цель исследования – установить половые и возрастные различия морфофункциональных изменений иммунной системы и воспалительного ответа при экспериментальной эндотоксинемии.

Задачи исследования:

1. Исследовать морфологические изменения в легких, печени, тимусе и селезенке, и определить содержание стероидных половых гормонов, кортикостерона, уровень эндотоксина, цитокиновый профиль и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг.
2. Изучить морфологические изменения в легких, печени, тимусе и селезенке, и определить содержание стероидных половых гормонов, кортикостерона, уровень эндотоксина, цитокиновый профиль и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у препубертатных самок и самцов крыс Вистар после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг.
3. Провести сравнительную оценку морфологических изменений в легких, печени, тимусе и селезенке, содержание эстрадиола, прогестерона, кортикостерона и уровня эндотоксина в сыворотке крови, продукции цитокинов клетками селезенки и субпопуляционного состава

лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок крыс Вистар при введении ЛПС в дозе 1,5 мг/кг в фазу проэструса и диэструса.

4. Оценить морфологические изменения в легких, печени, тимусе и селезенке, и определить содержание стероидных половых гормонов, кортикостерона, уровень эндотоксина, цитокиновый профиль и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар после введения ЛПС в дозах 1,5 и 15 мг/кг.
5. Провести сравнительную оценку возрастных особенностей морфологических изменений в легких, печени, тимусе и селезенке, содержания стероидных половых гормонов, кортикостерона, уровня эндотоксина, цитокинового профиля, субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у самок и самцов после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг.
6. Оценить влияние низкого содержания стероидных половых гормонов на выраженность морфологических изменений в легких, печени, тимусе и селезенке, на содержание кортикостерона, уровень эндотоксина, цитокиновый профиль у самок и самцов крыс Вистар после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг в отдаленные сроки после хирургической кастрации.
7. Выявить возрастные и половые особенности механизмов развития системного воспалительного ответа с помощью оценки информативности показателей, характеризующих иммунный и воспалительный ответ.

Научная новизна

Впервые на модели системного воспалительного ответа, индуцированного введением липополисахарида, выявлены возрастные и половые морфофункциональные различия иммунной системы и особенности воспалительных реакций в органах-мишенях – легких и печени. Во всех возрастных группах - у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар по сравнению с самками воспалительные изменения в органах-мишенях более выражены.

Содержание половых стероидных гормонов как у самцов, так и у самок определяет тяжесть воспалительного процесса, индуцированного липополисахаридом. На фоне их низких концентраций у животных обоего пола в препубертатном периоде и в отдаленные сроки после хирургической кастрации развиваются более выраженные воспалительные экссудативно-альтеративные изменения в органах-мишенях, которые сочетаются с акцидентальной инволюцией тимуса и снижением *ex vivo* продукции цитокинов. Высокие физиологические концентрации половых гормонов в период половой зрелости оказывают протективное действие и определяют развитие менее выраженных морфологических проявлений воспалительного ответа как у самцов, так и у самок.

По сравнению с самками у половозрелых самцов низкая доза липополисахарида вызывает более выраженные воспалительные изменения в легких и альтеративные в печени, акцидентальную инволюцию тимуса, эндотоксинемию и повышение продукции ИЛ-2,

определяющего поляризацию иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу. Высокая доза липополисахарида нивелирует половые различия системных воспалительных реакций и иммунного ответа и вызывает многократное повышение уровня эндотоксина и снижение продукции цитокинов - ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ, ФНО-α клетками селезенки и содержания в периферической крови субпопуляций Т-лимфоцитов – хелперов, цитотоксических и регуляторных.

Половые различия морфологических изменений тимуса в ответ на введение высокой дозы липополисахарида у животных разных возрастных периодов характеризуются акцидентальной инволюцией: в препубертатном и половозрелом периодах по сравнению с самками у самцов в тимусе выявлена выраженная акцидентальная инволюция с инверсией коркового и мозгового вещества и увеличением содержания аннексин-положительных апоптотически гибнущих клеток; у новорожденных самок и самцов выраженность акцидентальной инволюции не различается.

По сравнению с другими возрастными периодами у новорожденных крыс обоего пола высокая доза липополисахарида вызывает гиперплазию белой пульпы селезенки со снижением продукции *ex vivo* ФНО-α, ИФН-γ и ИЛ-2 у самок, а у самцов – с повышением ФНО-α и ИЛ-2. Низкая доза липополисахарида у половозрелых крыс приводит к «опустошению» Т-зависимой ПАЛМ-зоны и гиперплазии В-зоны, более выраженной у самок, что сочетается со снижением продукции *ex vivo* провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИФН-γ, ФНО-α, а также ИЛ-12 и ИЛ-2, поляризующих иммунный ответ преимущественно по Тх1-типу.

Научно-практическая значимость

На модели эндототоксинемии, индуцированной липополисахаридом, установлены закономерности половых и возрастных различий воспалительных реакций и морфофункциональных изменений органов иммунной системы, что послужит основой для разработки новых подходов к эффективной профилактике и персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний с учетом возраста и пола. На основании полученных данных установлено, что группой риска тяжелого течения и неблагоприятного прогноза инфекционно-воспалительных заболеваний является препубертатный период, в котором выявлены максимально выраженные воспалительные изменения в органах-мишенях – печени и легких, что сочетается со снижением уровня продукции клетками селезенки ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α и ИФН-γ и числа Т-лимфоцитов в периферической крови как у самок, так и у самцов. Показано, что физиологические концентрации стероидных половых гормонов оказывают иммунопротекторное действие, а низкие, при хирургической кастрации самцов и самок крыс Вистар, усугубляют течение системного воспалительного ответа. Это необходимо учитывать при разработке профилактических мероприятий и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц с низким содержанием половых гормонов, в частности пожилых людей.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 5, 6.

Методология и методы исследования

Методология заключалась в системном подходе и комплексном анализе результатов морфологического исследования и их сопоставления с данными иммуноферментного, биохимического и цитофлуориметрического исследований. Проведен критический анализ научных трудов отечественных и зарубежных работ в области половых различий воспалительного и иммунного ответа на антигенные воздействия. На основании анализа были сформулированы задачи работы – изучение половых различий воспалительного ответа и морфофункциональных изменений иммунной системы в разные возрастные периоды. В работе были использованы *in vivo* модели системного воспалительного ответа и посткастрационного синдрома у крыс, а также комплекс методов: гистологическое исследование, морфометрические и культуральные методы, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, биохимическое исследование, статистический анализ.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием комплекса современных методов, достаточным объемом данных для каждой экспериментальной группы и количеством групп сравнения, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной литературы.

Материалы диссертации доложены на 1 Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», (Египет, г.Сафага, 2010 г.), X Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Ярославль, 2010 г.), IV Всероссийской научно-практической конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2011 г.), XIV Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2011 г.), Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2012 г.), Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014 г.), XV Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015 г.), Всероссийской научной конференции «Экологические аспекты морфогенеза», (Воронеж, 12-13 ноября 2015 г.), 27th European Congress of Pathology (Belgrad, Serbia, 2015 г.), Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016 г.), Научно-практической конференции с международным участием «Достижения

и инновации в современной морфологии» (Минск, Беларусь, 2016 г.), V Съезде Российского общества патологоанатомов с международным участием (Челябинск, 2017 г.).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении исследования, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Положения, выносимые на защиту

1. На модели системного воспалительного ответа, индуцированного высокой дозой ЛПС, установлено, что по сравнению с самками у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс воспалительные изменения в органах-мишенях – печени и легких более выражены. Низкое содержание эстрадиола у препубертатных и половозрелых самцов определяет тяжелое течение системных воспалительных реакций, сопровождающихся выраженной иммуносупрессией. Более высокая концентрация эстрадиола у новорожденных самцов опосредует поляризацию иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу.
2. В препубертатном периоде у животных обоего пола на фоне низкого содержания половых стероидных гормонов системные воспалительные реакции максимально выражены, и они сочетаются с иммуносупрессией, характеризующейся выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, высоким содержанием апоптотически гибнущих тимоцитов, снижением числа Т-лимфоцитов в периферической крови и подавлением продукции клетками селезенки Тх1-, Тх2-цитокинов.
3. При эндотоксинемии, индуцированной низкой дозой ЛПС, физиологические концентрации половых стероидов оказывают протективное действие, а низкое содержание стероидных половых гормонов у овари- и орхиэктомированных крыс усугубляют проявления системных воспалительных реакций.
4. По сравнению с низкой высокая доза ЛПС у половозрелых животных нивелирует половые различия как воспалительного, так и иммунного ответа.

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 26 работ, из них 13 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ для публикации результатов докторских и кандидатских диссертаций, 1 статья в рецензируемом журнале и 12 публикаций в материалах конференций и съездов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 508 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы.

Работа иллюстрирована 122 рисунками и 185 таблицами. Список литературы включает 650 источников, из них 33 отечественных и 617 зарубежных.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ПОЛОВЫЕ И ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СИСТЕМНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ И ИММУННОГО ОТВЕТА

1.1 Половые различия регуляторных механизмов иммунного ответа

Половые различия иммунного ответа определяются кариотипом, а именно уровнем экспрессии генов иммунного ответа, расположенных на половых хромосомах, а также содержанием и соотношением половых стероидных гормонов в сыворотке крови, концентрация которых изменяется в зависимости от возраста и репродуктивного статуса.

Роль кариотипа в регуляции иммунного ответа

Половые различия иммунного ответа, функциональной активности иммунокомпетентных клеток, а также различных тканей и организма в целом определяются генами, расположенными на половых хромосомах. Гены, сцепленные с X и Y-половыми хромосомами, делятся на 4 класса (De Vries G.J. et al., 2002; Arnold A.P., 2011). Первый класс представлен генами Y-хромосомы, в том числе *Sry* комплекс и гены, ответственные за сперматогенез и оказывающие своё действие только у самцов, (Goodfellow P.N., Lovell-Badge R., 1993; Burgoyne P.S., Mitchell M.J, 2007). Ко второму классу относятся гены, расположенные на X-хромосоме, которые не инактивируются, в результате чего отмечается их более высокая экспрессия в клетках, содержащих XX хромосомы, по сравнению с XY клетками (Berletch J.B. et al., 2010; Carrel L., Willard H.F., 2005). Третий класс составляют гены, расположенные на X-хромосоме, которые в большей или меньшей степени экспрессируются в XX клетках, по сравнению с XY из-за «родительского импринтинга» или мозаичности X-хромосомы. Четвертый класс генов включает некодируемые регионы на половых хромосомах, отдельные участки которых могут быть инактивированы в результате гетерохроматизации, что приводит к изменению регуляции генов на других хромосомах (Jiang P.P. et al., 2010; Lemos B. et al., 2010).

Среди всех перечисленных классов первичных полоопределяющих факторов основную роль играет группа генов *Sry*, расположенная на Y-хромосоме, которая регулирует развитие семенников (Koopman P., 2010). При отсутствии *Sry* комплекса, гены аутосом и X-хромосомы инициируют дифференцировку гонад по женскому типу, определяя различия в уровне половых стероидов у самцов и самок (Chassot A.A. et al., 2008; Dinapoli L., Capel B., 2008). Гены, расположенные на Y-хромосоме, уникальны для самцов и могут определять чувствительность к развитию заболеваний. Помимо этого, самцы несут всего одну X-хромосому, т.е. одну из пары аллелей, и поэтому самцы склонны к заболеваниям, сцепленным с этой хромосомой, включая первичные иммунодефицитные состояния. Одно из таких заболеваний – это X-SCID (тяжелое комбинированное иммунодефицитное состояние, сцепленное с X-хромосомой), которое

возникает в результате мутации γ-цепей гетеродимеров рецепторов к ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15 и ИЛ-21 (Fish E.N., 2008).

Х-хромосома кодирует более чем 1100 идентифицированных генов, часть из которых определяет функционирование иммунной системы (Fish E.N., 2008). Это рецепторы и ассоциированные с ними белки – рецепторы к андрогенам (androgen receptors – AR), рецепторы к интерлейкинам (ИЛ)-1, -2,-3, толл-подобные рецепторы (toll-like receptors – (TLR) -7, -8; белки, связанные с иммунным ответом – белок 1 суперсемейства иммуноглобулинов (immunoglobulin superfamily member 1 - IGSF1), лиганд рецептора CD40 (CD40L), транскрипционные и трансляционные эффекторы – киназа γ ингибитора ядерного фактора kB (kinase γ of inhibitor NF-kB – IKKγ), регуляторный фактор ядерного фактора kB (regulatory factor of NF-kB – NFkBRF), протеин киназа С, тип йота (protein kinase C iota type - PRKCi). Гены *Tlr7* и *Foxp3 (*транскрипционный фактор Т-регуляторных клеток - forkhead box P3*)* располагаются на Х-хромосоме, что увеличивает вероятность экспрессии мутантных рецессивных аллелей этих генов у самцов (Plitas G., Rudensky A.Y., 2016). Самки несут по 2 аллели каждого гена на обеих Х-хромосомах, хотя только одна из них функционально активна, а другая инактивируется на стадии ранней бластулы (Burgoyne P.S. et al., 2001). Это снижает риск проявления Х-сцепленных иммунодефицитов, но повышает разнообразие (мозаичность) реакции иммунной системы на различные воздействия у гетерозиготных самок. Преимущества Х-половой мозаичности хорошо проиллюстрированы на примере мутации гена *Foxp3*, локализованного на Х-хромосоме (Wildin R.S., Freitas A., 2005). Этот ген кодирует транскрипционный фактор, необходимый для дифференцировки регуляторных Т-клеток. Мутация гена *Foxp3* приводит к иммунорегуляторным нарушениям, полиэндокринопатии и энтеропатии у самцов, тогда как у самок половая мозаичность предотвращает их развитие (Wildin R.S., Freitas A., 2005).

Генотип (XX или XY) играет важную роль в развитии индуцируемого у мышей аутоиммунного энцефалита. Самки, у которых ген *Sry* транслоцирован в аутосому, в результате чего содержание половых гормонов в сыворотке крови у них не отличается от самцов, характеризуются повышенной чувствительностью к развитию экспериментального аутоиммунного энцефалита по сравнению с самцами (Palaszynski K.M. et al., 2005; Smith-Bouvier D.L. et al., 2008). При этом у мышей с генотипом XX*Sry* наблюдается снижение продукции Tx2-цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13) и усиление экспрессии IL-13Rα2 макрофагами и дендритными клетками, что коррелирует с тяжестью течения аутоиммунного заболевания (Smith-Bouvier D.L. et al., 2008).

Помимо половых хромосом, различия в функционировании женского и мужского организма в норме и при антигенной стимуляции могут определяться генами, расположенными на аутосомах. В лаборатории Wang Y. (2003) у позвоночных животных была обнаружена группа

аутосомных генов, определяющих устойчивость к различным заболеваниям. Экспрессия этих генов способствует развитию иммунного ответа и уменьшению скорости репликации вирусных патогенов, что приводит к снижению тяжести течения инфекционных заболеваний. Большинство генов, ответственных за устойчивость к заболеваниям, кодируют белки суперсемейства иммуноглобулинов, такие как гликопротеины MHC I и II классов, компоненты Т-клеточного рецептора и иммуноглобулины. Уровень экспрессии генов, расположенных на аутосомах и определяющих устойчивость к заболеваниям, модулируется половыми гормонами: эстрогены усиливают, а андрогены подавляют их экспрессию. Полиморфизм этих генов также может определять степень восприимчивости к инфекционно-воспалительным заболеваниям. Например, полиморфизм гена, кодирующего IL-1β, обусловливает половые различия тяжести течения гепатита С и длительности персистирования этого вируса у человека (Omran M.H. et al., 2013).

Роль половых гормонов в регуляции иммунного ответа

Синтез и метаболизм половых гормонов в пренатальном и постнатальном онтогенезе

Половые различия развития иммунного ответа определяются иммуномодулирующим действием половых стероидных гормонов. Половые гормоны синтезируются у самцов преимущественно в семенниках, а у самок – в яичниках. Половые железы у млекопитающих образуются из примордиальных герминативных клеток желточного мешка и стромальных клеток первичной туловищной почки (Erickson R.P., Blecher S.R., 2004; Lee M.M., 2004). К 4-5 неделе внутриутробного развития герминативные клетки мигрируют из стенки желточного мешка и туловищной почки, а на 6-ой неделе образуют гонадный валик (индифферентную половую железу) (Erickson R.P., Blecher S.R., 2004). Эмбриогенез половых желез инициируется генами комплекса *Sry,* стероидогенного фактора 1 *(steroidogenic factor 1 – SF-1),* геном, кодирующим транскрипционный фактор high mobility group HMG *(SOX-1), и* геном дозозависимой инверсии пола 1 (*dosage-sensitive sex reversal gene 1 - DAX-1)* (Harley V.R. et al., 2003; Park S.Y., Jameson J.L., 2005).

Дифференцировка мужских половых желез начинается на 7-ой неделе внутриутробного развития. В этот период выявляются примитивные сустентоциты (клетки Сертоли) и сперматогонии. С 8-ой недели развития интерстициальные клетки Лейдига синтезируют андрогены (Aslan A.R. et al., 2004). На 14-ой неделе гестации масса семенников эмбриона составляет 20 мг, а к рождению увеличивается до 800 мг.

Также как и семенники, яичники дифференцируются с 7-ой недели внутриутробного развития (Byskov A.G., Westergaard L.G., 2004). Примордиальные фолликулы образуются на 18-ой неделе эмбриогенеза (Fulton N. et al., 2005). Интерстициальные гормон-продуцирующие клетки появляются на 12-ой неделе гестации, и во время третьего триместра беременности клетки теки, окружающие фолликулы, уже способны синтезировать половые гормоны (Mesiano S., Jaffe

R.B., 2004). Однако, несмотря на высокую активность ароматазы в клетках яичника плода, половые гормоны ими синтезируются в минимальных количествах (Byskov A.G., Westergaard L.G., 2004; Mesiano S., Jaffe R.B., 2004).

Фетальные андрогены и эстрогены на поздних сроках гестации имеют, в основном, плацентарное происхождение (Diczfalusy E., 2005). Активность цитохрома P450 (CYP17) с 17α-гидроксилазной и 17,20-лиазной активностью, осуществляющего превращение холестерола в 17α-OH-прегненолон, в плаценте невелика, поэтому эстрогены в плаценте синтезируется из предшественников, которые поступают в нее из коры надпочечников эмбриона (Рис. 1.1).

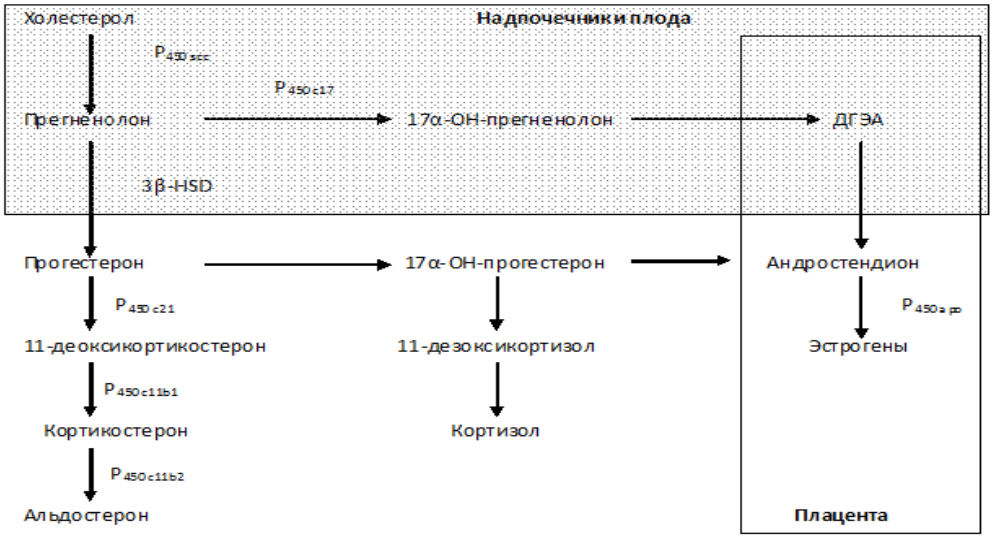


Рис. 1.1. Синтез стероидных гормонов надпочечниками и плацентой плода (модификация Guibourdenche J. et al., 2009)

В коре надпочечника плода низкая активность 3β-гидроксистероидной дегидрогеназы (3β-HSD), поэтому здесь не происходит синтез прогестерона и 17α-гидроксипрогестерона. Однако в надпочечниках плода секретируется ДГЭА и ДГЭА-сульфат в ответ на действие АКТГ. Под действием цитохрома P450 с ароматазной активностью ДГЭА и ДГЭА-сульфат превращаются в эстрогены в плаценте. У самцов, интерстициальные клетки Лейдига продуцируют тестостерон в ответ на хорионический гонадотропин и ЛГ на 10-20 неделе антенатального развития (Aslan A.R. et al., 2004).

Рецепторы половых стероидов на иммунокомпетентных клетках

Половые гормоны модулируют функционирование систем и органов за счет связывания со специфическими рецепторами, экспрессирующимися всеми типами клеток, в том числе иммунокомпетентными (Jaillon S. et al., 2017). Рецепторы к андрогенам определяются на клетках урогенитальной мезенхимы на 8-ой, а на эпителии – на 12-ой неделе развития (Sajjad Y. et al., 2004). Между 8 и 14 неделями развития активируется дифференцировка организма по мужскому

полу в результате экспрессии *Sry* генов на Y-хромосоме и последующего синтеза тестостерона и антимюллерового гормона (Josso N. et al., 2003).

Иммунокомпетентные клетки экспрессируют рецепторы к андрогенам (Angele M.K. et al., 2000; Nalbandian G., Kovats S., 2005), что предполагает непосредственное воздействие этих половых гормонов на развитие и функционирование клеток иммунной системы. Однако механизмы, посредством которых андрогены модулируют морфофункциональное состояние иммунной системы, недостаточно изучены. Различают два типа рецепторов к андрогенам – поверхностные и внутриклеточные. $CD45^+$ лейкоциты селезенки, печени и тимуса крыс экспрессируют внутриклеточные рецепторы к андрогенам (Butts C.L. et al., 2007). Также внутриклеточные рецепторы к андрогенам обнаружены и в тимоцитах, причем число этих рецепторов снижается по мере дифференцировки и созревания Т-клеток (Viselli S.M. et al., 1995). Макрофаги, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки и В-клетки в периферических (вторичных) органах иммунной системы так же экспрессируют внутриклеточные рецепторы к андрогенам (Benten W.P. et al., 2004). Поверхностные рецепторы на иммунокомпетентных клетках представлены в меньшей степени и обнаружены только на макрофагах и Т-клетках селезенки (Benten W.P. et al., 2004). Помимо клеток иммунной системы, рецепторы к андрогенам экспрессируются клетками-предшественниками красного костного мозга у мышей и человека (Igarashi H. et al., 2001), причем на более ранних этапах дифференцировки, чем рецепторы к эстрогенам. Это предполагает отсроченное во времени влияние половых гормонов на созревание и развитие клеток красного костного мозга (Igarashi H. et al., 2001).

Эстрогены оказывают действие на клетки через два типа ядерных рецепторов – ERα и ERβ, которые экспрессируются в период 16-23 недели гестации (Brandenberger A.W. et al., 1997; Couse J.F., Korach K.S., 1999). ERβ экспрессируются преимущественно в клетках семенников, яичников, селезенки, тимуса, надпочечников, головного мозга, почек и кожи, тогда как ERα – в основном в матке (Brandenberger A.W. et al., 1997; Couse J.F., Korach K.S., 1999). Нокаутирование по двум типам рецепторов к эстрогенам у мышей не оказывает выраженного влияния на развитие плода, однако в постнатальном онтогенезе приводит к гипоплазии матки, фаллопиевых труб, влагалища и шейки матки (Couse J.F., Korach K.S., 1999).

Показано, что рецепторы к эстрогенам экспрессируются различными типами иммунокомпетентных клеток, включая тимоциты, макрофаги и лимфоциты (Cutolo M. et al., 2004; Chang C. et al., 2013; Bernardi A.I. et al., 2015; Margaryan S et al., 2017). Все иммунокомпетентные клетки крови, лимфоидных органов и красного костного мозга человека и грызунов экспрессируют преимущественно ERα, и, в меньшей степени, ERβ рецепторы (Dulos J. et al., 2010). ERα экспрессируются Т- и В-лимфоцитами, дендритными клетками, макрофагами, моноцитами, НК-клетками и тучными клетками (Harkonen P.L., Vaananen H.K., 2006; Barakat R.

et al., 2016). Показано, что мононуклеарные клетки крови и $CD4^+$ Т-клетки экспрессируют большее число ERα, чем ERβ. $CD8^+$ Т-клетки и моноциты практически не содержат рецепторов к эстрогенам, а В-клетки экспрессируют больше ERβ, чем ERα (Phiel K.L. et al., 2005). Помимо этого, рецепторы к эстрогенам экспрессируются клетками-предшественниками гемопоэтического ряда (Carreras E. et al., 2008). Таким образом, иммуномодулирующее действие эстрогенов тканеспецифично, и зависит от типа и уровня экспрессии рецепторов ERα и ERβ (Hildebrand F. et al., 2006; Yu H.P. et al., 2006).

Одним из стероидных гормонов, обладающих выраженным иммунорегуляторным действием, является прогестерон (Klein S.L., Roberts C.W., 2010; Davis S.M. et al., 2017), однако типы иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих рецепторы к прогестерону, и условия, при которых они экспрессируются, остаются до конца не изученными. Обнаружено, что число рецепторов к прогестерону на лимфоцитах увеличивается у беременных женщин (Szekeres-Bartho J. et al., 1990; Aisemberg J. et al., 2013). Недавними исследованиями показано, что рецепторы к прогестерону экспрессируются как у самцов, так и у самок на НК-клетках и макрофагах периферической крови (Khan K.N. et al., 2005; Jones L.A. et al., 2008), в то время как на Т- и В- клетках они обнаружены не были (Arruvito L. et al., 2008). В физиологических концентрациях прогестерон и его синтетические аналоги, использующиеся в качестве контрацептивных препаратов, могут связываться с рецепторами к глюкокортикоидам (Louw-du Toit R. et al., 2014).

Иммуномодулирующее действие половых стероидных гормонов

Половые стероиды могут регулировать экспрессию генов, пролиферативную активность и выживаемость клеток, тем самым играя важную роль в развитии эффективного иммунного ответа при антигенной стимуляции (Heldring N.P.A. et al., 2007; Laffont S. et al., 2017). Во многих работах, посвященных функциональным изменениям иммунной системы у млекопитающих при аутоиммунных, инфекционно-воспалительных заболеваниях, а также в норме, показано, что эстрогены, андрогены и прогестины модулируют развитие реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа, а также гемопоэз (Rettew J.A. et al., 2008; Giefing-Kröll C. et al., 2015; Klein S.L., Flanagan K.L., 2016).

Иммунная система подвергается воздействию как эндогенных, так и экзогенных стероидных гормонов, которые связываются с собственными рецепторами и модулируют развитие и функционирование иммунокомпетентных клеток. К эндогенным стероидным андрогенам относят тестостерон, его активный метаболит дигидротестостерон и дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С). Колебания содержания тестостерона, в отличие от эстрадиола, незначительны и составляют 5–15 нг/мл у мужчин и 0,1–0,8 нг/мл у женщин (Davison S.L., Bell R., 2006).

К эндогенным эстрогенам относятся эстрон, 17β-эстрадиол и эстриол. Наибольшей активностью обладает 17β-эстрадиол, содержание которого в сыворотке крови у женщин колеблется от 200 до 500 пг/мл (Askanase A.D., Buyon J.P., 2002), у самок грызунов – от 25–35 пг/мл в фазе диэструса до 70–200 пг/мл в фазе эструса; у самцов грызунов содержание эстрадиола в сыворотке крови составляет 8–15 пг/мл (Walmer D.K. et al., 1992; Couse J.F., Korach K.S., 1999).

Концентрация прогестерона, также как и эстрогенов, в сыворотке крови женщин варьирует в зависимости от фазы менструального цикла: от 1–2 нМ в фолликулярной до 20–40 нМ в секреторной фазе. При беременности содержание прогестерона в сыворотке крови достигает 100–500 нМ (Stites D.P., Siiteri P.K., 1983). Хотя прогестерон относят к женским половым гормонам, у мужчин этот прогестин играет немаловажную роль в регуляции репродуктивной функции, и его уровень в сыворотке крови достигает 1–2 нМ (Oettel M., Mukhopadhyay A.K., 2004). Несмотря на то, что большинство исследований посвящено влиянию прогестерона на развитие иммунного ответа у беременных женщин, показано влияние его низких доз (у мужчин и небеременных женщин) на дифференцировку иммунокомпетентных клеток и их функциональную активность (De Man Y.A. et al., 2008). Низкие концентрации прогестерона (1–10 нМ) подавляют секрецию провоспалительных цитокинов дендритными клетками красного костного мозга в ответ на стимуляцию ЛПС (Butts C.L. et al., 2007) и вызывают апоптоз НК-клеток (Arruvito L. et al., 2008). В ответ на вирусные инфекции прогестерон, а также гормональный контрацептив DMPA (depot medroxyprogesterone acetate, депонированный медроксипрогестерон ацетат), ингибирует продукцию ИФН-γ плазмацитоидными дендритными клетками, что может объяснить высокий риск заражения вирусными инфекциями женщин, принимающих DMPA (Hughes G.C. et al., 2008).

Для исследования роли половых гормонов в реализации иммунного ответа Y.Z. Foo и соавторами (2016) был проведен мета-анализ литературных данных за период январь-июнь 2013 года, который показал, что тестостерон оказывает иммуносупрессорное действие, тогда как влияние эстрогенов на развитие иммунного ответа неоднозначно и зависит от многих факторов, включая заболевание и его форму. Многочисленными экспериментальными исследованиями показано, что тестостерон оказывает супрессорное действие на развитие преимущественно Tx2- и Tx17-типов иммунного ответа за счет подавления дифференцировки лимфоцитов, определяющих развитие адаптивного иммунитета (Yao G.H. et al., 2003; Hepworth M.R. et al., 2010; Kissick H.T. et al., 2014). Последними исследованиями показано, что тестостерон, несмотря на свои супрессорные эффекты, оказывает активирующее действие на развитие клеточного иммунного ответа, что подтверждается более высоким отношением продукции Tx1/Tx2 цитокинов у самцов по сравнению с самками (Girón-González J.A. et al., 2000; Foo Y.Z. et al., 2016). Однако мета-анализ, проведенный Y.Z. Foo и соавторами (2016), выявил, что добавление

тестостерона в культуру клеток оказывает супрессорное действие на развитие клеточного иммунного ответа, а J. Roved и соавторами (2017) не выявили влияния тестостерона на поляризацию Тх1-типа иммунного ответа. Тогда как H.T. Kissick и соавторы (2014) обнаружили снижение продукции ИФН-γ под влиянием тестостерона, другими исследователями эти результаты не были подтверждены (Girón-González J.A. et al., 2000; Posma E. et al., 2004; Kissick H.T. et al., 2014). Таким образом, влияние тестостерона на развитие Тх1-типа иммунного ответа остается до конца неясным.

Согласно данным литературы тестостерон оказывает супрессорное действие на функциональную активность клеток врожденного иммунитета (Roved J. et al., 2017). Этот гормон повышает продукцию моноцитами ИЛ-12, который стимулирует развитие Тх1-типа иммунного ответа (Posma E. et al., 2004), увеличивает продукцию ИЛ-1, но снижает – ИЛ-6 (Kanda N. et al., 1996; O'Connor M.-F. et al., 2007). Действие тестостерона на антигенпрезентирующие дендритные клетки заключается в снижении продукции ими Тх2-цитокинов, в частности ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-13 и Тх17-цитокинов - ИЛ-1 и ИЛ-6, подавлении экспрессии рецепторов MHC II и ко-стимуляторных молекул (Corrales J.J. et al., 2009; Koh Y.T. et al., 2009; Hepworth M.R. et al., 2010). Влияние тестостерона на гранулоциты разнонаправленное: одними авторами показано активирующее действие тестостерона на нейтрофилы (Mayo J.C. et al., 1997; Molloy E.J. et al., 2003; Chuang K.-H. et al., 2009), а другими – напротив, ингибирующее (Bekesi G. et al., 2000).

Показано, что тестостерон активирует агрегацию тромбоцитов, что способствует заживлению ран (Haque S.F. et al., 2001; Li S. et al., 2007). Данные о влиянии тестостерона на эндотелиальные клетки противоречивые: показано активирующее, подавляющее и нейтральное действие тестостерона на адгезию и миграцию лейкоцитов (Death A.K. et al., 2004; Norata G.D. et al., 2006; Cai J.J. et al., 2016). G.D. Norata и соавторами (2006) было выявлено тестостерон-зависимое снижение экспрессии ИЛ-6 и TLR4 эндотелиальными клетками, что отражает противовоспалительное действие тестостерона.

Foo Y.Z. и соавт. (2016) провели мета-анализа литературных данных и показали, что эстрогены активируют развитие гуморального иммунного ответа, но при этом значительно супрессируют клеточный иммунитет. Эстрадиол активирует продукцию Тх2-цитокина ИЛ-4, тем самым усиливая дифференцировку Тх2-лимфоцитов (Faas M. et al., 2000; Hepworth M.R. et al., 2010). Однако в ряде экспериментальных исследованиях выявлено, что эстрогены стимулируют дифференцировку Тх1-лимфоцитов (Karpuzoglu E. et al., 2007; Karpuzoglu E. et al., 2009), что не согласуется с данными, полученными Foo Y.Z. и соавторами (2016), которые, проанализировав 38 работ, посвященных влиянию инъекций супрафизиологических доз эстрадиола на иммунный ответ, установили его супрессорное действие на развитие клеточного иммунитета. Показано, что эстрогены подавляют развитие иммунного ответа по Тх-17 типу, снижая продукцию ИЛ-17

(Wang C. et al., 2009; Tyagi A.M. et al., 2012; Chen L.-C. et al., 2015; Chen R.-Y. et al., 2015). Более выраженная активация Тх-2 типа иммунного ответа у женщин подтверждается данными об эстрадиол-зависимой стимуляции дифференцировки В-клеток и продукции антител (Kanda N., Tamaki K., 1999; Faas M. et al., 2000; Pauklin S. et al., 2009). У макак-резусов эстрогены повышают число антител-продуцирующих В-клеток в фолликулярную фазу менструального цикла, в которую определяется высокое содержание эстрадиола (Lu F.X.et al., 2002). Таким образом, эстрогены поляризуют иммунный ответ преимущественно по Тх2-типу, тогда как на развитие Тх1- и Тх17-иммуного ответа они оказывают супрессорное действие (Roved J. et al., 2017).

Влияние прогестерона на реакции врожденного иммунитета до конца не ясно, однако в целом, оно совпадает с действием эстрадиола за исключением активации продукции ИЛ-8, синтез которого эстрадиолом подавляется (Pioli P.A. et al., 2007; Peltier M.R. et al., 2008). Бактерицидная способность макрофагов ослабляется при действии прогестерона, тогда как эстрадиол, напротив, активирует провоспалительные реакции (Chao T.C. et al., 2000; Jones L.A. et al., 2008; Pisetsky D.S., Spencer D.M., 2011). При взаимодействии с макрофагами как прогестерон, так и эстрадиол активирует развитие Тх2- и Тх17-реакций, тогда как при действии прогестерона на дендритные клетки экспрессия Тх17-цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-23, подавляется, однако продукция Тх2-цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-13 активируется (Butts C.I. et al., 2007; Hughes G.C., Clark E.A., 2007; Kyurkchiev D. et al., 2007; Munoz-Cruz S. et al., 2011; Giefing-Kröll C. et al., 2015). Прогестерон стимулирует миграцию нейтрофилов, а функциональная активность тучных клеток, напротив, снижается (Bekesi G. et al., 2000; Cassidy R.A., 2003; Molloy E.J. et al., 2003; Vasiadi M. et al., 2006; Belot M.P. et al., 2007a; Belot M.P. et al., 2007b). Действие прогестерона на эндотелиальные клетки, НК клетки, тромбоциты сопоставимо с влиянием эстрадиола. Эффекты прогестерона на функциональная активность эозинофилов и базофилов не установлены (Roved J. et al., 2017).

Эстрадиол и прогестерон активируют преимущественно Тх2-тип иммунного ответа, стимулируя дифференцировку В-лимфоцитов, активируя макрофаги и дендритные клетки, при этом подавляя поляризацию иммунного ответа по Тх1-типу, что проявляется в снижении числа НК клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Исследования, в которых показано, что продукция антител и дифференцировка Тх2-лимфоцитов у женщин выше, чем у мужчин, согласуются с данными о преимущественной поляризации Тх1-типа иммунного ответа у мужчин по сравнению с женщинами (Giltay E.J. et al., 2000; Girón-González J.A. et al., 2000; Beagley K.W., Gockel C.M., 2003; Hepworth M.R. et al., 2010).

Таким образом, половые различия морфофункционального состояния иммунной системы в норме и при антигенной стимуляции опосредуются как за счет различий половых хромосом в кариотипе у самцов и самок, так и за счет непосредственного влияния половых стероидов на

рецепторы, экспрессирующиеся иммунокомпетентными клетками (рис. 1.2). На протяжении эстрального цикла у самок (у женщин – менструального) концентрация эстрогенов и прогестинов варьирует, а у самцов содержание женских половых гормонов ниже, чем у самок, что, по-видимому, определяет различия чувствительности и резистентности к патогенам, тяжести течения острых и хронических вирусных и бактериальных заболеваний. Половые гормоны оказывают разнонаправленное действие разной силы на иммунный ответ, тем самым определяя половые различия его проявлений, выраженность которых по данным литературы выше у самок. Однако механизмы взаимодействия половых стероидов с иммунокомпетентными клетками определяются многими факторами, в частности зависят от возраста, фазы эстрального цикла, возбудителя, формы заболевания, терапевтических мероприятий, что затрудняет интерпретацию разнообразных литературных данных.

1.2 Возрастные морфофункциональные изменения иммунной системы

Развитие иммунной системы в пренатальном и в раннем постнатальном периодах

Иммунная система обеспечивает формирование двух типов иммунного ответа – врожденного и адаптивного. Реализация врожденного иммунитета обусловлена функцией многих типов клеток – нейтрофилов, НК клеток, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток, а также гуморальными факторами – системой комплемента, белками острой фазы воспаления (С-реактивный белок, сывороточный амилоид, факторы свертывания крови, ЛПС-связывающий белок, фактор активации тромбоцитов PAF и др.), эйкозаноидами (простагландины, лейкотриены и тромбоксаны), цитокинами. Реакции адаптивного иммунитета осуществляются субпопуляциями Т-лимфоцитов, В-лимфоцитами и плазматическими клетками, а также иммуноглобулинами разных классов.

Иммунная система животных и человека подвергается сложным морфофункциональным изменениям в течение жизни. Развитие иммунной системы начинается с 3-4 недели эмбриогенеза: в этот период появляются гемопоэтические клетки, а к 12-ой неделе они мигрируют из желточного мешка в печень, селезенку и костный мозг плода (Хлыстова З.С. и др., 2002; Титова Н.Д., 2007; Chirico G., 2005).

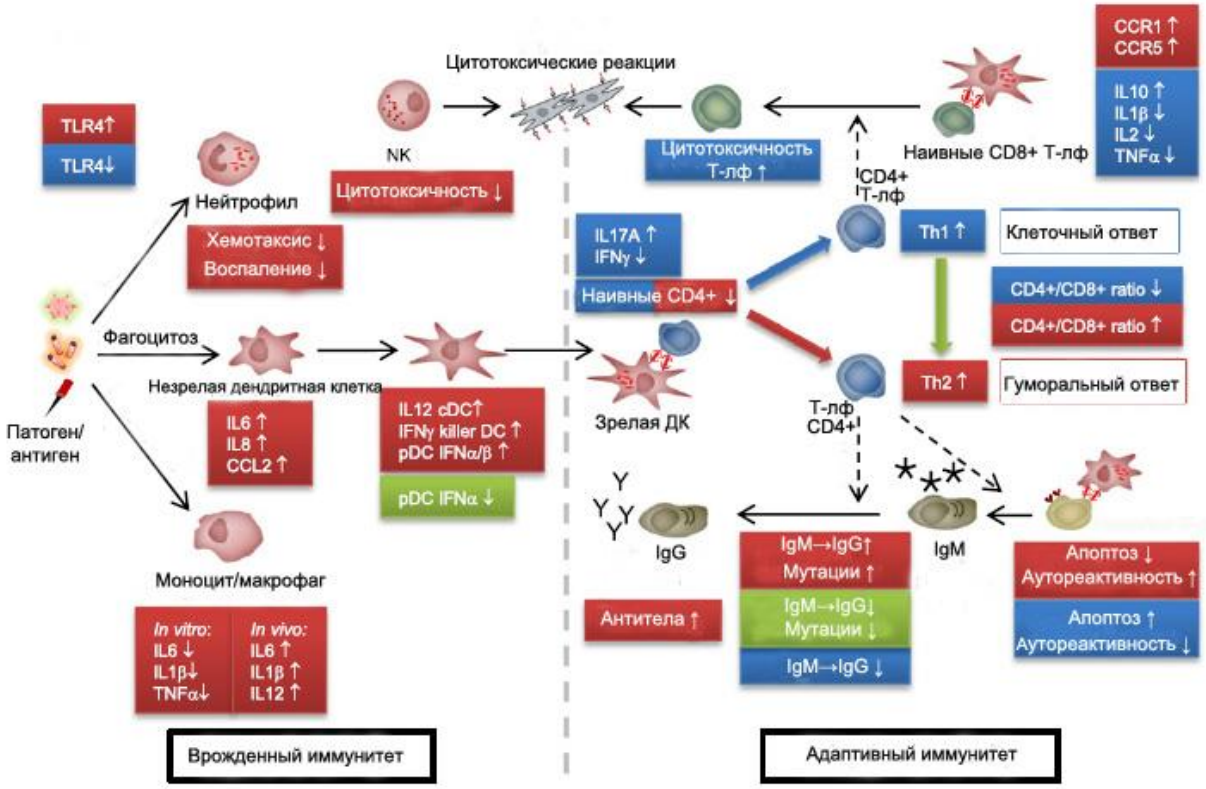


Рис. 1.2. Иммуномодулирующее действие половых гормонов. Действие физиологических и супрафизиологических доз эстрадиола на функциональную активность клеток иммунной системы женщин в овуляторную фазу менструального цикла и у беременных показано красным; действие тестостерона у мужчин – голубым, прогестерона – зеленым. Стрелки указывают активацию/повышение (↑) или супрессию/снижение (↓) числа клеток, уровень экспрессии или функциональной активности в результате действия половых гормонов. ДК (DC) – дендритная клетка; cDC – миелоидные дендритные клетки; pDC – плазмоцитоидные дендритные клетки; CCL – CC-хемокин; CCR – рецепторы хемокинов; IFN – интерферон; Ig – иммуноглобулины; IL – интерлейкин; NK – естественный киллер; Th – Т-хелпер (Тх); TLR-4 – толл-подобные рецепторы- 4, TNF-α – фактор некроза опухоли-α; (Giefing-Kröll C. et al., 2015)

Закладка тимуса – центрального (первичного) органа системы иммунитета, происходит на 7-ой неделе внутриутробного развития. На 7-8 неделе тимус заполняется стволовыми клетками из печени и становится лимфоэпителиальным образованием. В 8,5 недель в нем появляются предшественники Т-клеток, имеющие CD2 и CD7 антигены. Т-клетки, имеющие γδ Т-клеточный рецептор (γδTCR), участвующие в реакциях врожденного иммунитета, появляются раньше, чем реализующие реакции адаптивного иммунитета Т-клетки с αβTCR (Gordon J., Manley N.R., 2011). Большинство Т-клеток плода экспрессируют CD45RA – маркер наивных Т-клеток (Clement L.T. et al., 1990). В тимусе у 14-недельного плода различают 2 зоны: корковое вещество с большим содержанием тимоцитов – предшественников Т-лимфоцитов и мозговое, где локализованы зрелые Т-лимфоциты и эпителиальные клетки (Rezzani R. et al., 2014). Последние синтезируют гормоны тимуса (тимозины и др.), под влиянием которых тимоциты дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты (Khlystova Z.S. et al., 2000). Они имеют характерные антигены дифференцировки CD2, CD3 и CD4 (Т-хелперы) или CD8 (цитотоксические Т-лтифоциты), а также HLA-антигены I класса (Clement L.T. et al., 1990; Palmer A.C., 2011). Антигены HLA – II класса и ИЛ-2 рецепторы появляются на Т-лимфоцитах при их активации. Т-хелперы – вспомогательные клетки, они продуцируют ИЛ-2, стимулирующий созревание Т- и В-лимфоцитов. К концу 3 месяца беременности в мозговом веществе тимуса плода появляются тимические тельца. Т-лимфоциты мигрируют из тимуса в паракортикальную зону лимфатических узлов, ПАЛМ-зону селезенки и барьерные органы. Эти клетки по функциональной способности могут осуществлять реакцию трансплантат против хозяина, а также приобретать цитотоксическую активность (Титова Н.Д., 2007).

Селезенка закладывается на 5-ой неделе внутриутробного развития; лимфоциты появляются в ней – на 11-ой неделе (van de Pavert S.A., Mebius R.E., 2010). Центральные артериолы в селезенке формируются на 12-14 неделе, скопления лимфоцитов вокруг центральных артериол заметны, начиная с 17-ой недели внутриутробного развития. Максимальная гемопоэтическая активность обнаруживается на 5-ом месяце внутриутробного развития. На 22-ой неделе в селезенке преобладают лимфоциты (Титова Н.Д., 2007; Randall T.D. et al., 2008).

На 13-14-ой неделе эмбриогенеза количество лимфоцитов, входящих в состав как центрального (первичного), так и периферических (вторичных) органов иммунной системы, резко возрастает: в селезенке в эти сроки развития преобладают В-лимфоциты, в тимусе состав лимфоцитов остается постоянным – 82-85% Т-клеток и около 1,3% В-клеток, и он не отличается от процентного содержания лимфоцитов в тимусе у детей и взрослых (Хлыстова З.С. и др., 2002; Haddad R. et al., 2006; Zlotoff D.A. et al., 2008).

Начало функционирования костного мозга относят к 11-12 неделе. В этот период он также, как селезенка и лимфатические узлы, активно заселяется лимфоцитами, но основным источником этих клеток продолжает оставаться печень плода (Battista J.M. et al., 2014). Закладка лимфатических узлов начинается на 4-ом месяце фетального периода, а окончательное формирование завершается в постнатальном онтогенезе (Титова Н.Д., 2007).

Гранулоциты и моноциты появляются в печени плода на 2 месяце беременности, а затем основным местом их продукции становится костный мозг (Palmer A.C., 2011). В функциональном отношении гранулоциты плода отличаются сниженной способностью к адгезии и хемотаксису. При внутриутробном инфицировании пул нейтрофилов быстро истощается. Фагоцитоз у плода незавершенный, что связано с недостаточностью высвобождения лизосомальных ферментов (Senogles D.R. et al., 1979).

НК клетки находят в печени 5- недельного плода, и к 18-ой неделе их количество увеличивается, достигая 15-25% среди всех клеток печени (Tang Y. et al., 2012). Способность к элиминации чужеродных клеток, не имеющих HLA-молекул I класса, у них слабая. Однако количество НК клеток в пуповинной крови также достаточно высокое (10-15%) (Ivarsson M.A., et al., 2013).

В периферической крови эмбриона лимфоциты обнаруживаются на 7-ой неделе развития. Т-лимфоциты выявляются в тканях плода на 40 день гестационного периода, изначально в печени и костном мозге (Torfadottir H. et al., 2006). Что касается других лимфоидных образований барьерных органов, то их обнаруживают в небольшом количестве в аппендиксе на 13-ой и тонкой кишке – на 24-25 неделе внутриутробного развития (Титова Н.Д., 2007).

Предшественники В-клеток появляются в печени и сальнике с 8-й по 10-ю неделю пренатального развития (Gathings W.E. et al., 1977). Зрелые В-лимфоциты выявляются в крови плода к 12-14 неделе, в эти же сроки обнаруживается их способность к образованию плазматических клеток и продукции антител (Tallmadge R.L. et al., 2014). Первым на мембране В-лимфоцита появляется иммуноглобулин М (IgM), затем его концентрация уменьшается и появляются иммуноглобулины типов G, A, D и E (Burgio G.R. et al., 1989). Синтез IgA обнаружен после 30 недели внутриутробного развития, а IgG и IgM синтезируются уже с 20 недели гестации, а по данным некоторых исследователей еще раньше – на 10-11 неделе (Dorshkind K., Montecino-Rodriguez E., 2007). Содержание IgG в крови плода на 17-18 неделе гестации составляет около 0,1-0,3 г/л, после 30 недели – 0,4 г/л. Высокий уровень IgG у доношенного новорожденного (8-10 г/л) обусловлен материнским IgG, который в последние недели беременности активно транспортируется через плаценту. Он связывается с рецептором к Fc-фрагменту IgG (FcRγ) на поверхности клеток трофобласта, захватывается ими путем пиноцитоза и поступает в кровь плода. Антитела классов IgM, -A и -E через плаценту не проходят, поэтому организм

новорожденного остается недостаточно защищенным от инфекции. Это сохраняется в течение всего неонатального периода и далее до 3-6 месяцев жизни. При отсутствии внутриутробной антигенной стимуляции интенсивность синтеза иммуноглобулинов у плода очень низкая. В околоплодных водах иммуноглобулинов мало: IgG – 0,26±0,1, IgA, преимущественно секреторный – 0,03±0,01 г/л, IgM – отсутствует. Защита плода от инфекции обеспечивается несколькими механизмами – плацентарный барьер, плодные оболочки, материнские антитела класса IgG (Титова Н.Д., 2007).

В сыворотке крови у новорожденных присутствуют компоненты комплемента, уровень которых в разы ниже, чем у взрослых лиц (Burgio G.R. et al., 1989). Ввиду того, что не удалось установить трансплацентарную передачу компонентов комплемента, сделан вывод, что протеины комплемента синтезируются до рождения. Компоненты С4, С3 и С5 синтезируются на стадии раннего онтогенеза целым рядом органов и клеток. Главным местом их синтеза во внутриутробном периоде являются печень, тимус, а также толстая кишка (Day Noorbibi K.B. et al., 1969).

Система цитокинов регулирует созревание иммунной системы плода. В плаценте синтезируются γ-интерфероны и интерлейкины, которые определяют дифференцировку клеток и их функции. В этом процессе участвуют ростовые факторы (фактор роста стволовых клеток, фактор роста нервов и др.). Многие цитокины, в том числе ИФН-γ, ИЛ-4, ФНО-α, ИЛ-17, ИЛ-10, выявляются в амниотической жидкости (Lissauer D. et al., 2015).

Иммунная система плода толерантна к материнским аллоантигенам. После рождения воздействие различных антигенов, большинство из которых являются бактериями, колонизирующими кишку, инициирует быстрые изменения функционального состояния иммунной системы новорожденного, направленные на формирование эффективного иммунного ответа (Simon A.K. et al., 2015). Именно в периоде новорожденности происходит становление взаимосвязей между отдельными звеньями в системе иммунитета (Титова Н.Д., 2007). Иммунная система у новорожденных детей находится в состоянии физиологической незрелости (M’Rabet L. et al., 2008; Hong M., Bertoletti A., 2017). В литературе такое состояние описывают как иммунодефицит раннего постнатального периода. Функциональная незрелость иммунной системы является причиной повышенной восприимчивости новорожденных детей к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний (Chirico G., 2005).

*Врожденный иммунный ответ у новорожденных***.** Клетки, реализующие реакции врожденного иммунитета, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, обнаруживаются на протяжении эмбриогенеза, однако по сравнению с более поздними периодами онтогенеза у новорожденных их функциональная активность снижена.

Число зрелых нейтрофилов, впервые обнаруживающихся в первом триместре беременности, сразу после рождения резко возрастает за счет стимуляции гранулоцитарно-стимулирующего фактора (GCSF). В течение нескольких дней после рождения количество нейтрофилов в крови у новорожденных снижается, и их функциональная активность, в частности, способность к фагоцитозу, адгезия к эндотелию и хемотаксис, остается низкой (Nussbaum C. et al., 2013). Низкая функциональная активность нейтрофилов в сочетании с низким уровнем иммуноглобулина G (IgG) и белков системы комплемента в сыворотке крови наиболее выражены у недоношенных новорожденных, что увеличивает риск развития у них инфекционно-воспалительных заболеваний (Filias A. et al., 2011).

В течение нескольких дней после рождения число макрофагов в легких у новорожденных детей достигает уровня, характерного для взрослых (Blahnik M.J. et al., 2001). Однако по сравнению со взрослыми людьми у новорожденных детей моноциты и макрофаги несут на своей поверхности низкое число толл-подобных рецепторов 4 типа (TLR4), при этом активация TLR4-зависимых внутриклеточных сигнальных путей неэффективна, что обусловлено низкой продукцией цитокинов макрофагами и моноцитами в ответ на антигенную стимуляцию (Yan S.R. et al., 2004; Forster-Waldl E. et al., 2005; Al-Hertani W. et al., 2007; Sadeghi K. et al., 2007). Поэтому у новорожденных фагоцитарная активность моноцитов и макрофагов снижена, а продукция и синтез провоспалительных цитокинов супрессированы.

Дендритные клетки являются антиген-презентирующими и осуществляют захват антигенов с последующим представлением их лимфоцитам. Функциональная активность дендритных клеток у новорожденных детей снижена по сравнению с детьми старшего возраста и взрослыми вследствие как прямого, так и опосредованного супрессорного влияния регуляторных Т-лимфоцитов (Velilla P.A. et al., 2006). Прямая супрессия эффекторных функций дендритных клеток реализуется, в основном, через подавление клеточного цикла с помощью ИЛ-10,TGF-β, ИЛ-35, индукции апоптоза через механизмы истощения ростового Т-клеточного фактора ИЛ-2 и триптофана, гранзим-опосредованого цитолиза (Shevach E.M., 2009). Опосредованный супрессорный эффект Т-регуляторных лимфоцитов на дендритные клетки обеспечивается мембранными молекулами CTLA4, LAG-3, CD223, NRP-1, под влиянием которых замедляется процесс созревания дендритных клеток. Другой результат воздействия Т-регуляторных лимфоцитов на дендритные клетки заключается в резком подавлении их способности к презентации процессированных антигенных пептидов наивным хелперным и цитотоксическим Т-лимфоцитам и активации их костимуляции (Гариф Ф.Ю., Ризопулу А.П., 2016).

По сравнению с детьми и взрослыми людьми пуповинная кровь содержит небольшое количество миелоидных дендритных клеток (mDC), которые экспрессируют на своей

поверхности низкое число HLA II, CD80 и CD86, и в ответ на стимуляцию синтезируют низкие концентрации ИЛ-12 – иммунорегуляторного цитокина, активирующего развитие Тх1-типа иммунного ответа (De Wit D. et al., 2003; Willems F. et al., 2009). Таким образом, по сравнению со взрослыми людьми Тх1-тип иммунного ответа и Т-цитотоксические реакции у новорожденных детей не выражены, что коррелирует с высоким риском развития инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных вирусами, *Mycobacterium tuberculosis и Salmonella* spp. Однако показано, что активация TLR4 на миелоидных дендритных клетках приводит к синтезу цитокинов, поляризующих иммунный ответ преимущественно по Тх17-типу в количестве, уровень которых сопоставим с таковым у взрослых (De Kleer I. et al., 2014).

В отличие от людей репродуктивного возраста плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) у новорожденных синтезируют низкое количество интерферонов 1 типа в ответ на активацию вирусами TLR7 и TLR9 (Schuller S.S. et al., 2013). По-видимому, вследствие низкой продукции провоспалительных цитокинов плазмоцитоидными дендритными клетками врожденный иммунный ответ у новорожденных на такие вирусы, как респираторно-синцитиальный вирус, вирус простого герпеса и цитомегаловирус неэффективен по сравнению с более поздними периодами онтогенеза (Simon A.K. et al., 2015).

На ранних сроках гестации НК клетки толеранты к клеткам трофобласта, на которых отсутствует главный комплекс гистосовместимости I класса (MHC I), но у них обнаруживается высокая чувствительность к иммуносупрессорному цитокину TGF-β (Ivarsson M.A. et al., 2013). На протяжении всего пренатального периода цитолитическая активность НК клеток повышается, однако к моменту рождения она в 2 раза меньше показателей, характерных для взрослых людей. По сравнению с более поздними периодами онтогенеза у новорожденных НК клетки в ответ на стимуляцию ИЛ-2 и ИЛ-15 синтезируют низкое количество ИФН-γ. Однако у младенцев порог активации НК клеток низкий, что, несмотря на функциональную незрелость НК клеток, обеспечивает минимальный противовирусный иммунитет (Ivarsson M.A. et al., 2013).

Система комплемента, которая обеспечивает опсонизацию и хемоаттракцию чужеродных патогенов, облегчает их лизис и активирует продукцию провоспалительных цитокинов, у новорожденных также отличается функциональной незрелостью. Концентрация всех компонентов системы комплемента в сыворотке крови у новорожденных на 10-80% ниже, чем у взрослых людей (McGreal E.P. et al., 2012). Показана взаимосвязь между слабо выраженным воспалительным ответом у новорожденных и низким уровнем компонентов комплемента. Содержание пропердина и уровень комплемента начинает повышаться к 5-6 дню жизни ребенка (McGreal E.P. et al., 2012).

Таким образом, врожденный иммунный ответ у новорожденных функционально незрелый, что, в первую очередь, является следствием обеспечения толерантности плода к

материнским и экзогенным антигенам. Незрелость врожденного звена иммунного ответа определяет их более высокую предрасположенность к инфекционно-воспалительным заболеваниям по сравнению со взрослыми людьми.

Адаптивный иммунный ответ у новорожденных

Т-клеточное звено. Содержание Т-лимфоцитов в периферической крови у новорожденных детей сопоставимо со взрослыми людьми (Титова Н.Д., 2007). Среди Т-лимфоцитов 50-65% у новорожденного составляют $CD4^+$ Т-хелперы, а 25-30% имеют $CD8^+$ фенотип. Однако функциональная активность Т-клеточного звена адаптивного иммунитета у плодов и новорожденных отличается от взрослых людей: «наивные» $CD4^+$ лимфоциты новорожденных дифференцируются преимущественно в направлении Т-регуляторных клеток посредством стимуляции их TGF-β (Mold J.E. et al., 2010). Число Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови у новорожденных составляет около 3% от всех $CD4^+$ клеток, что значительно превышает показатели у взрослых людей (Takahata Y. et al., 2004), и, по-видимому, определяет доминирование противовоспалительного иммунного ответа у новорожденных (Mackroth M.S. et al., 2011). Помимо этого, антигенная стимуляция неонатальных Т-лимфоцитов приводит к поляризации иммунного ответа преимущественно по Тх2-типу (Holt P.G., 2004). Таким образом, адаптивный Т-клеточный иммунный ответ у новорожденных характеризуется толерогенной активностью, неэффективными распознаванием аллоантигенов и реакцией на чужеродные антигены (Holt P.G., 2004; Goriely S. et al., 2004; Hebel K. et al., 2014). Т-клетки у новорожденных способны отвечать на инфекционные антигены, однако по сравнению со взрослыми людьми уровень продукции ими цитокинов снижен (Hebel K. et al., 2014).

По сравнению со взрослыми людьми в сыворотке крови у новорожденных определяется значительное число клеток, несущих γδTCR и способных к продукции большого количества ИФН-γ. К ним относятся инвариантные НК клетки (iNKT), MAIT клетки (**m**ucosal-**a**ssociated **i**nvariant **T** cells – ассоциированные со слизистыми оболочками инвариантные Т-клетки) и «наивные» Т-клетки, секретирующие ИЛ-8 (CXCL8), которые связывают врожденное и адаптивное звено иммунного ответа (Silva-Santos B. et al., 2012; Leeansyah E. et al., 2014). Продукция этими γδТ клетками значительного количества ИФН-γ компенсирует незрелость Тх1-типа иммунного ответа у новорожденных детей при инфекционно-воспалительных заболеваниях (Gibbons D. et al., 2014).

В периферической крови у новорожденных детей преобладают «наивные» Т-лимфоциты, несущие маркер CD45RA. Относительное количество активированных Т-клеток ($CD45RO^+$) у новорожденных детей значительно ниже, чем у детей старшего возраста и взрослых (Clinton C., 2010). Показано, что с возрастом увеличивается число Т-клеток памяти и уровень продукции ими Тх1- и Тх2-цитокинов (Wiegering V. et al., 2009).

В-клеточное звено. Число В-лимфоцитов в пуповинной крови у новорожденных высокое, однако количество В-лимфоцитов, имеющих поверхностные иммуноглобулины, в первые дни жизни снижено по сравнению с показателями их содержания у взрослых (Титова Н.Д., 2007). Кроме того, В-лимфоциты, экспрессирующие рецепторы к IgA, обычно не обнаруживаются, напротив, В-лимфоциты с мембранными IgD составляют 13-14%, что намного превышает показатель у взрослых. Таким образом, у новорожденных детей нет дефицита В-лимфоцитов, но число их незрелых субпопуляций высокое (Титова Н.Д., 2007). Количество В-лимфоцитов, несущих дифференцировочные антигены CD19, CD22 у новорожденных выше, чем у взрослых. Однако они способны секретировать преимущественно IgM.

В1-лимфоциты спонтанно секретируют IgM низкой аффинности, которые не имеют значительного разнообразия вариабельных участков, но, напротив, ограничены в репертуаре распознаваемых антигенов. IgM, синтезируемые В1-лимфоцитами, связываются с наиболее распространёнными соединениями клеточных стенок бактерий (липополисахаридами), продуцируют ИЛ-10 и TGF-β, таким образом, стимулируя развитие Тх2-типа иммунного ответа (Sanz E. et al., 2010; Griffin D.O. et al., 2011). По сравнению со взрослыми людьми при рождении и в течение нескольких месяцев постнатального онтогенеза число В1 лимфоцитов в периферической крови у младенцев высокое (40%) (Hannet I. et al., 1992).

Иммунный ответ на бактериальные патогены зависит от активации Т-клеточного звена, а именно взаимодействия TCR и CD28/CD40 на Т-хелперах и связывания с HLA, CD80/86 и CD40 на В-лимфоцитах. Однако В-клетки новорожденных экспрессируют низкое количество ко-рецепторов, тем самым ограничивая активацию адаптивного звена иммунного ответа (Tasker L., Marshall-Clarke S., 2003). Кроме того, число рецепторов к С3d фрагменту комплемента на В-лимфоцитах у новорожденных низкое, что опосредует низкую эффективность формирования комплексов системы комплемента с бактериальными полисахаридами (Griffioen A.W. et al., 1991).

Иммуноглобулины у новорожденных. Среди иммуноглобулинов сыворотки крови у новорожденных только IgM образуется *de novo*, причем в значительно меньших количествах, чем у взрослых. Основная масса иммуноглобулинов у новорожденного представлена материнским IgG, содержание его почти полностью коррелирует с уровнем IgG в сыворотке крови матери. Синтез собственных IgG начинается в возрасте 6 месяцев. Уровень продукции IgM, свойственный взрослым, достигается к концу первого года жизни, а уровень продукции IgG – к 5-6 годам жизни (Paul W.E., 1999). Еще медленнее формируется способность к образованию IgA и IgE. Уровень продукции этих антител, характерный для взрослых, достигается только к 10 годам (Paul W.E., 1999). Через несколько недель после рождения в условиях постоянного контакта с микробными антигенами концентрация секреторного IgA в сыворотке крови

достигает уровня, свойственного взрослым (M'Rabet L. et al., 2008). Стромальные клетки красного костного мозга у новорожденных не способны поддерживать длительную функциональную активность плазмобластов и их дифференцировку в плазмоциты, поэтому в результате иммунизации продукция IgG у новорожденных резко снижается в отличие от детей препубертатного возраста и взрослых людей (Pihlgren M. et al., 2006).

Таким образом, эффективность развития адаптивного звена иммунного ответа у новорожденных ниже, чем в более поздние возрастные периоды. Функциональная незрелость иммунной системы, в том числе поляризация иммунного ответа по Тх1-типу и синтез антител, может определять более высокую частоту встречаемости и тяжесть течения инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и сепсиса, у новорожденных детей по сравнению со взрослыми людьми.

Возрастные морфофункциональные изменения иммунной системы

По мере взросления организма иммунная система претерпевает структурные и функциональные изменения. Поступающие материнские антитела с молоком определяют пассивный иммунитет у новорожденных, который у младенцев сменяется постепенным созревающим звеном врожденного и адаптивного иммунного ответа. Нарастающая с возрастом антигенная стимуляция активирует иммунологическую память (Zinkernagel R.M., 2000; Walker J.M., Slifka M.K., 2010).

Врожденный иммунный ответ у детей. В отличие от антенатального периода и периода новорожденности данные литературы о возрастных изменениях морфофункционального состояния иммунной системы в детский возрастной период до момента полового созревания немногочисленны, и, в основном, они касаются продукции цитокинов (Kollmann T.R. et al., 2012; O'Connor T.J. et al., 2014).

Показано, что уровень экспрессии TLR, а также сигнальных молекул, активирующих провоспалительные реакции врожденного иммунитета, у здоровых детей первых 5 лет жизни сопоставимы с таковыми у взрослых (Danis B. et al., 2008; Dasari P. et al., 2011; Reece P. et al., 2011; Tulic M.K. et al., 2011). Причем при инфекционно-воспалительных заболеваниях, в том числе сепсисе, у детей наблюдается активация экспрессии TLRs на моноцитах (Zhang J.P. et al., 2010). Однако TLR-зависимая продукция кислородных радикалов у детей снижена по сравнению со взрослыми лицами (Vento S., Tanko M.N., 2009; Lavoie P.M. et al., 2010; Chang B.A. et al., 2011; De Paepe M.E. et al., 2011).

Начиная с пятилетнего возраста, TLR-зависимая продукция моноцитами и плазмоцитоидными дендритными клетками провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-α и ИЛ-1β, нарастает (рис. 1.3). Постепенное увеличение уровня продукции провоспалительных

цитокинов у детей сопровождается снижением синтеза ИЛ-10, ИЛ-6 и ИЛ-23 (Belderbos M.E. et al., 2009; Kollmann T.R. et al., 2009; Corbett N.P. et al., 2010; Lavoie P.M. et al., 2010; Burl S. et al., 2011; Lisciandro J.G. et al., 2012). Уровень продукции ИЛ-12 (иммунорегуляторного цитокина, поляризующего иммунный ответ по Тх1-типу), плазмоцитоидными дендритными клетками к двум годам постнатального развития достигает значений, характерных для взрослых (Corbett N.P. et al., 2010).

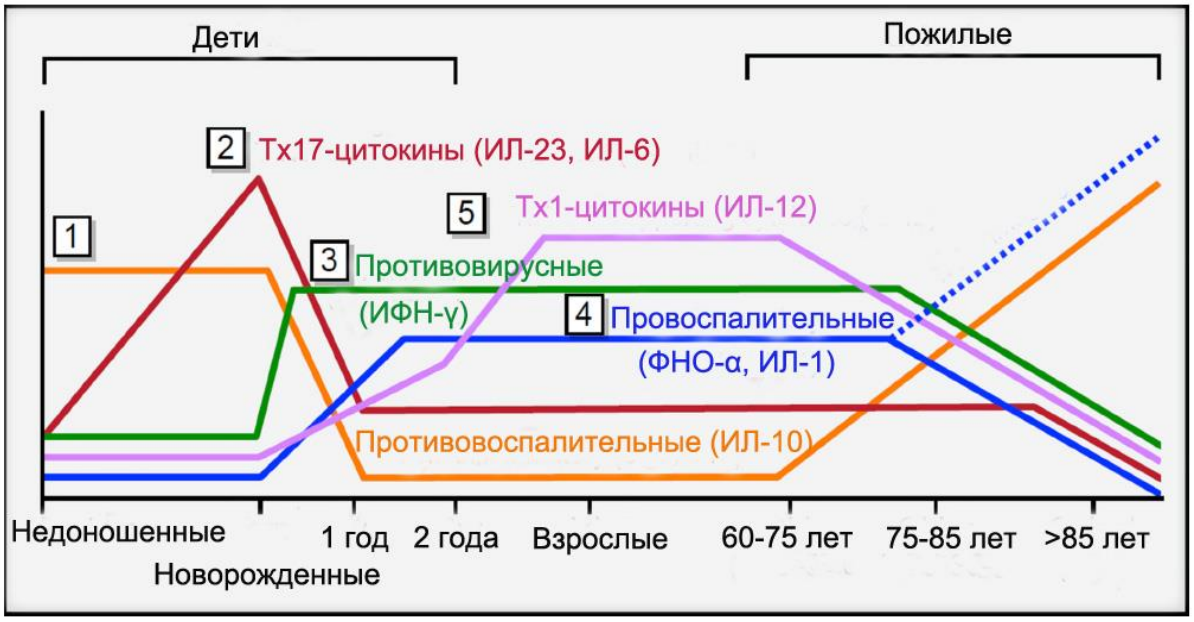


Рис. 1.3. Возрастные особенности TLR-зависимой продукции цитокинов (по T.R. Kollmann et al., 2012).

1. В пуповинной крови у недоношенных новорожденных значительное количество противовоспалительного ИЛ-10, но низкое – ряда провоспалительных цитокинов.

2. Лейкоциты доношенных новорожденных в ответ на активацию TLR продуцируют большое количество ИЛ-6 и ИЛ-23, которые опосредуют развитие Тх17-типа иммунного ответа.

3. TLR-зависимая продукция ИФН 1 типа плазмоцитоидными дендритными клетками резко снижается при рождении, но в течение нескольких недель постнатального онтогенеза достигает значений, характерных для взрослых.

4. В течение нескольких лет после рождения наблюдается увеличение продукции моноцитами и дендритными клетками провоспалительных цитокинов, в том числе ФНО-α и ИЛ-1β, что сопровождается постепенным снижением продукции провоспалительного ИЛ-10, и Тх17-цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-23.

5. TLR-зависимая продукция Тх1-цитокинов, в том числе ИЛ-12, достигает значений, характерных для взрослых, только к 2-м годам постнатального развития.

Адаптивный иммунный ответ у детей

Т-клеточное звено. По мере взросления число Т-регуляторных клеток снижается, а количество Тх1, Тх17 и Тх2-клеток постепенно увеличивается (Shearer W.T. et al., 2003). Созревание иммунной системы у детей характеризуется увеличением интенсивности Тх1-типа иммунного ответа и подавлением функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов (M'Rabet L. et al., 2008). Относительное количество Т-хелперов у новорожденных детей выше, чем у детей старшего возраста и взрослых (Wiegering V. et al., 2009). Количество цитотоксических Т-лимфоцитов, наоборот, увеличивается с возрастом (Gasparoni A. et al., 2003). Соответственно, иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4/CD8) с возрастом снижается, что указывает на активацию цитотоксических реакций. Пролиферативная активность Т-лимфоцитов у новорожденных детей ниже, чем у детей старшего возраста и взрослых (Gasparoni A. et al., 2003).

Наиболее значимые возрастные изменения иммунной системы связаны с Т-клеточным звеном иммунитета и инволюцией тимуса. Возрастная инволюция характеризуется снижением пролиферации Т-лимфоцитов в тимусе. Количество клеток-предшественников Т-лимфоцитов в костном мозге также уменьшается с возрастом (Kollmann T.R. et al., 2012). Поддержание числа Т-клеток в периферической крови после полового созревания осуществляется за счет пролиферации зрелых Т-лимфоцитов во вторичных органах иммунной системы и увеличения числа долгоживущих клеток памяти (Chirico G., 2005).

Синтез иммуноглобулинов. Созревание и дифференцировка иммунной системы продолжается многие годы. Уровень IgG у детей раннего возраста снижается из-за катаболизма материнского, тогда как синтез собственного иммуноглобулина пока низкий. Концентрация IgG в крови у детей начинает повышаться с 1,5-2 лет, что, по-видимому, обусловлено вакцинациями (Chirico G., 2005). Уровни подклассов IgG достигают значений, характерных для взрослых, в разные возрастные периоды: IgG1 и IgG4 к 8, IgG3 – к 10, IgG2 – к 12 годам. Дефицит IgG2 и IgG4 в раннем возрасте, по-видимому, служит причиной высокой чувствительности детей к гемофильной инфекции, пневмококкам и менингококкам. Лишь к 7-8, а нередко и к 12 годам уровни иммуноглобулинов приближаются к значениям, характерным для взрослых, а в 14-20 лет содержание IgG может превышать показатели у взрослых (Титова Н.Д., 2007; Chirico G., 2005).

После первичной вакцинации преобладает продукция IgM, и его уровень постепенно увеличивается с возрастом. IgA у детей первых месяцев жизни отсутствует или его количество крайне низкое, что компенсируется его поступлением с материнским молоком при грудном вскармливании. Синтез IgA достигает значений, характерных для взрослых, к 2-4 годам. В этот период повышена чувствительность к вирусам гриппа, парагриппа, аденовирусам, а также

манифестируют гуморальные генетические иммунодефициты (Титова Н.Д., 2007; Chirico G., 2005).

Начиная с первого месяца жизни до 5-6 лет постнатального онтогенеза абсолютное и относительное число лимфоцитов увеличивается, что, возможно, связано с повышенной пролиферативной активностью тимоцитов, вследствие чего увеличивается масса тимуса. Однако соотношение Т- и В-лимфоцитов в этот период относительно постоянны. В 4-6 лет относительные и абсолютные показатели количества лимфоцитов и гранулоцитов сравниваются. Уровни IgG и IgM, синтезируемые В-лимфоцитами, приближаются к таковым у взрослых (Титова Н.Д., 2007).

В пубертатный период (девочки 12-13 лет, мальчики 14-15 лет) наблюдается относительное уменьшение массы лимфоидных органов. Увеличение концентрации половых гормонов сопровождается возрастной инволюцией тимуса. Соотношение клеточного и гуморального звеньев иммунитета стабилизируется. Отмечается появление аутоиммунных, лимфопролиферативных и хронических воспалительных заболеваний (Титова Н.Д., 2007).

Таким образом, морфофункциональное состояние иммунной системы изменяется в течение жизни. Развитие иммунной системы начинается в эмбриональном периоде. Иммунная система у новорожденных детей находится в состоянии физиологической незрелости и характеризуется снижением функциональной активности НК-клеток и гранулоцитов, уменьшением продукции цитокинов и антител иммунокомпетентными клетками и снижением пролиферативной активности Т-лимфоцитов. С возрастом происходит созревание иммунной системы, связанное со становлением клеточного и гуморального звеньев иммунитета. «Старение» иммунной системы выражается в снижении пролиферации и функциональной активности Т-лимфоцитов, а также увеличении продукции антител и поляризации иммунного ответа по Тх2-типу.

1.3 Половые гистофизиологические различия иммунной системы в разных возрастных группах

Работы, посвященные изучению половых морфофункциональных различий иммунной системы у детей, в том числе у новорожденных, малочисленны и фрагментарны. Показано, что по сравнению с девочками у мальчиков в возрасте до 6 лет ниже абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов и выше процентное содержание НК-клеток в периферической крови, а также выше уровень продукции лимфоцитами ИЛ-2 (Lisse I.M. et al., 1997; Wiegering V. et al., 2009). Кроме того, показано что у девочек старше 12 лет фагоцитарная активность гранулоцитов и уровень продукции ИФН-γ лимфоцитами периферической крови выше (Bartlett J.A. et al., 2001; Wiegering V. et al., 2009).

Большинство исследований, посвященных анализу половых различий морфофункционального состояния иммунной системы у человека, касаются мужчин и женщин репродуктивного возраста.

Половые различия врожденного иммунитета. Показано, что у женщин в постменопаузе и у мужчин выше абсолютное и относительное количество моноцитов в периферической крови, чем у женщин репродуктивного возраста (Bouman A. et al., 2004). Снижение числа моноцитов в крови у женщин репродуктивного возраста обусловлено тем, что эстрогены и прогестины подавляют пролиферативную активность и усиливают апоптотическую гибель моноцитов (Thongngarm T. et al., 2003).

Количество нейтрофилов в периферической крови у мужчин и женщин не различается (Yovel G. et al., 2001; Bouman A. et al., 2004). Однако показано, что при повышении уровня эстрогенов и прогестерона в сыворотке крови наблюдается активация гранулопоэза в костном мозге, подавление апоптотической гибели предшественников нейтрофилов, в результате чего повышается число зрелых сегментоядерных нейтрофилов в крови (Molloy E.J. et al., 2003). Тогда как повышение уровня тестостерона не оказывает влияния на интенсивность этих процессов (Bouman A. et al., 2004). Фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов в крови у женщин в ответ на анестезию, хирургические вмешательства, введение ЛПС и острую алкогольную интоксикацию выше, чем у мужчин (Spitzer J., 1999).

Абсолютное и относительное количество НК-клеток в периферической крови и уровень продукции цитокинов этими клетками у мужчин и женщин не различаются (Giltay E.J. et al., 2000; Bouman A. et al., 2001). Цитотоксическая активность НК-клеток у женщин в постменопаузе и у мужчин выше, чем у женщин репродуктивного возраста (Souza S.S. et al., 2001; Yovel G. et al., 2001).

Увеличение числа иммунных клеток в очагах локального воспаления в ответ на продукцию хемокинов – необходимое условие активации иммунного ответа при инфекционно-воспалительных заболеваниях (Luster A.D., 2001). Несмотря на то, что у женщин обнаружена более высокая продукция цитокинов в крови при инфекционно-воспалительных заболеваниях, у мужчин наблюдается повышенный уровень хемоаттрактантов, включая остеопонтин, ферритин, Е-селектин, MCP-1, -4, VCAM-1 (Ramsey J.M. et al., 2012). Низкий уровень хемокинов у женщин объясняется супрессивным действием эстрогенов на продукцию их макрофагами (Cannon J.G., St. Pierre B., 1997; Fish E.N., 2008).

Половые различия адаптивного иммунитета. По данным литературы, количество Т-лимфоцитов, в частности $CD4^+$ клеток и, соответственно, индекс отношения CD4/CD8, у мужчин ниже по сравнению с женщинами (Bouman A. et al., 2004; Nalbandian G, Kovats S., 2005). R.W. McMurray и соавт. (2001) показали, что низкое число Т-лимфоцитов в периферической крови у

мужчин обусловлено влиянием тестостерона, усиливающего апоптотическую гибель этих клеток. По сравнению с женщинами репродуктивного возраста у женщин в постменопаузе, которая характеризуется низкими концентрациями эстрадиола и прогестерона, наблюдается уменьшение абсолютного и относительного количества Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, что может быть связано со снижением концентрации эстрогенов в сыворотке крови (Giglio T. et al., 1994; Yang J.H. et al., 2000).

Абсолютное и относительное количество В-лимфоцитов в периферической крови у мужчин и женщин не различается (Giltay E.J. et al., 2000; Auerbach L. et al., 2002). Однако исследования на животных показали, что введение эстрадиола мышам приводит к усилению пролиферации и подавлению апоптотической гибели предшественников В-лимфоцитов в костном мозге (Medina K.L. et al., 2000; Kamada M. et al., 2001), а также подавлению апоптоза В-клеток в селезенке (Grimaldi C.M. et al., 2002).

При исследовании цитокинового профиля у мужчин и женщин половых различий обнаружено не было (Kamada M. et al., 2001; Cioffi M. et al., 2002; Bouman A. et al., 2004). Однако рядом других исследователей показано, что активация гуморального и клеточного иммунного ответа более выражена у самок, чем у самцов, а выраженность воспалительных реакций, в том числе и продукция провоспалительных цитокинов, зависит от пола (Grossman C., 1989; Spitzer J. 1999; Pelfrey C.M., 2001; Casimir G.J., Duchateau J., 2011). Так показано¸ что по сравнению с мужчинами в сыворотке крови у женщин выше количество интерлейкинов и молекул, участвующих в активации роста и пролиферации иммунокомпетентных клеток, в частности ИЛ-3, -5, -7, -12, -15, тромбопоэтина (Ramsey J.M. et al., 2012).

Выявлены половые различия уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови у человека. Так, у женщин по сравнению с мужчинами уровень антител классов IgM и IgG выше (Bouman A. et al., 2005; Nalbandian G, Kovats S., 2005).

Исследования по изучению половых гистофизиологических различий иммунной системы у экспериментальных животных немногочисленны. Показано, что уровень продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α моноцитами периферической крови у самцов крыс выше, чем у самок (Asai K. et al., 2001; Bouman A. et al., 2004). В исследовании M.A. De León-Nava и соавт. (2009) выявлено, что у самок мышей линии Balb/c по сравнению с самцами выше уровень продукции клетками селезенки ИФН-γ и ниже ИЛ-4.

Иммунная система и менструальный/эстральный цикл. По данным экспериментальных исследований морфофункциональное состояние иммунной системы у особей женского пола циклически изменяется в зависимости от фазы эстрального или менструального цикла (Angele M.K. et al., 2000; Wichmann M.W. et al., 2003; Angele M.K. et al., 2006). «Эстрогеновый статус» является одним из факторов, модулирующих выраженность иммунного ответа (Bebo B.F. et al.,

2001). По сравнению с другими фазами эстрального цикла фаза проэструса, при которой наблюдается максимальный уровень эстрадиола в сыворотке крови, характеризуется наиболее выраженной реакцией иммунной системы на антигенные воздействия (Bebo B.F. et al., 2001; Angele M.K. et al., 2006).

Выявлены гистофизиологические различия иммунной системы у женщин в разных фазах менструального цикла. В фолликулярной фазе менструального цикла наблюдается высокий уровень эстрогенов в сыворотке крови, а в лютеиновой фазе цикла уровень эстрогенов снижается (Fish E.N., 2008). В литературе представлены данные о субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у женщин в зависимости от фазы менструального цикла. Количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов увеличено у женщин в фолликулярную фазу овариального цикла по сравнению с лютеиновой фазой, а количество В-лимфоцитов в разные фазы цикла практически не изменяется (Auerbach L. et al., 2002; Lee S. et al., 2010). Количество регуляторных Т-клеток у женщин возрастает во время фолликулярной фазы цикла при повышении уровня эстрогенов в крови, что указывает на подавление реакций клеточно-опосредованного иммунного ответа (Fish E.N., 2008).

Уровень продукции моноцитами ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α возрастает во время лютеиновой фазы овариального цикла и снижается во время фолликулярной (Bouman A. et al., 2005; Fish E.N., 2008).

Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови у женщин в разных фазах менструального цикла не различается (Gomez E. et al., 1993).

Таким образом, в литературе представлены фрагментарные данные по изучению половых гистофизиологических различий иммунной системы у человека и животных в разные периоды постнатального развития, в которых охарактеризованы половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и уровня продукции цитокинов и иммуноглобулинов клетками иммунной системы. Большинство исследований касаются мужчин и женщин репродуктивного возраста и половозрелых животных, тогда как данные о половых гистофизиологических различиях иммунной системы в другие периоды постнатального развития, включая новорожденный и препубертатный периоды, в литературе отсутствуют. Функциональное состояние иммунной системы изменяется в зависимости от колебаний уровня эстрогенов и прогестинов в сыворотке крови, поэтому в исследованиях у особей женского пола необходимо учитывать фазу эстрального или менструального цикла.

1.4 Половые и возрастные различия частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний

Возрастные различия частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний связаны, в первую очередь, с функциональным созреванием иммунной системы и

ее возрастной инволюцией в течение постнатального онтогенеза, а также с изменяющейся в процессе развития концентрацией половых гормонов, оказывающих иммуномодулирующее действие. Основные возрастные изменения функционального состояния врожденного звена иммунной системы, в частности TLR-зависимой продукции цитокинов, и корреляция с частотой развития инфекционно-воспалительных заболеваний представлены в таблице 1.1.

Половые различия частоты развития и тяжести течения вирусных инфекций

По сравнению со взрослыми у новорожденных и детей чаще развиваются вирусные заболевания. В возрасте от 1 года и до 14 лет дети болеют чаще всего ОРВИ, корью, краснухой, детской розеолой, вызванной вирусами герпеса 6 и 7 типов. Показатели частоты развития вирусных заболеваний и тяжесть их течения у мальчиков выше, чем у девочек, у которых, в отличие от мальчиков, более выражена реакция иммунной системы (Klein S.L., Flanagan K.L., 2016). Одним из наиболее распространенных вирусных заболеваний у новорождённых детей является врожденная цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция, которая приводит к нейрокогнитивным нарушениям и задержке психоэмоционального развития. Хотя частота развития ЦМВ инфекции одинакова у обоих полов, показано, что пороки развития ЦНС у девочек встречаются в два раза чаще, чем у мальчиков (Picone O. et al., 2005). Исследователи считают, что высокая частота нарушений развития ЦНС, вызванная вирусной инфекцией, у девочек связана с более выраженной активацией иммунной системы и провоспалительными реакциями (McCarthy M. et al., 2000). Показано, что у плодов, инфицированных ЦМВ, выраженность инфильтрации головного мозга Т-цитотоксическими лимфоцитами коррелирует с тяжестью повреждений (Gabrielli L. et al., 2012). По сравнению с мужчинами у женщин репродуктивного возраста клинические проявления ЦМВ сочетаются с поляризацией иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу и активацией продукции ИФН-γ и ИЛ-2 (Villacres M.C. et al., 2004). Несмотря на то, что половые различия при инфицировании ЦМВ у новорожденных не выявлены, более тяжелое течение заболевания у девочек исследователи объясняют выраженной активацией цитотоксических реакций клеточного иммунного ответа (Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014).

Таблица 1.1

Возрастные различия функционального состояния врожденного иммунитета и частоты встречаемости инфекционно-воспалительных заболеваний (по T.R. Kollmann et al., 2012)

Возраст	**Статус врожденного иммунитета**	**Связь с инфекционно-воспалительными заболеваниями**
Недоношенные новорожденные	Преимущественно противовоспалительный – высокий уровень ИЛ-10 Остальные реакции иммунного ответа слабые	Инвазивные инфекционные заболевания, вызванные внутриклеточными патогенами, такими как *E.coli*, коагулазо-негативными стафиолококками (CoNS) и грибами *Candida spp*. Оптимальная защита от этих инфекций зависит от эффективной активации Тх17-типа иммунного ответа с продукцией соответствующих цитокинов, уровень которых у недоношенных новорожденных крайне низкий
Доношенные новорожденные – 2 месяца постнатального онтогенеза	Выраженный Тх17-тип иммунного ответа Низкий уровень продукции противовирусных ИФН 1 типа Супрессия Тх1-типа иммунного ответа	Предрасположенность к вирусным заболеваниям, вызванным вирусом простого герпеса и грамм-положительным бактериальным патогенам, в частности Listeria monocytogenes и стрептококками группы В. Наиболее уязвимым возрастным периодом для развития этих инфекционно-воспалительных заболеваний являются первые два месяца жизни, когда наблюдается низкая TLR-зависимая продукция ИФН 1 типа
Дети 2-5 лет	Супрессия Тх1-типа иммунного ответа	Предрасположенность к заболеваниям, вызванным Mycobacterium tuberculosis, Burkholderia pseudomallei и Salmonella spp., развитие которых зависит от активации Тх1-типа иммунного ответа и продукции ИФН-γ и ИЛ-12p70, уровень которых у детей первых 5 лет жизни низкий
Пожилые люди (75-80 лет)	Высокий базальный уровень провоспалительных цитокинов Снижение экспрессии TLR на клетках врожденного иммунитета	Снижение уровня экспрессии TLR на моноцитах коррелирует с высоким риском повторным заражением Mycobacterium tuberculosis, являющейся основной причиной гериатрических легочных инфекционных заболеваний. Снижение функциональной активности плазмацитоидных дендритных клеток на фоне низкой продукции ИФН 1 типа сопровождается предрасположенностью пожилых людей к развитию герпес-вирусной инфекции и связанных с ней осложнений и листериоза. Пожилые люди характеризуются высокой проницаемостью гематоэнцефалического барьера вследствие гиперпродукции провоспалительных цитокинов, что приводит к более тяжелому течению лихорадки Западного Нила. Высокий базальный уровень продукции провоспалительных цитокинов, но низкая функциональная активность клеток врожденного иммунитета в ответ на антигенную стимуляцию, коррелирует с тяжестью течения сепсиса, развившегося в качестве осложнения внебольничной пневмонии.

Вирусное заболевание детского возраста - корь, практически исчезла в развитых странах благодаря вакцинации. При вакцинации против кори и других вирусных заболеваний, у девочек титры антител выше и, по сравнению с мальчиками, они сохраняются более длительное время (Mossong J. et al., 2000). Хотя принципы вакцинации одинаковы для обоих полов (de Melker H. et al., 2001), корь чаще встречается у привитых мальчиков (Green M.S., 1992). При эпидемических вспышках кори у женщин по сравнению с мужчинами смертность выше, и ее показатели максимальные у женщин репродуктивного возраста (Garenne M., 1992). Однако в препубертатном и в зрелом возрастных периодах осложнение кори - подострый склерозирующий панэнцефалит чаще всего развивается у лиц мужского пола (Manayani D.J. et al., 2002; Gutierrez J. et al., 2010). Корь сопровождается преимущественной активацией Tx1-типа иммунного ответа, однако половых различий баланса Tx1/Tx2 иммунологических реакций при кори как у детей, так и у взрослых не выявлено (Griffin D.E. et al., 1994; Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014).

При вспышке эпидемического паротита было показано, что в большей мере к этому заболеванию предрасположены лица мужского пола, вне зависимости от того, были ли они вакцинированы или нет (Dominges A. et al., 2006). После вакцинации против паротита у лиц женского пола в крови выявляется более высокий титр антител, чем у мужчин, что, возможно, и определяет низкую частоту встречаемости этого инфекционного заболевания у женщин (Dominges A. et al., 2006). Эпидидимит, как осложнение паротита, в постпубертатном возрастном периоде наблюдается у 15-30% юношей, тогда как оофорит развивается только у 5% девушек (Hviid A. et al., 2008). Помимо этого, редко встречающиеся осложнения паротита, такие как менингит и энцефалит, чаще наблюдаются у мужчин (Hviid A. et al., 2008). Однако исследования, посвященные изучению половых различий течения паротита, также как и кори, у детей и взрослых, отсутствуют (Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014).

Респираторно-синцитиально вирусная (РСВ) инфекция - одно из наиболее тяжелых вирусных заболеваний, которое наблюдается хотя бы один раз у 80% детей, начиная с первого года жизни (Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014). Показатели встречаемости РСВ инфекции превалируют у мальчиков, а мужской пол является фактором риска для госпитализации в связи с развитием облитерирующего бронхиолита и пневмонии (Nair H. et al., 2010; Borchers A.T. et al., 2013). В острую фазу РСВ инфекции наблюдается активация врожденного звена иммунного ответа, что характеризуется воспалительной инфильтрацией мелких нехрящевых бронхов, бронхиол и респираторных отделов макрофагами, нейтрофилами и НК клетками (Openshaw P.J., Tregoning J.S., 2005). В одном из исследований показана корреляция между повышением уровня провоспалительных цитокинов и снижением тяжести течения РСВ инфекции у девочек (Nagayama Y. et al., 2006). Несмотря на отсутствие различий содержания половых гормонов у детей разного пола в препубертатном периоде, половые различия течения РСВ инфекции могут

определяться экспрессией генов, расположенных в половых хромосомах и кодирующих белки и молекулы иммунного ответа.

Ложный круп при ларинготрахеобронхите является наиболее частым осложнением острых респираторных инфекций верхних дыхательных путей у детей в возрасте от 6 месяцев и до 6 лет, и его частота встречаемости выше у мальчиков (Segal A.O. et al., 2005). Показатели заболеваемости ветряной оспой не зависят от пола в детском и в подростковом возрастных периодах, однако количество случаев этого заболевания у девушек возрастает после периода полового созревания (Fleming D.M. et al., 2004).

Показано, что при ВИЧ инфекции у девочек число $CD4^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови выше, чем у мальчиков, а также у них более эффективна противовирусная терапия (Ruel T.D. et al., 2011). Абсолютное и относительное число Т-лимфоцитов также выше у здоровых девочек, неинфицированных ВИЧ, причем эти половые различия обнаруживаются с первого дня жизни (Falagas M.E. et al., 2007). Несмотря на высокое число $CD4^+$ лимфоцитов у девочек, половых различий частоты встречаемости ВИЧ инфекции как у детей, так и у взрослых не обнаружено (Marinda E. et al., 2007).

Считается, что женщины репродуктивного возраста более устойчивы к действию вирусов, так как у них выше уровень экспрессии на дендритных клетках TLR3, а также TLR3-зависимая продукция провоспалительных цитокинов. Выраженность активации иммунного ответа на вирусные антигены у женщин может варьировать в зависимости от изменений уровня половых гормонов, например, в течение менструального/эстрального цикла, при использовании контрацептивных препаратов, а также во время беременности (Brabin L., 2002). Женщины в постменопаузе, когда содержание эстрогенов низкое, и женщины, принимающие гормональные контрацептивы, повышающие концентрацию половых стероидов, более восприимчивы к ВИЧ, и в биологических средах их половой системы выявляется б*о*льшее число вирусных частиц по сравнению с женщинами репродуктивного возраста и женщинами, не принимающими контрацептивные препараты. Это свидетельствует о разнонаправленном влиянии разных концентраций эстрогенов и прогестерона на течение вирусной инфекции (Aaby P. et al., 1996; Baeten J.M. et al., 2007). У ВИЧ-инфицированных женщин, принимающих оральные контрацептивы, наблюдается прогрессирующее течение оппортунистических вирусных инфекций, в отличие от женщин, использующих внутриматочную спираль (Stringer E.M. et al., 2007). В случаях инфицирования вирусом простого герпеса 2 типа прогестерон подавляет как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, чем объясняется повышенная восприимчивость к этому вирусу у женщин по сравнению с мужчинами (Gillgrass A.E. et al., 2003).

По данным клинических исследований, грипп у мужчин протекает тяжелее, чем у женщин (Quach C. et al., 2003). Женщины также более устойчивы к вирусу простого герпеса 1 типа и

цитомегаловирусной инфекции (Villacres M.C. et al., 2004). По-видимому, устойчивость к этим инфекциям связана с высоким уровнем циркулирующего в плазме крови IgM у женщин (Butterworth M. et al., 1967).

Половые различия частоты вирусных инфекций и тяжести их течения также характерны и для половозрелых лабораторных животных. По данным экспериментальных исследований заболевания, вызываемые пикорнавирусами, чаще развиваются и тяжелее протекают у самцов и беременных самок мышей C57L/J по сравнению с небеременными самками (Fuller A. et al., 2007).

Таким образом, частота развития, тяжесть течения и осложнения вирусных инфекций зависят от возраста и пола. У новорожденных и детей половые различия при разных вирусных заболеваниях зависят от типа вируса, и при одних вирусных заболеваниях частота и тяжесть течения выше у мальчиков, а при других – у девочек. В зрелом возрастном периоде частота и тяжесть течения вирусных заболеваний у мужчин выше, чем у женщин. Кроме того, у женщин тяжесть вирусной инфекции зависит от колебаний содержания половых стероидных гормонов.

Половые различия частоты развития и тяжести течения бактериальных инфекций у детей

В детском возрасте чаще всего развиваются инфекционно-воспалительные заболевания дыхательных путей. Во всех возрастных группах у детей заболевания верхних дыхательных путей, такие как синуситы и тонзилиты, чаще встречаются у девочек, тогда как болезни нижних дыхательных путей чаще развиваются и тяжелее протекают у мальчиков (Falagas M.E. et al., 2007). Однако другими исследователями показано, что стрептококковый фарингит чаще развивается, и его симптомы более выражены у мальчиков по сравнению с девочками (Breda L. et al., 2013). L.P. Celentano и соавт. (2005) было показано, что среди заболевших при вспышке коклюша в Европе преобладали девочки, причем наиболее тяжелое течение заболевания наблюдалось у новорожденных детей и младенцев до достижения ими возраста вакцинации. Эти данные подтверждены исследованиями, проведенными в США (Haberling D.L. et al., 2009). *Mycoplasma pneumoniae* – один из основных возбудителей атипичной пневмонии, которая наиболее часто развивается в период полового созревания, также чаще наблюдается у девочек (Eshima N. et al., 2012).

Половые различия частоты развития и тяжести течения паразитарных заболеваний у детей

Заболеваемость паразитарными инфекциями, в частности лейшманиозом, имеет половые различия, особенно ярко проявляющиеся в периодах новорожденности и после полового созревания (Guerra-Silveira F., Abad-Franch F., 2013). Показано, что наиболее уязвимыми являются мальчики, а изменения выраженности половых различий частоты встречаемости лейшманиоза в этих возрастных группах доказывает влияние половых гормонов на течение

воспалительного процесса. Поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу коррелирует с менее выраженной тяжестью течения заболевания, и, наоборот, доминирование Тх2-типа иммунного ответа сопровождается обострениями лейшманиоза (Alexander J., Bryson K., 2005). Видимо иммуномодулирующее действие половых гормонов, содержание которых различается у мальчиков и девочек в периоды новорожденности и полового созревания, опосредуют различия в восприимчивости и тяжести течения лейшманиоза (Snider H. et al., 2009).

Таким образом, несмотря на отсутствие ярких различий в содержании половых гормонов у новорожденных и детей, частота и тяжесть течения инфекционно-воспалительных заболеваний различается между полами. По-видимому, половые различия особенностей течения вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций у детей зависят, в первую очередь, от уровня экспрессии генов половых хромосом, определяющих развитие иммунного ответа. По данным литературы, ряд вирусных заболеваний чаще развивается и тяжелее протекает у девочек, а к бактериальным инфекциям предрасположены, наоборот, мальчики. Половые различия течения паразитарных заболеваний особенно ярко проявляются у новорожденных, в сыворотке крови у которых содержание эстрадиола имеет гендерные особенности, а также после полового созревания, когда у мальчиков и девочек возрастает концентрация женских и мужских половых стероидов, что указывает на роль половых гормонов в развитии паразитарных заболеваний. Однако работы, в том числе и экспериментальные, касающиеся половых различий морфофункциональных изменений и иммунологических нарушений при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний в ранние сроки постнатального онтогенеза, отсутствуют. Недостаточность литературных данных по этому вопросу не позволяет разработать и проводить более эффективную профилактику и терапию инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных и детей.

Половые различия частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний у взрослых

По данным клинических исследований половые различия частоты инфекционно-воспалительных заболеваний и тяжести их течения особенно ярко проявляются после полового созревания (Roberts C.W. et al., 2001; Klein S.L., Flanagan K.L., 2016), поэтому многие исследователи связывают различия реакции иммунной системы у мужчин и женщин с эффектами половых стероидов (Roberts C.W. et al., 2001; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Повышенная чувствительность к инфекционным агентам у мужчин является одной из причин высокого уровня их смертности по сравнению с женщинами. Анализ продолжительности жизни мужчин и женщин в 227 странах показал, что вне зависимости от средней продолжительности жизни женщины живут дольше (Сьерра-Леоне: 49 лет – женщины, 44 года – мужчины; Норвегия: 82 года – женщины, 76 лет – мужчины) (Kinsella K., 2001). По сравнению с женщинами у мужчин чаще

развиваются и тяжелее протекают заболевания, связанные с вирусными, бактериальными, грибковыми и паразитарными инфекциями (Fish E.N., 2008; Gilliver S.C., 2010; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Кроме того, у мужчин чаще возникают опухолевые заболевания кишечника, почек и печени (Gilliver S.C., 2010). Однако женщины характеризуются повышенной частотой развития аутоиммунных заболеваний, а также более интенсивной реакцией отторжения аллогенных кожных трансплантатов по сравнению с мужчинами (Angele M.K et al., 2006; Fish E.N., 2008).

Половые различия частоты развития и тяжести течения паразитарных инфекций у взрослых

Частота развития паразитарных инфекций, в частности трипаносомоза, лейшманиоза, трихинеллеза, и тяжесть их течения у самцов большинства видов млекопитающих выше, чем у самок (Rosas L.E. et al., 2005; Lang C. et al., 2007; Lezama-Dávila C.M. et al., 2008). Выявлены половые различия восприимчивости половозрелых крыс Вистар к личинкам гельминта *Strongyloides venezuelensis* (Rivero J.C. et al., 2002). При гельминтозах показатели числа личинок *S. venezuelensis* в легких самцов по сравнению с самками статистически значимо выше. Орхиэктомия приводит к повышению устойчивости организма-хозяина к *S. venezuelensis* на стадиях мигрирации паразита. Снижение содержания эстрогенов в результате овариэктомии оказывает противоположное действие. По-видимому, устойчивость организма-хозяина к *S. venezuelensis* обусловлена активацией системы мононуклеарных фагоцитов (Watanabe K. et al., 1999).

Половые различия частоты развития и тяжести течения аутоиммунных заболеваний у взрослых

По данным литературы аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и др., чаще развиваются и тяжелее протекают у женщин, чем у мужчин (Angele M.K. et al., 2006). Большинство авторов связывают это с тем, что у женщин преобладает Тх2-тип иммунного ответа (Roved J. et al., 2017; Foo Y.Z. et al., 2016). По сравнению с мужчинами для женщин характерны более высокие титры аутоантител, циркулирующих в плазме крови (Klein S.L. et al., 2015). При системной красной волчанке у женщин уровень метаболизма андрогенов снижается, а эстрогенов – повышается (Yazdany J. et al., 2010). В экспериментальных исследованиях, посвященных изучению патогенеза системной красной волчанки, используется линия мышей NZB/NZW. Кастрация самцов мышей линии NZB/NZW приводит к развитию этого аутоиммунного заболевания. Введение экзогенных андрогенов орхиэктомированным самцам предотвращает возникновение системной красной волчанки (Sheridan P.J., 1991).

Механизмы, определяющие половыех различия течения инфекционно-воспалительных процессов, исследуются в основном на экспериментальных моделях, на которых показано, что

уровень половых гормонов коррелирует с тяжестью и исходами заболевания (Angele M.K. et al, 2000; Breithaupt-Faloppa A.C. et al., 2016). Показано, что активность Т-клеточного иммунного ответа на экзогенные и аллогенные антигены и аллергены более выражена у самок, чем у самцов (Bird M.D. et al., 2008). При посттравматическом кровотечении, в тимусе у самцов увеличивается количество апоптотически гибнущих лимфоцитов коркового вещества и снижениается уровень продукции ИЛ-3 тимоцитами, тогда как у самок эти изменения не выражены (Raju R. et al., 2008).

Показано, что при воспалительных заболеваниях повышение уровня 17β-эстрадиола приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов в первую очередь путем воздействия на ERα макрофагов печени и селезенки, $CD3^+$ Т-клеток, а также на ERβ альвеолярных макрофагов и мононуклеарных клеток периферической крови (Yu H.P., Chaudry I.H., 2009). 17β-эстрадиол, воздействуя на α-рецепторы, активирует MAPK, NF-κB и AP-1 сигнальные пути, что способствует усилению экспрессии провоспалительных цитокинов (Suzuki T. et al., 2007). На модели острой постгеморрагической анемии, приводящей к повреждениям печени и легких, показано, что эстрогены приводят к снижению уровня TLR4-зависимой продукции провоспалительных цитокинов в легких и печени (Frink M. et al., 2007). Также выявлено, что 17β-эстрадиол подавляет продукцию специфического фактора ингибирования миграции макрофагов легких и тем самым играет роль в развитии воспалительных процессов при сепсисе (Suzuki T. et al., 2007).

Снижение концентрации мужских половых гормонов в сыворотке крови у самцов в результате кастрации приводит к более выраженной активации иммунной системы при экспериментальной постгеморрагической анемии. Показано, что одним из иммуномодулирующих эффектов тестостерона и 5α-дигидротестостерона является супрессия пролиферативной активности спленоцитов и продукции ими ИЛ-2 и ИЛ-3 (Angele M.K. et al., 2001; Zolin S.J. et al., 2015). Введение самцам антагониста тестостерона флутамида оказывает положительное влияние на течение посттравматического сепсиса, что проявляется в поляризации иммунного ответа по Тх1-типу, улучшении сократимости кардиомиоцитов, увеличении сердечного выброса и активации функций гепатоцитов (Hildebrand F. et al., 2006). Mayr S. и соавт. (2006) выявили, что тестостерон снижает уровень экспрессии рецепторов MHC II класса на перитонеальных макрофагах и клетках селезенки, что нивелируется при кастрации.

Дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С) – стероидный гормон, который является как предшественником, так и промежуточным соединением в процессе метаболизма и эстрогенов, и андрогенов. На экспериментальных моделях показано, что ДГЭА-С восстанавливает активность спленоцитов и макрофагов, поляризует иммунный ответ по Тх1-типу и снижает смертность самцов от посттравматического сепсиса (Angele M.K. et al, 1998). Авторы считают, что такой эффект у самцов достигается за счет превращения ДГЭА-С в эстрогены. У самок ДГЭА-С,

напротив, превращается в тестостерон и оказывает аналогичное андрогенам влияние. Однако другими исследованиями показано, что у самок в фазе проэструса ДГЭА-С активирует клетки селезенки и макрофаги и снижает продукцию противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (Knöferl M.W. et al., 2002). Подобное действие характерно и для метаболита ДГЭА-С – андростендиола (Suzuki T. et al., 2007).

Таким образом, в экспериментальных исследованиях показано, что женские и мужские стероидные половые гормоны по-разному влияют на функциональную активность иммунной системы при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Эстрогены активируют иммунную систему, в то время как тестостерон является иммуносупрессором. Как эстрогены, так и андрогены модулируют активность макрофагов селезенки и продукцию ими цитокинов. Дигидротестостерон ингибирует поляризацию иммунного ответа по Тх1-типу, тогда как 17β-эстрадиол активирует клеточно-опосредованный и гуморальный иммунный ответ (Angele M.K. et al, 2001). Иммуномодулирующее действие половых гормонов, концентрации которых различаются у мужчин и женщин репродуктивного возраста, могут определять наличие половых различий встречаемости и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний. Однако, несмотря на данные, полученные в экспериментах, результаты клинических исследований противоречивые. Одни авторы выявляли половые различия течения воспалительных заболеваний и сепсиса (George R.L. et al., 2003; Endo Y. et al., 2005; Davis D.P. et al., 2006), тогда как другие не обнаруживали полового диморфизма (Coimbra R. et al., 2003; Frink M. et al., 2007). Offner P.J. и соавт. (1999), исследовав свыше 500 пациентов, не обнаружили достоверных различий по показателям смертности у мужчин и женщин. Однако они установили, что мужчины более подвержены риску развития внутрибольничных инфекций. В других исследованиях выявлена бóльшая склонность к развитию посттравматической пневмонии у мужчин (Gannon C.J. et al., 2004). У женщин реже развивается сепсис; кроме того, у них по сравнению с мужчинами ниже показатели заболеваемости и смертности после перелома бедренных костей (Endo Y. et al., 2005; Zhu Z. et al., 2017). Rappold J.F. и соавт. (2002) выявили, что женщины более подвержены риску развития респираторного дистресс-синдрома, пневмонии и посттравматического сепсиса, чем мужчины. Таким образом, женский пол является фактором риска развития смертельных осложнений при указанных заболеваниях (Napolitano L.M. et al., 2001). Несмотря на многочисленные исследования, демонстрирующие устойчивость женского организма к инфекциям и развитию органной патологии, течение хронических заболеваний у женщин более тяжелое, чем у мужчин (Keselman A., Heller N., 2015).

Возможными причинами таких противоречий могут быть различия, связанные с возрастом, неоднородными группами исследований, этнической принадлежности, терапии сопутствующих заболеваний. Возраст и гормональный фон в момент получения травмы имеют

немаловажное значение и могут определять половые различия течения посттравматических воспалительных заболеваний. Средний возраст наступления менопаузы у женщин в США составляет 50 лет (Nichols H.B. et al., 2006). В этот период резко снижается уровень эстрогенов на фоне увеличения содержания тестостерона (Nichols H.B. et al., 2006). В большинстве клинических исследований не учитывается возраст пациенток и их репродуктивный статус, что приводит к противоречивым результатам, не соответствующим экспериментальным, которые проводятся на репрезентативных группах.

1.5 Молекулярные механизмы, морфологические и иммунологические изменения при системных воспалительных реакциях

Системные воспалительные реакции наиболее выражены при ССВО - наиболее тяжелом проявлении инфекционных и неинфекционных воспалительных заболеваний. Системные воспалительные реакции сопровождаются гиперпродукцией провоспалительных цитокинов и медиаторов и проявляются гипер- или гипотермией, тахикардией, тахипноэ, лейкоцитозом или лейкопенией (Reinhart K. et al., 2010; Faix J.D., 2013; Grégoire M et al., 2017).

ССВО развивается в ответ как на инфекционные агенты, так и при неинфекционных заболеваниях, а критерии ССВО присутствуют у многих госпитализированных пациентов. Инфекционные агенты – компоненты стенки бактерий, такие как липополисахариды, пептидогликаны, зимозан, липотейхоевая кислота и др., взаимодействуя с толл-подобными рецепторами TLRs - TLR2, TLR4 и цитозольными NLRs (**n**ucleotide **o**ligomerization **d**omains (Nod)-like receptors) – NOD1 и NOD2, вызывают гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, активируя NF-kB сигнальный путь (Chen Z. et al., 2017; Wang P. et al., 2017). При неинфекционных заболеваниях, например, травмах и ожогах, происходит повреждение клеточных мембран, активация продукции фосфолипазы 2 и циклооксигеназ, что приводит к синтезу простагландинов, лейкотриенов и развитию воспалительной реакции (Jaffer U. et al., 2010). В свою очередь, образующиеся эндогенные молекулы – алармины (амфотерин, белки теплового шока, белки семейства S100 и др.), активируют продукцию провоспалительных цитокинов через TLR2, TLR4, GPCR (рецепторы, сопряженные с G-белком) и др. рецепторы (рис. 1.4). В конечном итоге, нарушается баланс синтеза про- и противовоспалительных цитокинов: гиперпродукция провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8) активирует синтез внутриклеточных каспаз, разрушающих ДНК клеток и активирующих апоптоз, что приводит к развитию ССВО, который сопровождается развитием синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, респираторного дистресс синдрома, дистрофическими изменениями в печени, сердечно-сосудистой недостаточностью (Jaffer U. et al., 2010).

В 26% случаев ССВО приводит к развитию сепсиса, а в 18% – тяжелого сепсиса (Horeczko T. et al., 2014), который сочетается с полиорганной недостаточностью, гипотензией и

гипоперфузией (Minderhoud T.C. et al., 2017). Заболеваемость сепсисом очень высокая и достигает 18-20 млн случаев в год в мире, а его распространенность растет в большинстве развитых стран, в том числе и в России (Tozzi J., 2017). По данным ВОЗ сепсис стоит на третьем месте в списке основных причин смертности взрослого населения в мире (4-6 млн чел/год). На лечение больных сепсисом в США ежегодно затрачиваются до 17 млрд долларов в год (Torio C.M., Andrews R.M., 2011). По сравнению с грамположительным сепсисом грамотрицательный сепсис развивается чаще (грамотрицательный – 62,2% и грамположительный – 46,8%) и показатели смертности от него в 2-3 раза выше (Mayr F.B. et al., 2014).

Одними из самых распространенных бактерий, приводящих к развитию грамотрицательного сепсиса, является *E.coli* (Mayr F.B. et al., 2014). *E. coli* –представитель нормальной микрофлоры человека (Yang K.H., Lee M.G., 2008), мембранным компонентом которого является ЛПС – основной инициатор развития сепсиса, состоящий из полисахаридного звена (О-антиген), карбогидратного ядра и липидной части (липид А) (Opal S. M., Huber C. E., 2002; Shukla P. et al., 2014). Молекулы ЛПС нетоксичны, пока они находятся в составе клеточной стенки бактерий.

Под действием различных факторов (лизис бактерий, ингибиторы синтеза белка) может происходить переход ЛПС в свободное, не связанное со стенкой бактерии состояние, что приводит к развитию воспалительного ответа в основном за счет его наиболее токсичной составляющей – липида А. Во внутрисосудистом пространстве свободный ЛПС формирует комплекс с липополисахарид-связывающим белком (ЛСБ), который относится к белкам острой фазы I типа и взаимодействует с макрофагами (Blomkalns A.L. et al., 2011). Комплекс ЛПС-ЛСБ опосредует эффекты через рецептор CD14 макрофагов (мембранный ЛПС-связывающий рецептор), MD2 и TLRs. CD14 либо экспрессируется на плазматической мембране клеток системы врожденного иммунитета, в том числе на мембране макрофагов, либо присутствует в растворимом виде во внеклеточном пространстве (Lévêque M. et al., 2017).

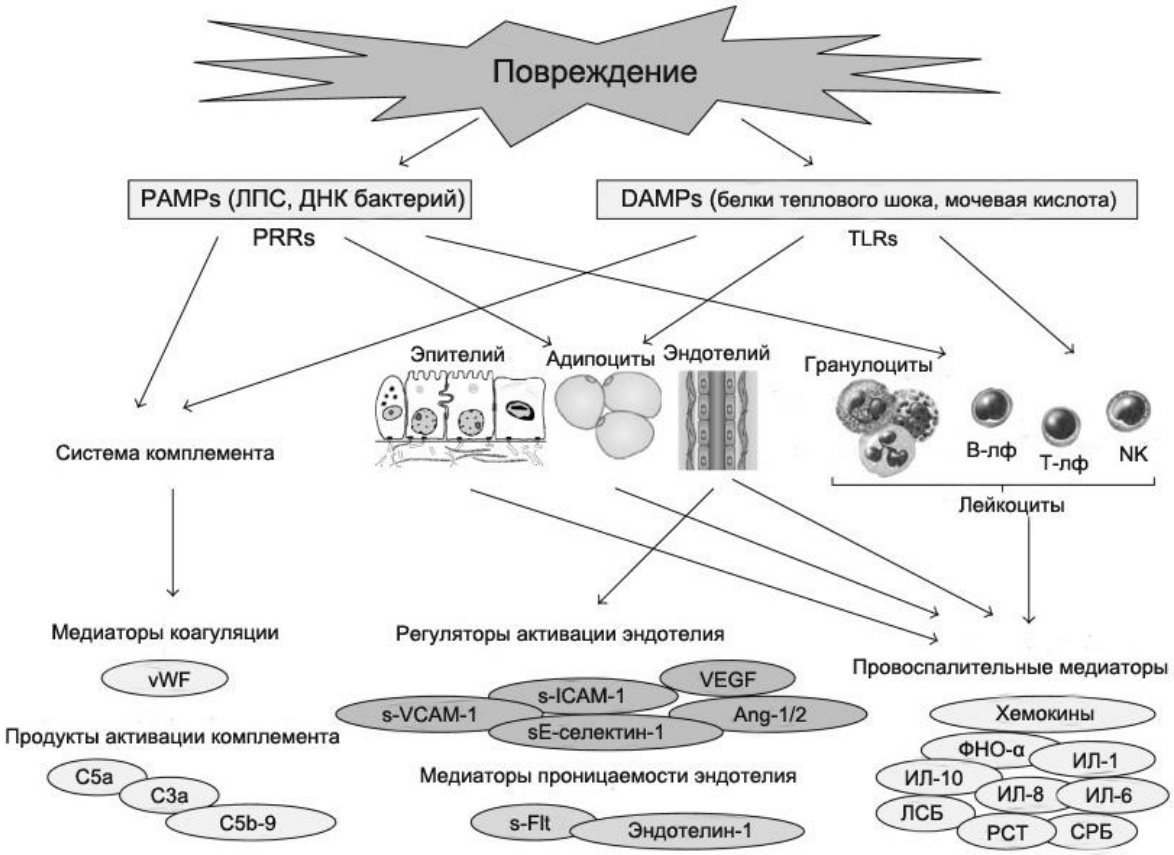


Рис. 1.4. Схематическое изображение процессов, приводящих к продукции основных медиаторов и цитокинов воспаления. В результате инфекционного и неинфекционного повреждения повышается уровень молекулярных паттернов – PAMPs (pathogen associated molecular pattern), патоген-ассоциируемых молекул, и DAMPs (damage associated molecular pattern), молекул, ассоциированных с повреждением. PAMPs и DAMPs распознаются паттерн-распознающими рецепторами PRRs – TLR и NLR, что приводит к активации провоспалительного каскада реакций: продукции большого количества провоспалительных цитокинов, увеличению проницаемости эндотелия, активации воспалительной инфильтрации, коагуляции и системы комплемента. Одновременно с провоспалительными цитокинами идет продукция противовоспалительных медиаторов, включая ИЛ-10, TGF-β и ИЛ-4, действие которых направлено на подавление системной воспалительной реакции (Pomara C. et al., 2016)

Ключевым звеном передачи сигнала при грамотрицательной инфекции является активация TLR4 на поверхности мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, дендритных клеток, а также на эндотелиоцитах, гепатоцитах и эпителиальных клетках кишечника, респираторного и урогенитального трактов (Pålsson-McDermott E.M., O'Neill L.A., 2004). ЛПС является ключевым активирующим лигандом для TLR4, по строению гомологичного рецептору к ИЛ-1. Взаимодействие TLR4 и ЛПС инициирует реакции врожденного иммунитета и воспаления, тогда как TLR2 ответственен за распознавание грамположительной микрофлоры (Seeley E.J. et al., 2012; Calil I.L. et al., 2014).

Пептидогликаны, в том числе мурамилдипептид, - компоненты клеточных стенок как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, распознаются внутриклеточными рецепторами NLR – NOD1 и NOD2, которые экспрессируются Т-, В-лимфоцитами, макрофагами, дендритными и тучными клетками (Лебедева Е.С. и соавт., 2017; Al Nabhani Z. et al., 2017). Активация пептидогликанами NLR рецепторов приводит к запуску NF-kB и MAPK-зависимой продукции провоспалительных цитокинов (Лебедева Е.С. и соавт., 2017; Theivanthiran B. et al., 2012).

Запуск как TLR, так и NOD-зависимых внутриклеточных сигнальных путей приводит к активации киназы I-κB, что влечет за собой транслокацию через ядерную мембрану фактора транскрипции NF-κB, инициирующего транскрипцию генов и экспрессию цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α, реализующих воспалительный ответ (Medzhitov R. et al., 1997; Ono Y., Sakamoto K., 2017). NF-κB является ключевым агентом, необходимым для полноценной экспрессии ряда провоспалительных медиаторов, к которым относятся цитокины, адгезивные молекулы, хемокины и т.д. Индукция рецепторов, локализующихся на поверхности клеток различных органов и систем, с участием ФНО-α, ИЛ-1 и ЛПС приводит к активации путей внутриклеточной передачи сигналов, когда при участии NF-κB и других факторов транскрипции повышается экспрессия генов цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и формируется ассоциированный с воспалением синдром полиорганной дисфункции (Игонин А.А. и др., 2004).

Итогом активации транскрипционного фактора NF-κB является экспрессия генов, кодирующих продукцию провоспалительных цитокинов, которые реализуют воспалительный ответ, направленный на элиминацию инфекционного агента. Однако диапазон воздействия цитокинов очень широк: их минимальные количества не препятствуют развитию инфекции, а чрезмерные вызывают интоксикацию (Авдеева М.Г., 2010). Длительная активация TLR4-сигнального пути, может привести к неконтролируемому выбросу провоспалительных, а затем и противовоспалительных цитокинов, а дисбаланс их продукции – к развитию сепсиса (Schulte W. et al., 2013).

Напротив, противовоспалительные цитокины, такие как ИЛ-10 и TGF-β, которые продуцируются макрофагами и периферическими мононуклеарными клетками при воздействии ЛПС, ингибируют развитие воспалительной реакции. Однако избыточная секреция этих противовоспалительных цитокинов может привести к иммунодефициту и последующему присоединению вторичных инфекций (Opal S.M., DePalo V.A., 2000). Большинство Тх1-цитокинов (ФНО-α, ИЛ-2, ИЛ-12, ИФН-γ) выделяются в раннюю фазу развития сепсиса, на более поздней стадии активируется продукция Тх2-цитокинов – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-13. Сдвиг иммунного ответа в сторону Тх2-типа на поздних этапах развития сепсиса может привести

к иммуносупрессии, что осложняется присоединением нозокомиальных инфекций (Perl M. et al, 2006; Rittirsch D. et al., 2008).

Число $CD4^+CD25^+$Foxp3 Т-лимфоцитов, называемых Т-регуляторными клетками, при сепсисе увеличивается, что сопровождается повышением ИЛ-10 и TGF-β (Venet F. et al., 2009). Эти изменения коррелируют со снижением пролиферативной активности $CD4^+$ лимфоцитов и повышением числа апоптотически гибнущих моноцитов (Venet F. et al., 2008).

NKT клетки составляют 1-2% среди лимфоцитов селезенки, лимфатических узлов и периферической крови, они продуцируют как про- так и противовоспалительные цитокины (ИФН-γ, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13 и TGF-β). В экспериментальных исследованиях показано, что NKT клетки могут принимать участие в развитие патологических изменений в органах-мишенях и играют роль в развитии иммунной дисфункции, поляризуя иммунный ответ по Тх2-типу (Rhee R.J. et al., 2003). С другой стороны, NKT клетки активируют нейтрофилы – клетки острой фазы воспаления (Li L. et al., 2007).

Нормализация баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов является необходимым условием успешного лечения сепсиса. Смертность от сепсиса наблюдается не только в начальную фазу развития заболевания, когда продукция провоспалительных цитокинов высокая, но и позднее, когда наступает стадия длительной иммуносупрессии и развивается «иммунный паралич» (Vincent J.L. et al., 2002; Arens C. et al., 2016).

Таким образом, активация клеток после взаимодействия ЛПС с PRRs приводит к последовательным этапам развития воспалительной реакции, являющейся основным механизмом реализации реакций врожденного иммунитета. Одним из ключевых по значимости событий является синтез провоспалительных цитокинов, которые стимулируют каскад воспалительных реакций, реализуемых различными типами клеток, в том числе лейкоцитами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами, НК-клетками, эндотелиальными и эпителиальными клетки, фибробластами и др.

1.6 Половые и возрастные особенности системных проявлений воспалительного ответа

Наиболее яркие проявления системных воспалительных реакций наблюдается при ССВО и сепсисе, которые чаще всего вызываются инфекциями. Половые различия при развитии врожденного и адаптивного иммунного ответа на бактериальные антигены наблюдаются как у животных, так и у человека. Известно, что самки менее чувствительны к развитию бактериальных инфекций и, соответственно, бактериемии и/или сепсису по сравнению с самцами, а уровень смертности от инфекционно-воспалительных заболеваний выше у самцов, чем у самок.

Восприимчивость к развитию бактериальных инфекций у человека зависит и от возраста. Уровень смертности от сепсиса у взрослых превышает 35% (Loftus T.J. et. al., 2017; Machado F.R. et al., 2017; Mohamed A.K.S. et al., 2017), тогда у новорожденных детей сепсис встречается менее часто, а показатели смертности не превышают 10% (Wu J.H. et. al., 2009). Y.-J. Shin и соавт. (2009) показано, что неонатальный сепсис чаще встречается у мальчиков. В отличие от сепсиса в репродуктивном возрасте при неонатальном сепсисе отмечается низкий уровень генерации свободных радикалов кислорода и азота, а также продукции провоспалительных цитокинов (Spasojevic I. et al., 2012). Однако в литературе отсутствуют данные, касающиеся половых различий течения инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе и сепсиса, у новорожденных.

R.S. Watson и соавт. (2003) выявлена б***о***льшая частота встречаемости ССВО и сепсиса у детей первого года жизни и снижение числа случаев развития острого сепсиса к 15-19 годам, что, по-видимому, связано с повышением уровня половых стероидов. Однако, A.K. Ghuman и соавт. (2013) не установили половых различий у детей в препубертатном периоде по показателям тяжести течения и смертности от сепсиса. L. Bindl и соавт. (2003) показано, что среди детей 1-12 месяцев жизни в 2,8 раз чаще сепсис встречается у мальчиков, чем у девочек. В возрастном периоде от 1 года до 8 лет частота встречаемости сепсиса у мальчиков снижается, и к 8-ми годам показатели не отличаются от таковых у девочек. В литературе в основном представлены данные о половых различиях частоты развития, тяжести течения и показателях смертности от сепсиса у детей в период полового созревания (Adrie C. et al., 2007). В пубертатном периоде, характеризующемся выраженными различиями содержания половых гормонов, у мальчиков отмечается более высокая частота встречаемости сепсиса (Ghuman A.K. et al., 2013), тогда как в препубертатном периоде и пожилом возрасте половые различия в показателях уровня смертности от сепсиса не обнаружены, что может быть связано с низким уровнем половых гормонов в сыворотке крови (Bindl L. et al., 2003).

Большинство как экспериментальных, так и клинических исследований, касающихся половых различия течения ССВО и сепсиса, проведены на особях репродуктивного возраста. Согласно данными клинических исследований женщины менее восприимчивы к развитию бактериальных инфекций по сравнению с мужчинами (Angele M.K. et al., 2006; Klein S.L., Flanagan K.L., 2016). Показатель выживаемости при сепсисе у женщин составляет 74%, а у мужчин – 31% (Schröder J. et al., 1998; Knöferl M.W. et al., 2002), а уровень заболеваемости сепсисом у женщин в постменопаузе повышается по сравнению с женщинами репродуктивного возраста (Beery T.A., 2003).

По данным многочисленных экспериментальных исследований эффективность распознавания бактериальных эндотоксинов и интенсивность развития воспалительного

иммунного ответа зависят от пола (Beery T.A., 2003; Rettew J.A. et al., 2008). Показано, что сепсис, бактериемия и эндотоксинемия чаще возникают и тяжелее протекают у самцов по сравнению с самками (Angele M.K. et al., 2006). Самцы мышей более восприимчивы к инфекции, вызываемой *Mycobacterium marinum*, чем самки (Yamamoto Y. et al., 1991). Введение андрогенов мышам способствует повышению их восприимчивости к развитию инфекции, вызываемой *M. marinum,* а введение эстрогенов оказывает противоположное влияние (Erikoglu M. et al., 2005). M.K. Angele и соавт. (2000) показали, что риск развития посттравматического сепсиса выше у самцов, чем у самок. Известно также, что по сравнению с самками самцы более восприимчивы к развитию посттравматического сепсиса (Angele M.K. et al., 2000; George R.L. et al., 2003). Полимикробный сепсис у самок крыс Вистар протекает в более легкой форме, чем у самцов, а показатели выживаемости животных составляют 60 и 25%, соответственно (Zellweger R. et al., 1997). Овариэктомия приводит к повышению уровня смертности самок от сепсиса (Knöferl M.W. et al., 2002).

Половой диморфизм тяжести течения сепсиса может быть обусловлен различиями уровня циркулирующего в крови эндотоксина. Erikoglu M. и соавт. (2005) показали, что уровень эндотоксина у самок крыс с экспериментально индуцированным сепсисом значительно ниже, чем у самцов. Кроме того, половые различия тяжести течения сепсиса могут быть связаны с уровнем продукции провоспалительных цитокинов, которые обусловливают при септическом шоке смертельный исход. В многочисленных экспериментальных исследованиях выявлены половые различия уровня циркулирующих в крови провоспалительных цитокинов при бактериальных инфекциях и септическом шоке. J. Schröder и соавт. (1998) обнаружили, что при экспериментальном сепсисе уровень ФНО-α в сыворотке крови у самцов выше, чем у самок. Этими же авторами показано, что у самок при сепсисе выше уровень противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 по сравнению с самцами. Таким образом, снижение тяжести течения сепсиса и септического шока у самок связано с уменьшением продукции провоспалительных и повышением продукции противовоспалительных цитокинов.

Стимуляция ЛПС первичной культуры моноцитов периферической крови человека и перитонеальных макрофагов крыс приводит к увеличению продукции ФНО-α, ИЛ-1β и провоспалительного хемокина CXCL10 (IP-10) этими клетками, причем у особей мужского пола эти эффекты выражены сильнее (Asai K. et al., 2001; Marriott I. et al., 2006). При экспериментально индуцированном сепсисе наблюдается увеличение уровня продукции провоспалительного ФНО-α перитонеальными макрофагами у самцов, тогда как у самок такой реакции не обнаруживается (Kahlke V. et al., 2002). ЛПС-индуцируемое воспаление легких у самцов сопровождается усиленной продукцией ФНО-α, тогда как у самок уровень этого цитокина в легких снижен (Card J.W. et al., 2006).

Существуют половые различия характера экспрессии молекул, участвующих в распознавании ЛПС. По сравнению с самками у самцов при введении ЛПС обнаруживаются более высокие показатели содержания ЛСБ в крови и уровень экспрессии TLR4 и CD14 на поверхности перитонеальных макрофагов (Marriott I. et al., 2006). Однако у самок более выражена активация сигнального пути от образования комплекса TLR4-CD14-ЛПС до запуска внутриклеточных каскадных реакций и продукции цитокинов, чем у самцов (Angele M.K. et al., 2003). Это объясняет значительное увеличение продукции противовоспалительных цитокинов у самок, в отличие от самцов, у которых преобладает продукция провоспалительных медиаторов (Angele M.K. et al., 2003). Помимо этого, выявлено супрессорное действие тестостерона на ЛПС-индуцируемую активацию p38 MAPK в макрофагах (Benten W.P. et al., 2004). Добавление тестостерона к первичной культуре макрофагов мыши снижает уровень экспрессии TLR4 на поверхности этих клеток (Rettew J.A. et al., 2008). Аналогично, овариэктомия приводит к уменьшению уровня экспрессии этого рецептора макрофагами, а также снижает содержание ЛСБ в сыворотке крови (Soucy G. et al., 2005).

В свою очередь в системе *in vitro* эстрогены не изменяют экспрессию TLR4 и CD14, но оказывают влияние на уровень экспрессии паттерн-распознающих молекул (Rettew J.A. et al., 2009). Введение эстриола животным активирует транскрипцию мРНК CD14 и ЛСБ в клетках Купфера (Nguyen-Lefebvre A.T. et al., 2015). По-видимому, половые различия активации TLRs и их корецепторов играют важную роль в развитии диморфизма иммунных реакций при сепсисе (Zheng R. et al., 2006; Klein S.L. et al., 2015).

Влияние половых гормонов на восприимчивость и течение бактериальных инфекций изучается на моделях орхи- и овариэктомии, при которых достигается резкое снижение уровня половых гормонов в сыворотке крови. Показано, что овариэктомия мышей приводит к снижению выраженности активации иммунного ответа и повышению уровня смертности самок от бактериальных инфекций (*Mycobacterium avium*) и сепсиса (Knöferl M.W. et al., 2002). Введение ЛПС овариэктомированным самкам повышает уровень смертности по сравнению с интактными животными, что нивелируется введением экзогенных эстрогенов (Merkel S.M. et al., 2001; Tsuyuguchi K. et al., 2001).

По данным клинических исследований уровень заболеваемости сепсисом у женщин в постменопаузе выше, чем у женщин в репродуктивном периоде (Beery T.A., 2003). В постменопаузе ЛПС стимулирует выработку моноцитами периферической крови значительно бóльших количеств провоспалительных цитокинов по сравнению с женщинами и мужчинами репродуктивного возраста (Moxley G. et al., 2004). Снижение уровня эстрогенов в постменопаузе коррелирует с уменьшением количества лактобактерий во влагалище, что приводит к возрастанию pH до значений, благоприятных для роста и размножения патогенных бактерий

(Gupta S. et al., 2006). Тем самым, женщины в постклимактерическом периоде менее устойчивы к различным инфекциям, чем женщины в пременопаузе (Kane S.V., Reddy D., 2008).

В клинических исследованиях показано, что при сепсисе у мужчин и женщин наблюдается увеличение уровня циркулирующих в крови эстрогенов (эстрона и 17β-эстрадиола) и прогестерона (Dossett L.A. et al., 2008). Однако, выходящее за пределы физиологических концентраций повышение уровня этих гормонов коррелирует с возрастанием уровня смертности от сепсиса (Dossett L.A. et al., 2008; Feng J.Y. et al., 2014).

Половой диморфизм активации различных иммуннокомпетентных клеток при антигенной стимуляции также зависит от мозаичности Х-хромосомы у самок. Гетерозиготная клеточная мозаичность представляет собой уникальный случай, характерный только для самок, вследствие случайной инактивации одной из Х-хромосом, либо материнской, либо отцовской. Тогда как самцы несут исключительно одну материнскую Х-хромосому. В экспериментальных исследованиях было показано, что мозаичность Х-хромосомы у самок обеспечивает разнообразие реакций лейкоцитов во время эндотоксинемии и может способствовать диморфизму воспалительной реакции у самок (Chandra R. et al., 2010). Кроме того, наличие рецепторов к половым гормонам на иммунных клетках у самцов и самок предполагает прямое действие андрогенов и эстрогенов на иммунокомпетентные клетки. В частности, ERβ (рецептор к эстрогенам β), экспрессирующийся на иммунных клетках играет не последнюю роль в обеспечении иммунопротекции у самок. На экспериментальных моделях системного воспаления и сепсиса было показано, что агонист ERβ рецепторов – WAY-202196, снижает проницаемость гастроинтестинального барьера и повышает выживаемость животных (Cristofaro P.A. et al., 2006).

По данным литературы частота заболеваемости сепсисом увеличивается с возрастом и становится максимальной у пожилых людей (Iskander K.N. et al., 2013). Исследование более чем 10,4 миллионов пожилых людей в США показало, что с 65 лет и старше частота встречаемости сепсиса возрастает до 65% (Martin G.S. et al., 2006).

По мнению R.A. Miller (1996) пожилой возраст является одним из факторов риска смертности от сепсиса, так как в этот период наблюдается возрастной иммунодефицит, снижение уровня обмена веществ, что определяет предрасположенность к развитию нозокомиальных инфекций (Miller RA., 1996). Однако показано, что активность нейтрофилов и НК клеток с возрастом не снижается и остается практически интактной у пожилых людей (Girard T.D., et al., 2005), а продукция провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ФНО-α, ИФН-γ, некоторых хемокинов в этот возрастной период не изменяется (Grubeck-Loebenstein B. et al., 1998.; Marik P.E., Zaloga G.P., 2001). Однако у людей пожилого возраста адаптивный иммунный ответ не выражен, о чем свидетельствует возрастное снижение общего числа Т-клеток и функциональной активности

CD8+ Т-лимфоцитов (Miller R.A., 1996; Weksler M.E. et al., 2002; Grubeck-Loebenstein B., Wick G., 2002; Fry T.J., Mackall C.L., 2002).

Несостоятельность адаптивного звена иммунного ответа у пожилых людей может определять высокую частоту развития вторичных инфекций у них по сравнению с людьми репродуктивного возраста (Ely E.W. et al., 2003). С другой стороны, люди пожилого возраста чаще подвергаются инвазивным методам лечения, например, катетеризации, что повышает вероятность присоединения инфекционных агентов и развития сепсиса (Maki D.G. et al., 1997; Rajagopalan S., Yoshikawa T.T., 2001).

Таким образом, частота возникновения и тяжесть клинических проявлений инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний у мужчин и женщин различаются. Показано, что интенсивность гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответа у женщин выше по сравнению с мужчинами. По данным клинических и экспериментальных исследований особи мужского пола более восприимчивы к развитию заболеваний, связанных с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, что может быть обусловлено иммуносупрессивным влиянием высоких концентраций андрогенов. Известно, что андрогены в определенных концентрациях повышают восприимчивость к различным бактериальным инфекциям, а эстрогены, наоборот, определяют устойчивость к их развитию. Однако данные о половых различиях течения системных воспалительных реакций у особей в период новорожденности и препубертатном периоде немногочисленны и противоречивы.

Заключение

Таким образом, по данным литературы функциональная активность иммунной системы как в норме, так и при воспалительных процессах определяется различиями половых хромосом в кариотипе у самцов и самок, так и содержанием половых гормонов в сыворотке крови. Эффекты половых стероидных гормонов зависят от многих факторов, включая возраст, пол, иммунный статус, фазу эстрального/менструального цикла, индивидуальные особенности, терапию заболеваний и др. Даже внутри одного вида половые стероиды могут оказывать совершенно противоположное влияние на морфофункциональное состояние иммунной системы, инициируя различные сигнальные пути и патогенетические механизмы при системном воспалении. Основные сигнальные внутриклеточные каскады, активируемые эстрогенами и андрогенами, достаточно хорошо изучены в системе *in vitro*, тогда как на системном уровне активация иммунной системы определяется взаимосвязью механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Исследованиям иммуномодулирующих свойств половых гормонов в системе *in vivo* посвящено недостаточное количество работ, что затрудняет выявление механизмов, посредством которых они влияют на состояние иммунной системы при тех или иных

инфекционно-воспалительных заболеваниях, при которых манифестируют системные проявления воспалительного ответа.

По результатам экспериментальных и клинических исследований различия в восприимчивости и течении таких заболеваний как ССВО и сепсис, при которых наиболее выражены системные воспалительные реакции, у самцов/мужчин и самок/женщин зависят от уровня половых гормонов. Тестостерон повышает чувствительность к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний, тогда как эстрогены, наоборот, снижают такую чувствительность. Показано, что андрогены при эндотоксинемии ограничивают продукцию провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками, в то время как влияние эстрогенов на развитие иммунного ответа неоднозначно: женские половые гормоны способны как активировать, так и подавлять различные типы иммунного ответа. Возможный механизм данных эффектов заключается в непосредственном влиянии половых стероидов на экспрессию PRRs, включая TLR4 и его корецепторы, что регулирует передачу сигнала от этих рецепторов к NF-kB с последующей продукцией в основном провоспалительных цитокинов. Несмотря на то, что выявлены изменения в экспрессии аффекторных и эффекторных молекул под действием половых гормонов, парадоксальные эффекты восприимчивости самцов и самок к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний, как и особенности развития системных проявлений воспалительного ответа, остаются неизученными.

Исследования, посвященные половым особенностям системных воспалительных реакций у новорожденных и детей препубретатного периода, фрагментарны и немногочисленны. Как клинические, так и экспериментальные работы, касающиеся половых различий особенностей течения неонатального и препубертатного ССВО и сепсиса, в литературе отсутствуют.

Поэтому необходимо проведение исследования половых различий и возрастных особенностей морфологических проявлений и механизмов развития системных воспалительных реакций, так как это позволит разработать новые подходы к эффективной профилактике и терапии ССВО с учетом возраста и пола.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследования проведены на 379 крысах Вистар обоего пола трех возрастных групп: новорожденные - 2 дня (10-15 гг), препубертатного периода - 10 дней (20-25 гг), половозрелые - 3 месяца (220-270 гг) (Таблица 2.1). Половозрелые животные были получены из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Крыс содержали в виварии ФГБНУ НИИМЧ при температуре 20±2°С, относительной влажности 60% и естественном освещении по 7 особей в клетке. Животные имели свободный доступ к пище и воде. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №5 от 12.03.2008 г.). Все эксперименты были выполнены в осенне-зимний период. Для разведения с целью формирования групп двухдневных и десятидневных крыс использовали 30 половозрелых животных (20 самок и 10 самцов). Продолжительность беременности у самок составляла 21–23 сут. Потомство одной самки было представлено 6-8 особями.

Выбор возрастных групп животных определялся уровнем половых гормонов и морфофункциональным состоянием яичников и семенников. При морфологическом исследовании у двухдневных самок в яичниках выявлялись примордиальные фолликулы, которые располагались в корковом слое, окружающий яйцеклетку фолликулярный эпителий был плоский. В семенниках двухдневных крыс Вистар были выявлены просперматогонии. По данным литературы первые 4 дня после рождения у крыс является периодом новорожденности и характеризуется высоким уровнем эстрогенов в сыворотке крови (Берштейн Л.М., 1998). Иммунная система новорожденных особей находится в состоянии физиологического иммунодефицита, который обусловлен функциональной незрелостью иммунокомпетентных клеток (Chirico G., 2005).

В яичниках 10-дневных крыс появлялись вторичные растущие фолликулы, в которых фолликулярный эпителий был кубическим и образовывал 2-3 ряда. У самцов этой возрастной группы по сравнению с новорожденными животными изменений морфофункционального состояния семенников выявлено не было.

Определение фазы эстрального цикла. Фазу эстрального цикла у самок крыс Вистар контрольной группы определяли по влагалищным мазкам. Мазки фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза. В мазках из влагалища оценивали соотношение различных клеточных элементов. У самок в фазе диэструса в мазках преобладали лейкоциты. В фазе проэструса в мазках клеточные элементы были представлены исключительно эпителиальными клетками промежуточного типа, они были примерно одинаковых размеров и содержали ядра. У

самок в фазе эструса основную массу клеточных элементов в мазках из влагалища составляли клетки поверхностного типа - безъядерные, ороговевшие чешуйки. В фазе метэструса в мазках были выявлены эпителиальные клетки поверхностного и промежуточного типа и лейкоциты. На основании цитологического исследования влагалищных мазков были отобраны самки с устойчивым четырехдневным эстральным циклом и из них сформированы 2 группы: в фазе проэструса и диэструса. По данным литературы эти фазы различаются по уровню половых гормонов (эстрадиола и прогестерона) в сыворотке крови (Bebo B.F. et al., 2001). Исследования половых различий иммуноморфологии системного воспаления всегда проводили на самках в фазу проэструса. Для оценки влияния колебаний половых гормонов в течение эстрального цикла ЛПС вводили самкам в две фазы: проэструса, в которую наблюдается высокое содержание эстрадиола, и диэструса, в которой высокая концентрация прогестерона.

Кастрация. С целью создания моделей гипоандрогенемии и посткастрационной менопаузы проводили хирургическую билатеральную орхи- и овариоэктомию половозрелых крыс Вистар. Кастрацию осуществляли под эфирным наркозом. Через 52 дня после хирургической кастрации животным моделировали системный воспалительный ответ (СВО). Выбор такого отдаленного срока (52-е сут) после кастрации объясняется тем, что в этот период развиваются устойчивые морфологические изменения в гипофизе – увеличивается число и размер базофилов передней доли, в них появляются крупные вакуоли (Алешин Б.В., 1971; Purves H., Griesbach W., 1957). При этом наблюдается увеличение выработки ЛГ-рилизинг гормона за счет снижения способности гипоталамуса метаболизировать тестостерон, что в свою очередь приводит к повышению секреции ЛГ гипофизом (Caraty A., Locatelli A.,1988; Resko J.A. et al., 2000).

Моделирование системного воспалительного ответа (СВО). С целью изучения особенностей реакции иммунной системы и органов-мишеней у самцов и самок крыс Вистар разных возрастных групп (табл. 1) при СВО животным внутрибрюшинно вводили ЛПС *E. coli* O26:B6 (Sigma).

Доза вводимого ЛПС зависела от возраста животных и составила для 2-х и 10-дневных крыс 15 мг/кг, а для половозрелых 1,5 и 15 мг/кг. Доза ЛПС 1,5 мг/кг при внутрибрюшинном введении половозрелым крысам вызывает патологические изменения во внутренних органах (Мишнев О.Д. и соавт., 2003). Предварительно в эксперименте было показано, что при введении десятидневным крысам Вистар ЛПС в дозе, использованной для моделирования СВО у половозрелых особей, – 1,5 мг/кг, отсутствовали морфологические проявления СВО в органах-мишенях: дистрофические изменения и некрозы в печени, а в легких интраальвеолярный отек и инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами. При введении ЛПС

десятидневным крысам в более высокой дозе – 15 мг/кг в печени и легких были выявлены морфологические признаки СВО.

Животных из эксперимента выводили передозировкой диэтилового эфира. Сроки выведения животных из эксперимента определяли на основании данных литературы с учетом динамики развития патоморфологических изменений в органах-мишенях (Писарев В.Б. и соавт., 2008; Диатроптов М.Е., 2011) и содержания в сыворотке крови половых гормонов. Морфологические и иммунологические проявления СВО у половозрелых крыс исследовали на 1-е и 7- е сут, так как по данным литературы на 1-е сут после введения ЛПС развиваются выраженные патологические изменения органов-мишеней (Писарев В.Б. и соавт., 2008), на 7-е сутки острый воспалительный процесс претерпевает обратное развитие, а также может прогрессировать (Диатроптов М.Е., 2011). Исследование проявлений СВО у крыс в препубертатном периоде проводили на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС, в связи с увеличением содержания эстрадиола в крови у самок на 17-е сут после рождения. Новорожденных крыс с СВО выводили из эксперимента на 1-е сут.

Моделирование СВО у самцов и самок на фоне хирургической кастрации осуществляли через 52 дня после орхи- и овариэктомии путем внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг. Кастрированных крыс с СВО выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Животным контрольных групп внутрибрюшинно вводили физиологический раствор.

Материалы исследования. Для гистологического исследования проводили забор легких, печени, тимуса, селезенки. Кровь забирали из вен области шеи, центрифугировали при 200g в течение 20 мин, отбирали сыворотку, замораживали ее при температуре -70°С и хранили в течение 2 мес.

Гистологические методы. Органы иммунной системы и печень фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 ч, легкие – в жидкости Карнуа в течение 2 ч., проводили по спиртам восходящей концентрации (70°, 80°, 96°, 100°) и хлороформу, заливали в парафин, изготовляли гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином.

Морфометрические методы. В гистологических срезах под световым микроскопом с помощью сетки Г.Г. Автандилова (1973) оценивали объемную плотность функциональных зон тимуса и селезенки. Ширину субкапсулярной зоны тимуса измеряли в микрометрах в программе Adobe Photoshop CS4 на изображениях, полученных при ув. 400. Подсчет проводили на 5-ти срезах органа (5 полей зрения на каждый срез).

На гистологических препаратах легких проводили подсчет количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в стандартном поле зрения (25 000 мкм^2).

На гистологических препаратах печени «слепым» полуколичественным методом оценивали выраженность дистрофических изменений гепатоцитов по 5-балльной шкале:

0 баллов – дистрофических изменений нет;

0,5 балла – дистрофические изменения менее 1/3 гепатоцитов;

1 балл – дистрофические изменения 1/3 гепатоцитов;

2 балла – дистрофические изменения 2/3 гепатоцитов;

3 балла – дистрофические изменения более 2/3 гепатоцитов;

4 балла – дистрофические изменения с очаговыми некрозами;

5 баллов – тотальные некротические изменения гепатоцитов.

Площадь некрозов в печени оценивали в программе Image Scope M в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290. Измерения проводили на всей площади гистологического препарата, результаты выражали в мкм^2.

Иммунофлуоресцентный метод

Изготовляли криостатные срезы селезенки, фиксировали их в ацетоне. На срезы наносили антитела к CD45 (маркер В-лимфоцитов крысы, «eBioscience»), коньюгированные с FITC (fluorescein isothiocyanate) в титре 1:50, разведенные в блокирующем растворе (PBS с 1% BSA, 0.05% Triton X-100). Срезы инкубировали ночь при 4°С во влажной камере. Препараты заключали под покровное стекло в среду для заключения Prolong Gold with DAPI (Thermofisher, P36931), хранили при -20°С. Позитивным контролем служили препараты печени.

Выделение клеток селезенки и их культивирование

С целью исследования уровня продукции цитокинов выделяли клетки селезенки. Выделенные клетки центрифугировали в среде 199 в течение 10 минут при 1000 об/мин. Эритроциты лизировали дистиллированной водой. Количество жизнеспособных ядросодержащих элементов в 1 мл суспензии определяли при подсчете в камере Горяева. Жизнеспособность клеток составляла 97–98%. Рабочую суспензию клеток готовили на полной ростовой среде для культивирования клеток селезенки. Для индукции синтеза и секреции цитокинов лимфоцитами суспензию клеток селезенки в концентрации 1×10^6/мл культивировали 24 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением конканавалина А (конечная концентрация 5 мкг/мл) в 24-луночных культуральных планшетах в CO_2-инкубаторе (5% CO_2, 37°С). Среда для культивирования состояла из RPMI 1640 (ПанЭко) с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сывороткой, 2мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. По окончании инкубации отбирали супернатанты, которые хранили в течение 1 месяца при температуре -70°С.

Иммуноферментный анализ. В сыворотке крови методом твердофазного ИФА оценивали содержание половых гормонов - общего и свободного тестостерона (DBC, Канада; DRG, Германия), эстрадиола (Adaltis, Италия; DBC, Канада; Cusabio, Китай) и прогестерона (DBC, Канада; DRG, Германия), кортикостерона (Assay designs, США; IBL, Германия),

неоптерина (IBL, Германия) и TGF-β (eBiosience, Австрия). С помощью хромогенного LAL-теста определяли уровень эндотоксина (HBT, США).

В культуральной жидкости клеток селезенки с помощью тест-систем фирмы «eBioscience» (Австрия) определяли концентрации: интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-12), фактора некроза опухолей альфа (ФНО-α), интерферона гамма (ИФН-γ).

Биохимические методы. С целью оценки функциональных изменений печени в сыворотке крови определяли активность индикаторных ферментов аспартатаминотрансферазы (АсАТ) (КФ 2.6.1.1) и аланинтрансферазы (АлАТ) (КФ 2.6.1.2). Использовали наборы реактивов “DiaSys” (“Diagnostic Systems” Gmbh, Германия).

Метод проточной цитофлуориметрии. Для определения количества апоптотически гибнущих клеток в тимусе суспензию клеток в концентрации 10^6/мл метили антителами фирмы «eBioscience», конъюгированными с PE (phycoerythrin, фикоэритрином): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов) (Annexin V FITC Kit, Beckman Coulter). Затем суспензию клеток инкубировали с аннексином (Annexin), конъюгированным с FITC (fluorescein isothiocyanate, флуоресцин изотиоцианат), и пропидий иодидом (PI). Проводили флуороцитометрическую оценку апоптотически гибнущих клеток (Annexin+PI-) на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter»).

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у животных экспериментальных групп определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter»). Абсолютное количество лейкоцитов и лимфоцитов в крови подсчитывали с помощью гематологического анализатора Celltac alpha MEK-6400 («Nihon Kohden»). В качестве антикоагулянтов при заборе цельной крови использовали ЭДТА (5 мг/мл) или гепарин (50 ЕД/мл).

Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций лимфоцитов использовали антитела фирмы «eBioscience», конъюгированные с FITC (fluorescein isothiocyanate) или PE (phycoerythrin): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов); anti-Rat CD4 (маркер Т-хелперов); anti-Rat CD8 (маркер цитотоксических Т-клеток); anti-Rat CD45R (маркер В-лимфоцитов); anti-Rat CD25 (маркер активированных Т-клеток); anti-Mouse/Rat Foxp3 (маркер регуляторных Т-клеток). Лизис эритроцитов в образцах цельной крови проводили с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution («Beckman Coulter»). Для выявления субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов использовали набор Foxp3 Staining Buffer Set («eBioscience»). Проводили подсчет абсолютного и относительного количества лимфоцитов различных субпопуляций. Процентное содержание Т-лимфоцитов (CD3+ клеток) и В-лимфоцитов (CD45R+ клеток) периферической крови вычисляли по отношению к абсолютному количеству лимфоцитов; процентное содержание Т-хелперов (CD4+ клеток) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+ клеток) – по отношению к абсолютному количеству Т-лимфоцитов; процентное содержание активированных Т-лимфоцитов (CD25+

клеток) и регуляторных Т-лимфоцитов (CD25+Foxp+ клеток) – по отношению к абсолютному количеству Т-хелперов. В периферической крови у новорожденных самцов и самок оценивали абсолютное и относительное количество незрелых CD4+CD8+ Т-лимфоцитов.

Статистический метод. Цифровые данные проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова в программе Statistica 7.0. Сравнение данных, подчиняющихся нормальному распределению, проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента, для множественных сравнений использовали многофакторный анализ ANOVA; в противном случае – непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни для парных сравнений, метод Конновера для множественных сравнений. Для значений измеряемых показателей вычисляли медиану и интерквартильный размах (Med; 25%-75%) или среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего (M±SE). Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей вычисляли информативность каждого признака по формуле Кульбака (Копьева Т.Н., Кактурский Л.В., 1976; Дашутина Е.В., Блощицкий В.П., 2011; Капустина С.В. И соавт. 2015; Быкова В.В., Катаева А.В., 2016).

$$I_{M1-M2} = 1,0857 \cdot [(\sigma1/\sigma2)^2 + (\sigma2/\sigma1)^2 - 2 + (1/\sigma1^2 + 1/\sigma2^2) \cdot (M1 - M2)^2]$$

M – среднее;

σ – стандартное отклонение;

1 – значение контрольной группы, 2 – значение экспериментальной группы.

Значения информативности ранжировали по убыванию и выбирали первые 5 признаков с максимальной значимостью.

Таблица 2.1

Группы экспериментальных животных и их количество

Возраст, вес	**Группа наблюдения**	**Доза ЛПС, мг/кг**	**Фаза эстрального цикла (для самок)**	**Количество животных в группе**		**Масса тела, г**
				Самки	**Самцы**	
2 дня 10-15 г.	Контрольная	-	-	18	15	9-12
	ЛПС 1-е сут	15	-	40	37	
10 дней 20-25 г.	Контрольная	-	-	9	9	25-35
	ЛПС 1-е сут	15	-	13	14	
	ЛПС 4-е сут	15	-	7	8	
3 месяца 220-270 г.	Контрольная	15	Проэструс	5	10	250-300
	ЛПС 1-е сут	15	Проэструс	14	16	
3-5 мес. 220-270 г.	Контрольная	-	Проэструс Диэструс	10 9	10	220-270
	ЛПС 1-е сут	1,5	Проэструс Диэструс	15 15	10	
	ЛПС 7-е сут	1,5	Проэструс	15	10	
3 месяца + 52 дня после кастрации 300-350 г**.**	Кастрация	-	-	10	10	300-400
	Кастрация + ЛПС 1-е сут	1,5	-	15	10	
	Кастрация + ЛПС 7-е сут	1,5	-	15	10	

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 3 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ВИСТАР ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

3.1 Морфологические проявления и иммунологические нарушения при системном воспалительном ответе у новорожденных самок крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС содержание эстрадиола в сыворотке крови у самок статистически значимо снижалось. Показатели концентрация тестостерона и прогестерона в сыворотке крови животных опытной группы статистически значимо не отличались от контрольных значений (табл. 3.1.1).

Таблица 3.1.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=6)	32,90 (32,03-34,47)	1,19 (0,58-1,23)	0,24 (0,16-0,26)
ЛПС 1-е сут (n=7)	19,54 (13,22-21,75)	0,53 (0,23-0,75)	0,41 (0,24-1,16)
Статистическая значимость различий (p)	0,0006	0,0562	0,0612

Морфофункциональные изменения в легких у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При морфологическом исследовании в легких у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы в просветах бронхов выявлены единичные десквамированные эпителиальные клетки. Слизистая оболочка бронхов выстлана кубическим реснитчатым эпителием, который располагался в 1-2 ряда. Просветы альвеол и альвеолярных ходов широкие, межальвеолярные перегородки тонкие, в них выявлялись единичные нейтрофилы при увеличении 400 (рис. 3.1.1А).

На 1-е сут СВО в легких у новорожденных самок в просветах бронхов определялись зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. Эпителий был очагово десквамирован. У 8 крыс из 12 (67%) выявлен интраальвеолярный отек: просветы альвеол и альвеолярных ходов заполнены гомогенными эозинофильными массами с эритроцитами и единичными лейкоцитами (рис.

3.1.1Б). Межальвеолярные перегородки очагово утолщены. В легких развивалась воспалительная реакция, о чем свидетельствовало увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (табл. 3.1.2). Периваскулярные лимфатические щели расширены.

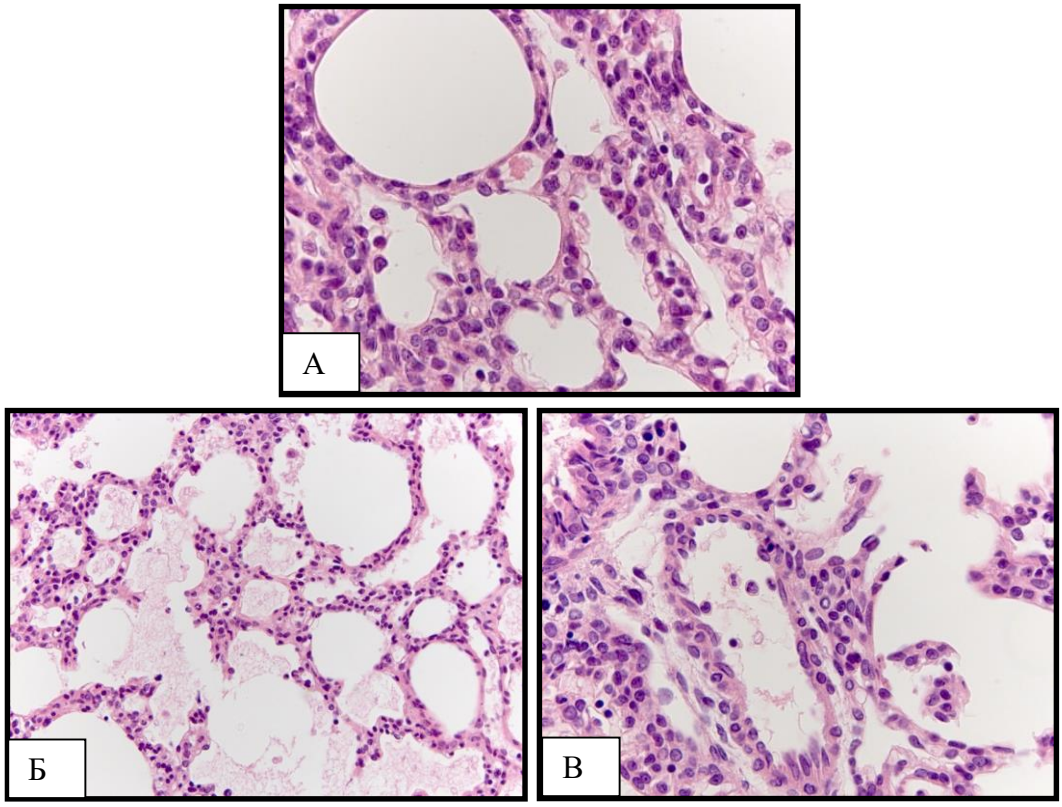


Рис. 3.1.1. Морфологические изменения в легких у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Б, В). Контрольная группа (А) – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные. 1-е сут после введения ЛПС: Б – обширные зоны интраальвеолярного отека, просветы альвеол и альвеолярных ходов заполнены эритроцитами и эозинофильными массами. В - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках и вокруг сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Б 320; А, В 640

Таблица 3.1.2

Морфометрическая характеристика легких у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (25 тыс. мкм^2)
Контрольная (n=10)	1,70 (1,00-2,40)
ЛПС1-е сут (n=9)	8,30 (7,10-8,40)
Статистическая значимость различий (p)	0,0059

Морфологические изменения в печени у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При морфологическом исследовании у новорожденных самок контрольной группы в цитоплазме гепатоцитов выявлялась мелкая базофильная зернистость, дистрофических изменений выявлено не было (рис. 3.1.2А). В соединительной ткани по ходу триад определялись единичные лимфоциты и гистиоциты. Стенки центральных вен тонкие, выстилающий их эндотелий уплощен.

При морфологическом исследовании печени на 1-е сут после введения ЛПС у самок выявлялись патологические изменения, характерные для СВО: разные по степени дистрофические изменения – от слабо выраженных до выраженных, очаговые некрозы, неравномерное полнокровие сосудов, стазы и сладжи в синусоидных капиллярах, (рис. 3.1.2Б). По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы. По ходу триад отмечались скопления лимфоцитов и гистиоцитов. При полуколичественной оценке патологических изменений в печени были выявлены статистические значимые различия между контрольной и опытной группами (табл. 3.1.3).

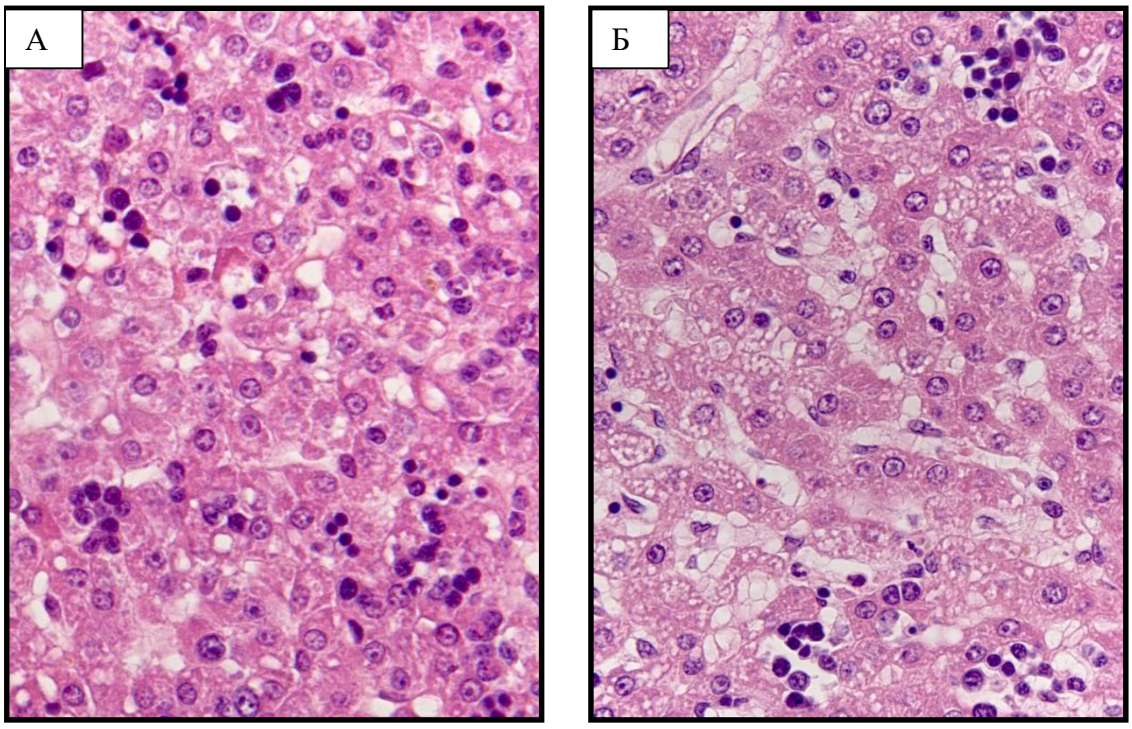


Рис. 3.1.2. Морфологические изменения в печени у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы (А) и на 1-е сут после введения ЛПС (Б). Контрольная группа (А) – дистрофических изменений нет. На 1-е сут после введения ЛПС (Б) – умеренная мелкокапельная дистрофия гепатоцитов, неравномерное полнокровие сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 640

Таблица 3.1.3

Морфометрическая характеристика печени у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)
Контрольная (n=8)	0,50 (0,00-0,75)
ЛПС1-е сут (n=9)	2,50 (1,00-3,00)
Статистическая значимость различий (p)	0,0056

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

Биохимический анализ активности ферментов печени показал, что уровень активности АлАТ в сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС, статистически значимо повышался (табл. 3.1.4). Уровень активности другого фермента - АсАТ, в эти сроки эксперимента у опытной группы новорожденных крыс Вистар не изменялся по сравнению с контрольной (табл. 3.1.4).

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови новорожденных самок крыс Вистар наблюдалось 30-кратное увеличение уровня эндотоксина (табл. 3.1.4). Тогда как содержание кортикостерона на 1-е сут развития СВО не изменялось и статистически значимо не отличалось от контрольной группы (табл. 3.1.4).

Таблица 3.1.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=8)	22 (13-41)	264 (217-422)	1,88 (0,47-3,29)	4,24 (3,88-15,25)
ЛПС 1-е сут (n=9)	107 (89-222)	512 (244-685)	56,99 (47,30-90,65)	15,11 (8,16-15,51)
Статистическая значимость различий (p)	0,0472	0,3472	0,0008	0,1531

Морфофункциональные изменения тимуса и относительное содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

В тимусе самок контрольной группы границы между корковым и мозговым веществом были нечеткими. В корковом веществе субкапсулярная зона не выявлялась, обнаруживались многочисленные делящиеся клетки (рис. 3.1.3). Среди клеток коркового вещества преобладали лимфобласты, встречалось небольшое количество зрелых лимфоцитов. Мозговое вещество тимуса было представлено диффузно рассеянными эпителиальными ретикулярными клетками и лимфоцитами.

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе у самок выявлена акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризовалась сужением коркового вещества, картиной «звездного неба» (рис. 3.1.3), окруженные светлой зоной фрагменты ядер погибших тимоцитов и макрофаги. Среди тимических телец I-II фаз развития, состоящих из 3-5 и 5-7 эпителиальных ретикулярных клеток, были тельца с накоплением кератогиалина. При морфометрическом исследовании было обнаружено сужение коркового вещества тимуса у самок с СВО по сравнению с контрольной группой (табл. 3.1.5). На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе не изменялось по сравнению с контрольной группой (табл. 3.1.6).

Таблица 3.1.5

Морфометрическая характеристика тимуса у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.
	КВ	МВ	
Контрольная (n=10)	74,39 (68,49-75,57)	25,61 (24,43-31,51)	3,22 (2,49-3,61)
ЛПС 1-е сут (n=9)	62,42 (44,84-69,50)	37,58 (30,50-55,16)	1,86 (0,83-2,44)
Статистическая значимость различий (p)	0,0141	0,0141	0,0281

Примечания. КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

Таблица 3.1.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^-$)	$CD3^+$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	2,00 (1,40-3,10)	4,90 (4,50-8,90)
ЛПС 1-е сут (n=6)	3,45 (2,50-4,50)	5,20 (3,00-8,10)
Статистическая значимость различий (p)	0,17	0,75

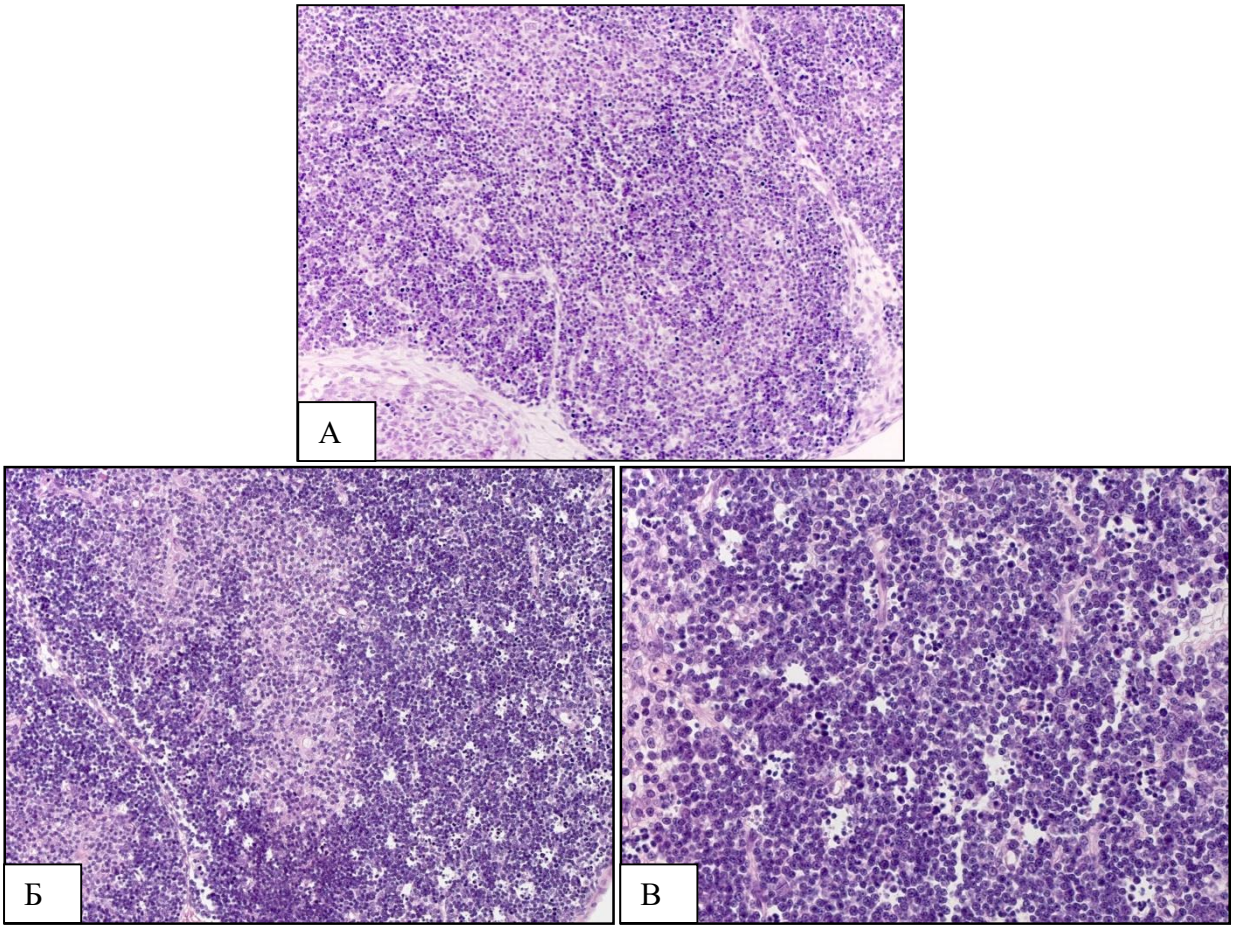


Рис. 3.1.3. Морфологическая характеристика тимуса у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы (А) и на 1-е сут после введения ЛПС (Б, В). Контрольная группа (А) – границы между корковым и мозговым веществом нечеткие. На 1-е сут после введения ЛПС (Б, В) – акцидентальная инволюция II стадии, картина «звездного неба», в корковом веществе фрагменты ядер погибших лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, Б 200; В 400

Морфофункциональные изменения селезенки у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По данным морфологического исследования в селезенке у самок контрольной группы самок белая пульпа была представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной (рис. 3.1.4). Лимфоидные узелки не выявлялись. При иммунофлуоресцентном исследовании с антителами к CD45, конъюгированными с FITC, определялись диффузно рассеянные В-лимфоциты (рис. 3.1.4). В красной пульпе обнаружены равномерно распределенные бластные клетки, форменные элементы крови, макрофаги и мегакариоциты.

На 1-е сут после введения ЛПС у самок по сравнению с контрольной группой белая пульпа была более выражена (рис. 3.1.4). В ней выявлялись фрагменты ядер лимфоцитов. При морфометрической оценке объемной доли функциональных зон селезенки у новорожденных самок крыс Вистар выявлено статистически значимое увеличение объемной доли белой пульпы по сравнению с контрольной группой (табл. 3.1.7).

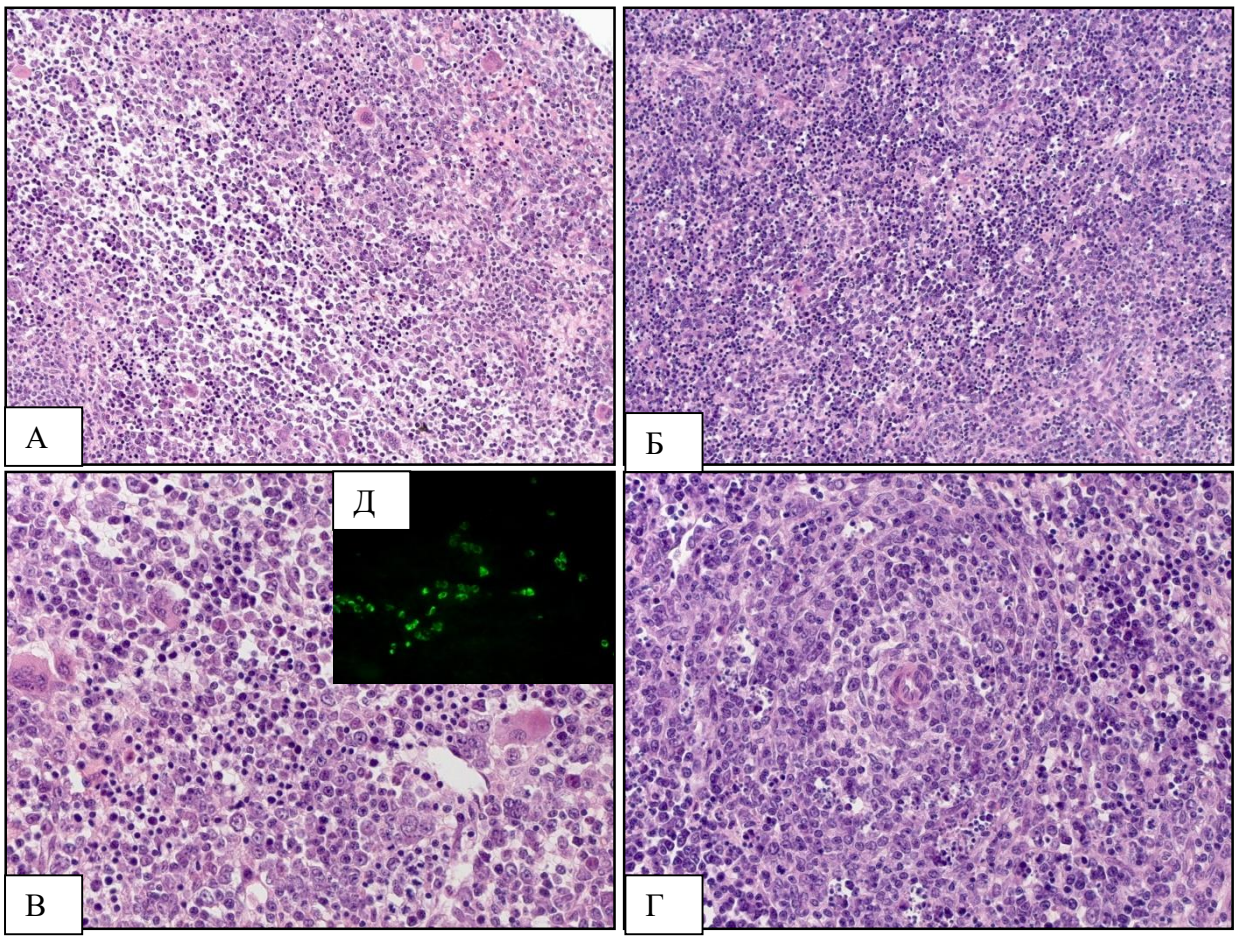


Рис. 3.1.4. Морфологическая характеристика селезенки у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы (А, В, Д) и на 1-е сут после введения ЛПС (Б, Г). Контрольная группа (А, В, Д) – в селезенке преобладает красная пульпа, в которой выявляются равномерно распределенные форменные элементы крови, среди них много мегакариоцитов. Д – иммунофлуоресцентная окраска с антителами к CD45+, конъюгированными с FITC, В-лимфоцитов. Они не образуют лимфоидные узелки, а диффузно рассеяны по белой пульпе селезенки. На 1-е сут после введения ЛПС (Б, Г) – расширение белой пульпы селезенки. А-Г: окраска гематоксилином и эозином; Д – иммунофлуоресцентная окраска В-лимфоцитов (CD45-FITC). Ув. А, Б 200; В, Г, Д 400

Таблица 3.1.7

Морфометрическая характеристика селезенки у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения БП к КП, усл. ед.
	БП	КП	
Контрольная (n=9)	10,11±1,82	89,89±1,82	0,13±0,02
ЛПС 1-е сут (n=9)	28,81±1,24	71,19±1,24	0,41±0,03
Статистическая значимость различий (p)	0,0019	0,0019	0,0019

Примечания. БП – белая пульпа, КП – красная пульпа

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

Через сутки после введения ЛПС у самок было выявлено снижение уровня продукции ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α. В сыворотке крови у самок на 1-е сут после введения ЛПС увеличивалось содержание неоптерина. Показатель уровня продукции ИЛ-4 клетками селезенки и концентрация TGF-β в сыворотке крови у животных опытных групп статистически значимо не отличались от контрольных значений (табл. 3.1.8).

Таблица 3.1.8

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, и концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

	Цитокины	Контрольная (n=10)	ЛПС 1-е сут (n=9)	Статистическая значимость различий (p)
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	**ИЛ-2**	4403 (2378-6093)	456,25 (386,1-617,75)	0,0008
	ИЛ-4	0,15 (0-0,88)	0,36 (0,05-0,83)	0,5995
	ИФН-γ	48,86 (32,19-57,87)	0 (0-0)	0,0117
	ФНО-α	169,65 (123,55-255,80)	89,80 (67,42-128,80)	0,0209
Сыворотка крови	**TGF-β (нг/мл)**	18,63 (16,11-20,93)	14,48 (15,22-18,17)	0,0831
	Неоптерин (нмоль/л)	6,99 (5,70-10,82)	14,16 (11,61-14,16)	0,0268

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у новорожденных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По сравнению с контрольной группой при СВО у новорожденных самок крыс Вистар статистически значимых различий числа всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов не было выявлено (табл. 3.1.9).

Таблица 3.1.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у новорожденных самок крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Субпопуляция	Относительное число, %		Абсолютное число, тыс/мл	
	Контрольная (n=7)	ЛПС (n=8)	Контрольная (n=7)	ЛПС (n=8)
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$5,9^{1*}$ (2,9-7,9)	$4,05^{2}$ (2,85-6,1)	840^{1} (520-1370)	410^{2} (220-910)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$4,8^{3}$ (2,1-5,6)	$3,45^{4}$ (2,5-5,15)	680^{3} (400-970)	340^{4} (190-810)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$2,3^{5}$ (1,3-4,7)	$1,75^{6}$ (0,75-3,1)	460^{5} (240-810)	180^{6} (80-390)
Двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$)	$2,0^{7}$ (0,7-2,7)	$1,05^{8}$ (0,55-2,35)	310^{7} (140-400)	110^{8} (70-270)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$4,0^{9}$ (1,0-5,3)	$7,0^{10}$ (3,75-10,9)	210^{9} (160-340)	960^{10} (490-1580)
NK-клетки ($CD314^+$)	$0,2^{11}$ (0,1-0,3)	$0,1^{12}$ (0,05-0,2)	15^{11} (5-40)	14^{12} (7-30)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$1,0^{13}$ (0,5-1,3)	$1,0^{14}$ (0,3-1,4)	7^{13} (4-20)	7^{14} (3-9)
Т-регуляторные лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$1,2^{15}$ (0,8-3,0)	$0,7^{16}$ (0,5-2,5)	10^{15} (7-14)	5^{16} (4-18)
Статистически значимые различия, значения	$0,56^{1-2}$ $0,91^{3-4}$ $0,32^{5-6}$ $0,30^{7-8}$	$0,11^{9-10}$ $0,25^{11-12}$ $0,74^{13-14}$ $0,10^{15-16}$	$0,16^{1-2}$ $0,20^{3-4}$ $0,13^{5-6}$ $0,11^{7-8}$	$0,22^{9-10}$ $0,62^{11-12}$ $0,87^{13-14}$ $0,63^{15-16}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Заключение

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок крыс Вистар развивается СВО, который характеризуется интраальвеолярным отеком легких, увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках вне зоны отека, выраженной дистрофией гепатоцитов, повышением активности АлАТ, концентрации эндотоксина и неоптерина в сыворотке крови, выраженной акцидентальной инволюцией II стадии со снижением объемной плотности коркового вещества тимуса, расширением белой пульпы селезенки на фоне уменьшения содержания эстрадиола в сыворотке крови и продукции ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α.

3.2 Морфологические проявления и иммунологические нарушения при системном воспалительном ответе у новорожденных самцов крыс Вистар

Изменение содержание половых гормонов в сыворотке крови у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самцов статистически значимо снижалось содержание эстрадиола. Показатели концентрации тестостерона и прогестерона не отличались от контрольной группы (табл. 3.2.1).

Таблица 3.2.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=8)	22,22 (20,16-24,57)	0,77 (0,73-0,80)	0,29 (0,14-3,28)
ЛПС 1-е сут (n=7)	8,44 (6,65-21,47)	0,54 (0,32-0,79)	1,68 (1,45-2,11)
Статистическая значимость различий (p)	0,0003	0,3214	0,1301

Морфологические изменения в легких у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При гистологическом исследовании легких новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы в просветах бронхов обнаруживался десквамированный эпителий. Слизистая оболочка бронхов была представлена кубическим реснитчатым эпителием, который располагался в 1-2 ряда. Просветы альвеол и альвеолярных ходов широкие, межальвеолярные перегородки тонкие, в них определялись единичные нейтрофилы (рис. 3.2.1).

На 1-е сут СВО в легких у новорожденных самцов в просветах бронхов выявлялись частично заполняющие просвет зернистые эозинофильные массы, а также единичные десквамированные эпителиальные клетки. У 5 из 9 (56%) животных в группе просветы альвеол и альвеолярных ходов были заполнены гомогенными эозинофильными массами (рис. 3.2.1). Межальвеолярные перегородки были очагово утолщены, в них обнаруживалось большое количество нейтрофилов (5-10 в поле зрения при ув. 400). Периваскулярные лимфатические щели расширены.

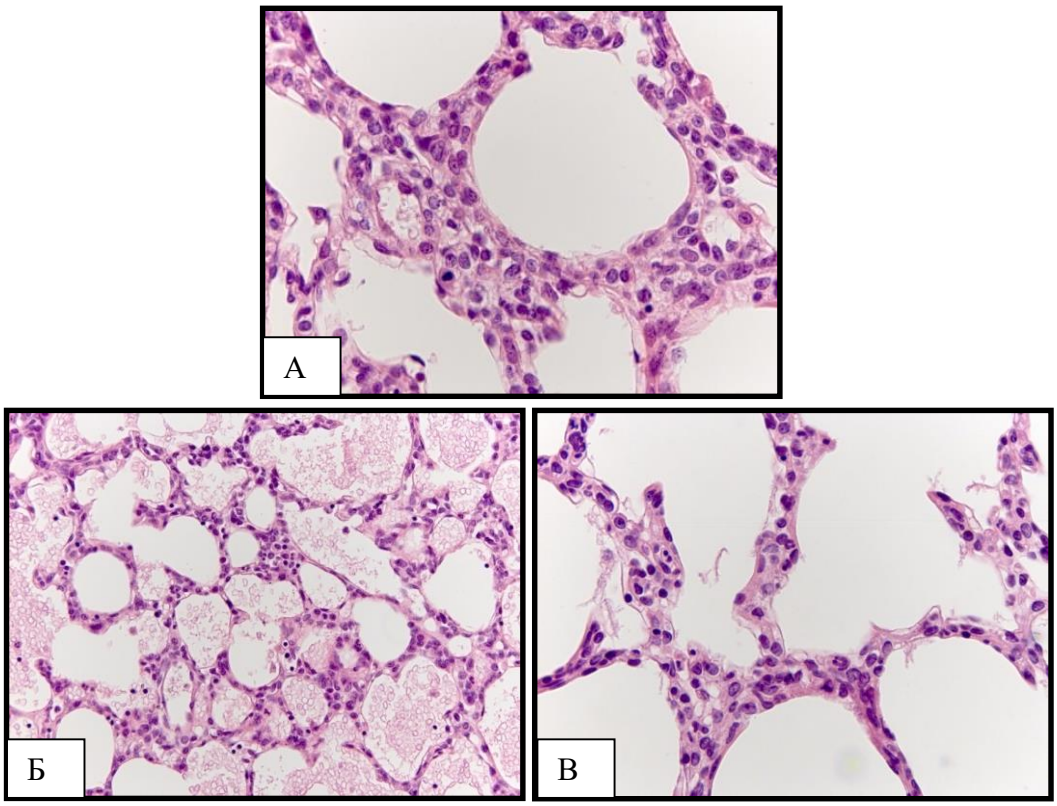


Рис. 3.2.1. Морфологические изменения легких у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Б, В). Контрольная группа (А) – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные. 1-е сут после введения ЛПС: Б – обширные зоны интраальвеолярного отека, просветы альвеол и альвеолярных ходов заполнены эритроцитами и эозинофильными массами. В - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А, В 640: Б 320

Таблица 3.2.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	**Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (25 тыс. мкм^2)**
Контрольная (n=10)	1,90 (1,50-2,30)
ЛПС 1-е сут (n=9)	11,80 (11,00-12,80)
Статистическая значимость различий (p)	0,0001

Морфологические изменения печени у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При морфологическом исследовании у новорожденных самцов контрольной группы патологических изменений гепатоцитов выявлено не было (рис. 3.2.2Б). В соединительной ткани по ходу триад обнаруживались единичные лимфоциты и гистиоциты. Стенки центральных вен тонкие.

При морфологическом исследовании печени на 1-е сут после введения ЛПС у самцов выявлялись характерные для СВО патологические изменения: очаговые некрозы, разные по выраженности и распространенности дистрофические изменения, неравномерное полнокровие сосудов, стазы и сладжи (рис. 3.2.2Б). По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых, кроме макрофагов и лимфоцитов, выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы. В строме триад были скопления лимфоцитов и гистиоцитов. В печени у 1 из 10 самцов обнаруживались очаговые некрозы и кровоизлияния (рис. 3.2.2Б). При полуколичественной оценке патологических изменений в печени у самцов с СВО были выявлены статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (табл. 3.2.3).

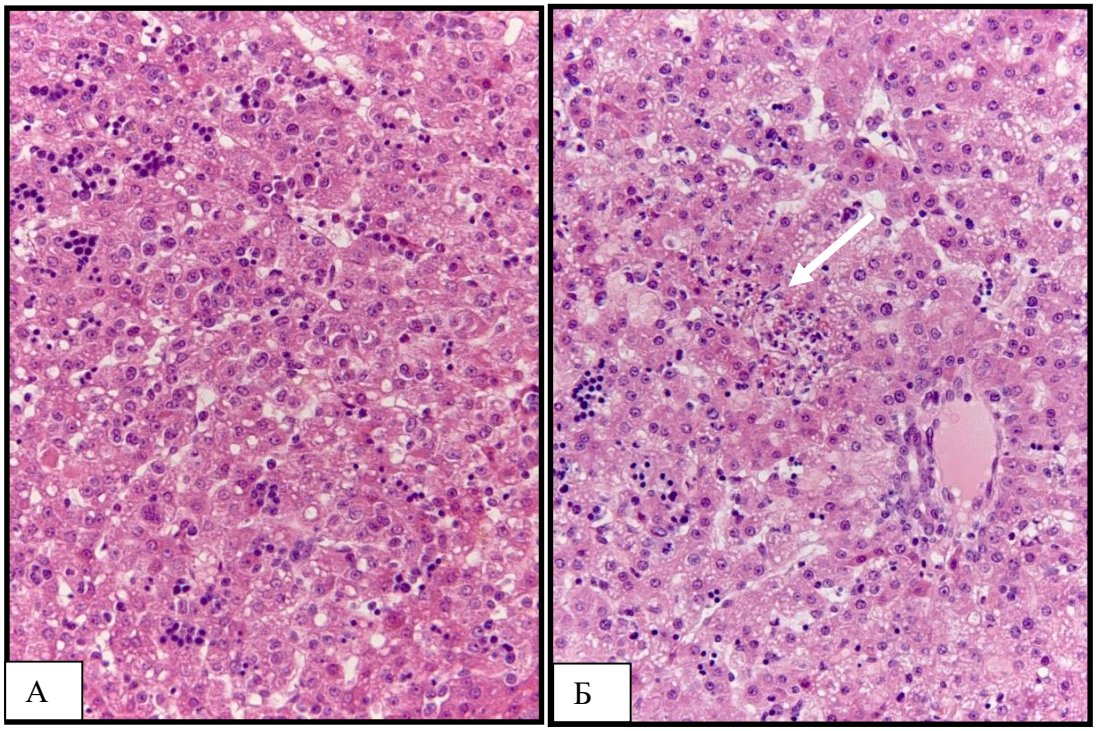


Рис. 3.2.2. Морфологическая характеристика печени у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы (А) и на 1-е сут после введения ЛПС (Б). Контрольная группа (А) – патологических изменений нет. На 1-е сут после введения ЛПС (Б) – умеренная мелкокапельная дистрофия, некроз, неравномерное полнокровие синусоидных капилляров. Стрелка указывает на очаг некроза. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 320

Таблица 3.2.3

Морфометрическая характеристика печени у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)
Контрольная (n=8)	0,25 (0,00-0,50)
ЛПС, 1-е сут (n=9)	2,00 (1,00-2,00)
Статистическая значимость различий (p)	0,0049

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По сравнению с контрольной группой после введения ЛПС уровень активности АлАТ в сыворотке крови у новорожденных самцов статистически значимо повышался, а АсАТ – не изменялся (табл. 3.2.4). На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самцов наблюдалось повышение уровня эндотоксина в 7 раз, тогда как содержание кортикостерона статистически значимо не изменялось (табл. 3.2.4).

Таблица 3.2.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=8)	50,50 (29-74)	197 (132,5-371,5)	0,47 (0,12-2,58)	7,45 (1,24-11,78)
ЛПС 1-е сут (n=9)	102 (52-174)	294 (179-343)	33,53 (29,66-44,31)	12,17 (7,30-15,94)
Статистическая значимость различий (p)	0,0253	0,2864	0,0066	0,1161

Морфофункциональные изменения тимуса и показатели относительного количества апоптотически гибнущих тимоцитов у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

В тимусе у самцов контрольной группы границы между корковым и мозговым веществом были нечеткими. На всем протяжении коркового вещества обнаруживались многочисленные бласты, делящиеся клетки и зрелые лимфоциты. Субкапсулярная зона не выявлялась (рис. 3.2.3). Мозговое вещество тимуса было представлено рыхло расположенными эпителиальными ретикулярными клетками и лимфоцитами.

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе у самцов выявлялась акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризовалась картиной «звездного неба» (рис. 3.2.3). В корковом веществе выявлялись фрагменты ядер погибших лимфоцитов и макрофаги, окруженные светлой зоной. Среди тимических телец I-II фаз развития встречались тимические тельца в виде кистоподобных полостей и с накоплением кератогиалина. При морфометрическом исследовании сужения коркового вещества тимуса выявлено не было (табл. 3.2.5). На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе не изменялось по сравнению с контрольной группой (табл. 3.2.6).

Таблица 3.2.5

Морфометрическая характеристика тимуса у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.
	КВ	МВ	
Контрольная (n=8)	62,75 (55,67-69,04)	37,25 (30,96-44,33)	1,97 (1,34-2,32)
ЛПС 1-е сут (n=7)	58,64 (57,24-63,08)	41,36 (36,92-42,76)	1,48 (1,41-1,93)
Статистическая значимость различий (p)	0,3682	0,3682	0,3682

Примечания: КВ – корковое вещество; МВ – мозговое вещество.

Таблица 3.2.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me;25%-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^-$)	$CD3^+$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	2,15 (1,50-2,60)	6,10 (5,80-9,80)
ЛПС 1-е сут (n=8)	3,45 (1,95-8,70)	7,25 (4,50-8,85)
Статистическая значимость различий (p)	0,31	0,75

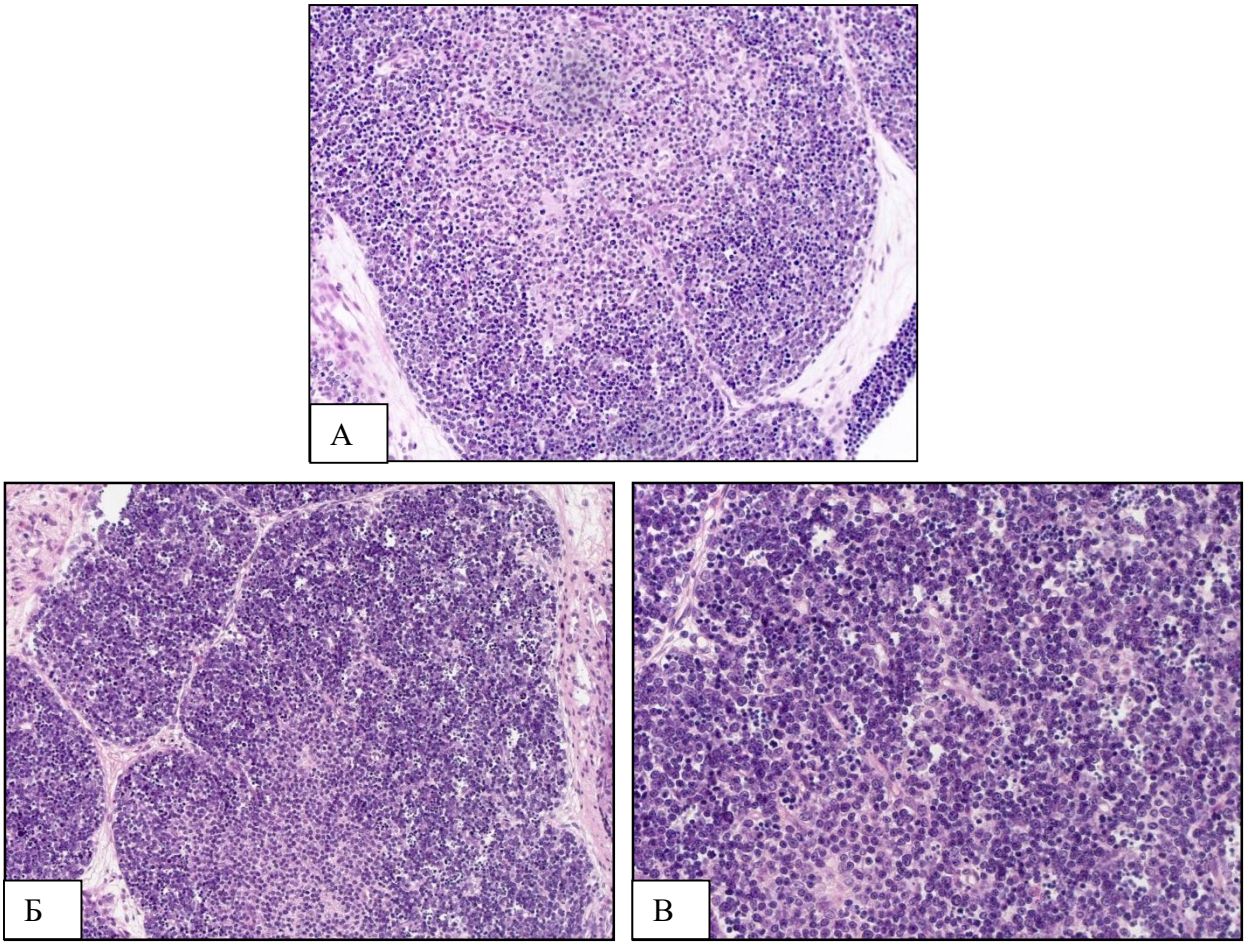


Рис. 3.2.3 Морфологическая характеристика тимуса у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы (А) и на 1-е сут после введения ЛПС (Б, В). Контрольная группа (А) – границы между корковым и мозговым слоем нечеткие. На 1-е сут после введения ЛПС (Б, В) – акцидентальная инволюция II стадии, картина «звездного неба», в корковом слое фрагменты ядер погибших тимоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, Б 200; В 400

Морфофункциональные изменения селезенки у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По данным морфологического исследования в селезенке у самцов белая пульпа селезенки была не выражена (рис. 3.2.4), лимфоидные узелки не выявлялись. При иммунофлуоресцентном окрашивании с антителами к CD45 обнаруживались диффузно рассеянные В-лимфоциты, не образующие лимфоидных узелков (рис. 3.2.4). В красной пульпе равномерно распределенные форменные элементы крови, бластные клетки, макрофаги и мегакариоциты.

На 1-е сут после введения ЛПС у самцов по сравнению с контрольной группой белая пульпа была более выражена (рис. 3.2.4). В белой пульпе выявлялись фрагменты ядер разрушенных клеток. При морфометрической оценке была выявлена статистически значимое увеличение объемной доли белой пульпы селезенки по сравнению с контрольной группой (табл. 3.2.7).

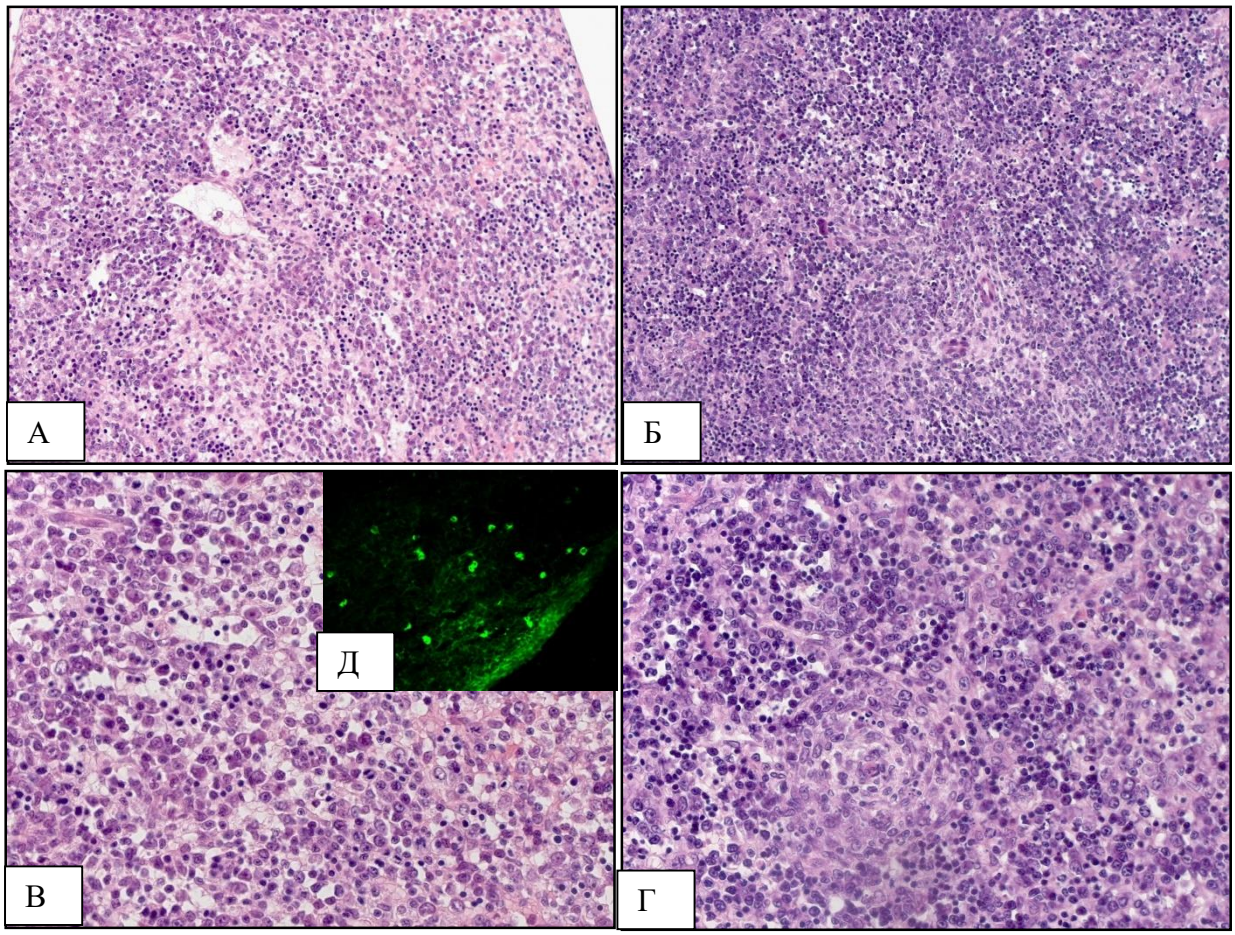


Рис. 3.2.4. Морфологическая характеристика селезенки у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы (А, В, Д) и на 1-е сут после введения ЛПС (Б, Г). Контрольная группа (А, В) – белая пульпа представлена очаговыми скоплениями лимфоцитов; Д – иммунофлуоресцентное выявление диффузно рассеянных В-лимфоцитов. На 1-е сут после введения ЛПС (Б, Г) – расширение белой пульпы селезенки, клетки которой представлены лимфоцитами и лимфобластами. А-Г: окраска гематоксилином и эозином, Д: иммунофлуоресценция с антителами к CD45, конъюгированными с FITC. Ув. А, В 200, Б, Г 400

Таблица 3.2.7

Морфометрическая характеристика селезенки у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения БП к КП, усл. ед.
	БП	КП	
Контрольная (n=8)	11,75±1,44	88,25±1,44	0,11±0,02
ЛПС 1-е сут (n=7)	35,94±3,69	64,06±3,69	0,60±0,09
Статистическая значимость различий (p)	0,0253	0,0253	0,0253

Примечания. БП – белая пульпа, КП – красная пульпа

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

Через сутки после введения ЛПС у самцов было выявлено увеличение уровня продукции ИЛ-2 и ФНО-α и снижение концентрации ИФН-γ в культуральной жидкости клеток селезенки. По содержанию неоптерина и TGF-β в сыворотке крови между исследуемыми группами статистически значимых различий выявлено не было (табл. 3.2.8).

Таблица 3.2.8

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

	Цитокины	Контрольная (n=10)	ЛПС 1-е сут (n=10)	Статистическая значимость различий (p)
Сыворотка крови	**TGF-β (нг/мл)**	18,86 (16,80-27,12)	17,02 (15,23-18,17)	0,0933
	Неоптерин (нмоль/л)	9,12 (7,12-10,37)	7,33 (6,02-8,71)	0,1356
Культуральная жидкость селезенки, пг/мл	**ИЛ-2**	141,70 (124,60-158,75)	474,40 (426,10-826,15)	0,0066
	ИЛ-4	0,04 (0,01-0,31)	0,31 (0-0,62)	0,3081
	ИФН-γ	0,87 (0,30-10,87)	0 (0-0)	0,9511
	ФНО-α	10,79 (1,34-13,48)	51,23 (41,80-70,11)	0,0066

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови у новорожденных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По сравнению с контрольной группой при СВО у новорожденных самцов крыс Вистар статистически значимых различий числа всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов не было выявлено (табл. 3.2.9).

Таблица 3.2.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у новорожденных самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляция	Относительное число, %		Абсолютное число, тыс/мл	
	Контрольная (n=5)	**ЛПС (n=8)**	**Контрольная (n=5)**	**ЛПС (n=8)**
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$4,15^{1*}$ (1,55-6,85)	$2,8^{2}$ (1,8-6,7)	800^{1} (270-1190)	630^{2} (47-830)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$3,25^{3}$ (1,30-5,35)	$2,4^{4}$ (1,4-5,9)	650^{3} (220-930)	490^{4} (400-680)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$1,7^{5}$ (0,55-3,5)	$1,0^{6}$ (0,4-2,7)	290^{5} (90-622)	180^{6} (140-440)
Двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$)	$0,9^{7}$ (0,4-1,95)	$0,7^{8}$ (0,3-1,8)	160^{7} (60-350)	130^{8} (90-280)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$1,4^{9}$ (1,0-1,8)	$4,2^{10}$ (1,5-9,5)	270^{9} (150-490)	670^{10} (270-1290)
NK-клетки ($CD314^+$)	$0,1^{11}$ (0-0,1)	$0,15^{12}$ (0,1-0,25)	20^{11} (0-20)	30^{12} (20-50)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$0,45^{13}$ (0,1-2,1)	$1,1^{14}$ (0,9-2,1)	3^{14} (0,9-14)	6^{14} (4-20)
Т-регуляторные лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$0,6^{15}$ (0,1-2,7)	$3,0^{16}$ (2,5-3,8)	4^{15} (0,8-17)	15^{16} (10-26)
Статистически значимые различия, значения	$0,84^{1-2}$ $0,78^{3-4}$ $0,63^{5-6}$ $1,00^{7-8}$	$0,38^{9-10}$ $0,08^{11-12}$ $0,22^{13-14}$ $0,12^{15-16}$	$0,93^{1-2}$ $0,93^{3-4}$ $0,79^{5-6}$ $0,79^{7-8}$	$0,22^{9-10}$ $0,22^{11-12}$ $0,27^{13-14}$ $0,20^{15-16}$

Заключение

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у новорожденных самцов крыс Вистар развиваются морфологические изменения органов-мишеней и иммунной системы, характеризующиеся воспалительной реакцией в легких с увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках и у части животных – интраальвеолярным отеком, в печени – дистрофическими изменениями гепатоцитов и единичными некрозами, повышением уровня активности АлАТ, эндотоксина в сыворотке крови, акцидентальной инволюцией тимуса II стадии, увеличением объемной доли белой пульпы селезенки и повышением продукции ее клетками ИЛ-2 и ФНО-α на фоне снижения эстрадиола и уровня продукции ИФН-γ.

3.3 Половые различия выраженности иммунологических нарушений и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у новорожденных крыс Вистар

Сравнительная характеристика содержания половых гормонов в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По сравнению с новорожденными самцами у самок был выше уровень эстрадиола в сыворотке крови (табл. 3.3.1). По уровню прогестерона, тестостерона и кортикостерона статистически значимых различий между группами самок и самцов выявлено не было (табл. 3.3.1).

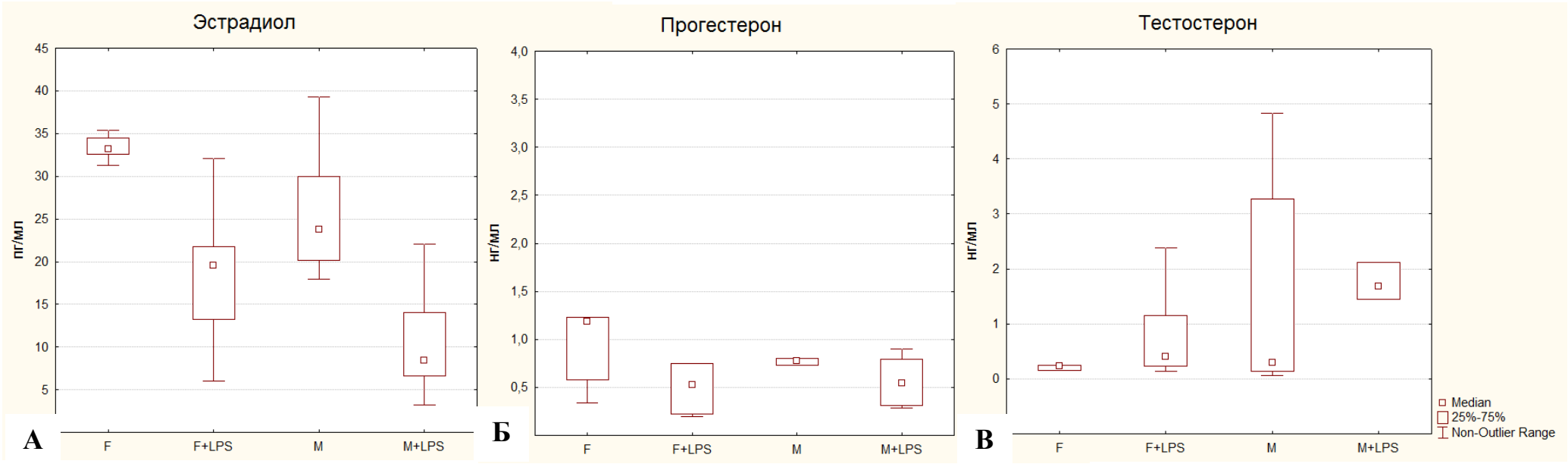
На 1-е сут после введения ЛПС содержание тестостерона и прогестерона в сыворотке крови как у самцов, так и у самок, не отличалось от контрольной группы (табл. 3.3.1, рис. 3.3.1). Уровень эстрадиола в сыворотке крови снижался как у самок, так и самцов, однако, статистически значимые различия по этому показателю были выявлены только у самцов (табл. 3.3.1, рис. 3.3.1).

Таблица 3.3.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений		**Эстрадиол, пг/мл**	**Прогестерон, нг/мл**	**Общий тестостерон, нг/мл**
Самки	**Контрольная (n=6)**	32,90 (32,03-34,47)[1*]	1,19 (0,58-1,23)[1]	0,24 (0,16-0,26)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	19,54 (13,22-21,75)[2]	0,53 (0,23-0,75)[2]	0,41 (0,24-1,16)[2]
Самцы	**Контрольная (n=8)**	22,22 (20,16-24,57)[3]	0,77 (0,73-0,80)[3]	0,29 (0,14-3,28)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	8,44 (6,65-21,47)[4]	0,54 (0,32-0,79)[4]	1,68 (1,45-2,11)[4]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}0006^{1\text{-}2}$ $0{,}0003^{3\text{-}4}$ $0{,}0011^{1\text{-}3}$ $0{,}1259^{2\text{-}4}$	$0{,}0562^{1\text{-}2}$ $0{,}3214^{3\text{-}4}$ $0{,}1291^{1\text{-}3}$ $0{,}8450^{2\text{-}4}$	$0{,}0612^{1\text{-}2}$ $0{,}1301^{3\text{-}4}$ $0{,}1211^{1\text{-}3}$ $0{,}0449^{2\text{-}4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения



Статистическая значимость, p	Эстрадиол, пг/мл
F и F+LPS	0,0006
M и M+LPS	0,0003
F и M	0,0011
F+LPS и M+LPS	0,1259

Статистическая значимость, p	Прогестерон, нг/мл
F и F+LPS	0,0562
M и M+LPS	0,3214
F и M	0,1291
F+LPS и M+LPS	0,8450

Статистическая значимость, p	Тестостерон, нг/мл
F и F+LPS	0,0612
M и M+LPS	0,1301
F и M	0,1211
F+LPS и M+LPS	0,0449

Рис. 3.3.1. Содержание эстрадиола (А), прогестерона (Б), тестостерона (В) в сыворотке крови у новорожденных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M) и на 1-е сут после введения ЛПС (F+LPS, M+LPS). Данные представлены в виде Me; 25%-75%. * - различия статистически значимы между самками и самцами на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При гистологическом исследовании легких новорожденных крыс Вистар с СВО половых различий морфофункциональных изменений в них выявлено не было. Интраальвеолярный отек развивался у самок в 50% случаев – у 5 животных из 10, а у самцов – в 56% (у 5 животных из 9). Через сутки после введения ЛПС новорожденным крысам обоего пола количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у них увеличивалось по сравнению с соответствующей контрольной группой. По сравнению с самками у самцов число нейтрофилов в эти сроки СВО было в 1,5 раза выше (рис. 3.3.2), что отражает б***о***льшую выраженность воспалительной реакции в легких.

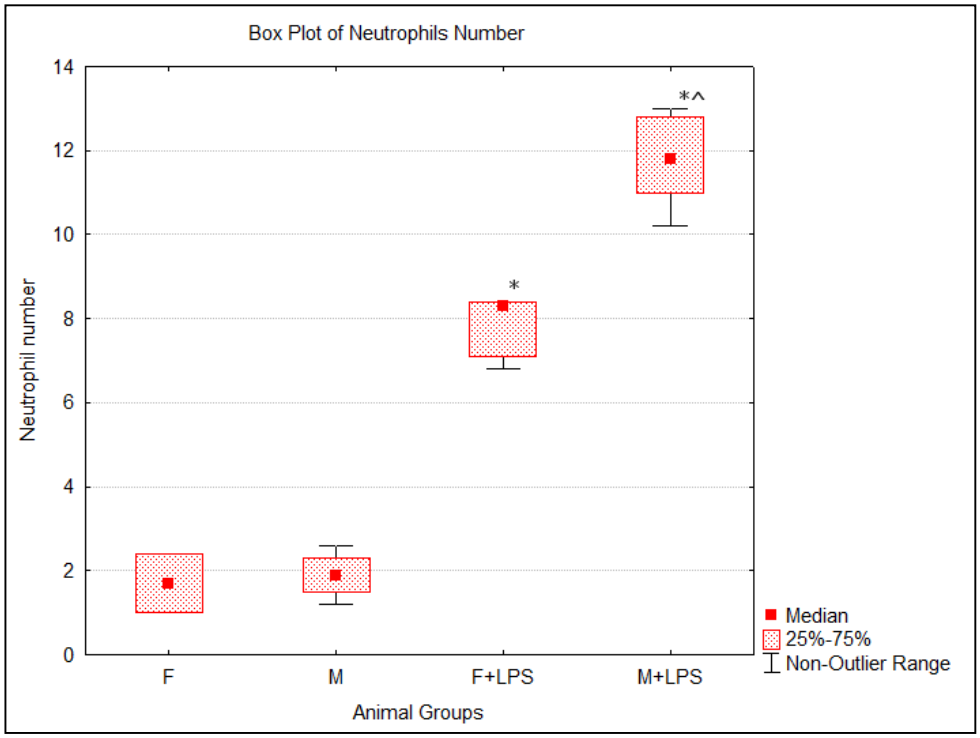


Рис. 3.3.2. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у новорожденных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M) и на 1-е сут после введения ЛПС (F+LPS, M+LPS). Различия статистически значимы: * - по сравнению с соответствующей контрольной группой, ^ - по сравнению с самками на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений печени у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При морфологическом исследовании печени на 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов выявлялись патологические изменения, характерные для СВО: очаговые некрозы, разные по выраженности дистрофические изменения (от слабо выраженных до выраженных и тотальных), неравномерное полнокровие сосудов, стазы и сладжи (рис. 3.3.3). При полуколичественной оценке тяжести поражений печени между самками и самцами половых различий выявлено не было (табл. 3.3.2).

Таблица 3.3.2

Патологические изменения в печени и уровень активности ферментов печени в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС
(Med; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдений	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)	АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л
Самки	**Контрольная (n=8)**	0,50 (0,00-0,75)[1*]	22 (13-41)[1]	264 (217-422)[1]
	ЛПС1-е сут (n=9)	2,50 (1,00-3,00)[2]	107 (89-222)[2]	512 (244-685)[2]
Самцы	**Контрольная (n=8)**	0,25 (0,00-0,50)[3]	50,50 (29-74)[3]	197 (132,5-371,5)[3]
	ЛПС1-е сут (n=9)	2,00 (1,00-2,00)[4]	102 (52-174)[4]	294 (179-343)[5]
Статистическая значимость различий (p)		0,0056[1-2] 0,0049[3-4] 0,7511[1-3] 0,6259[2-4]	0,0472[1-2] 0,0253[3-4] 0,3272[1-3] 0,4624[2-4]	0,3472[1-2] 0,2864[3-4] 0,4624[1-3] 0,5839[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

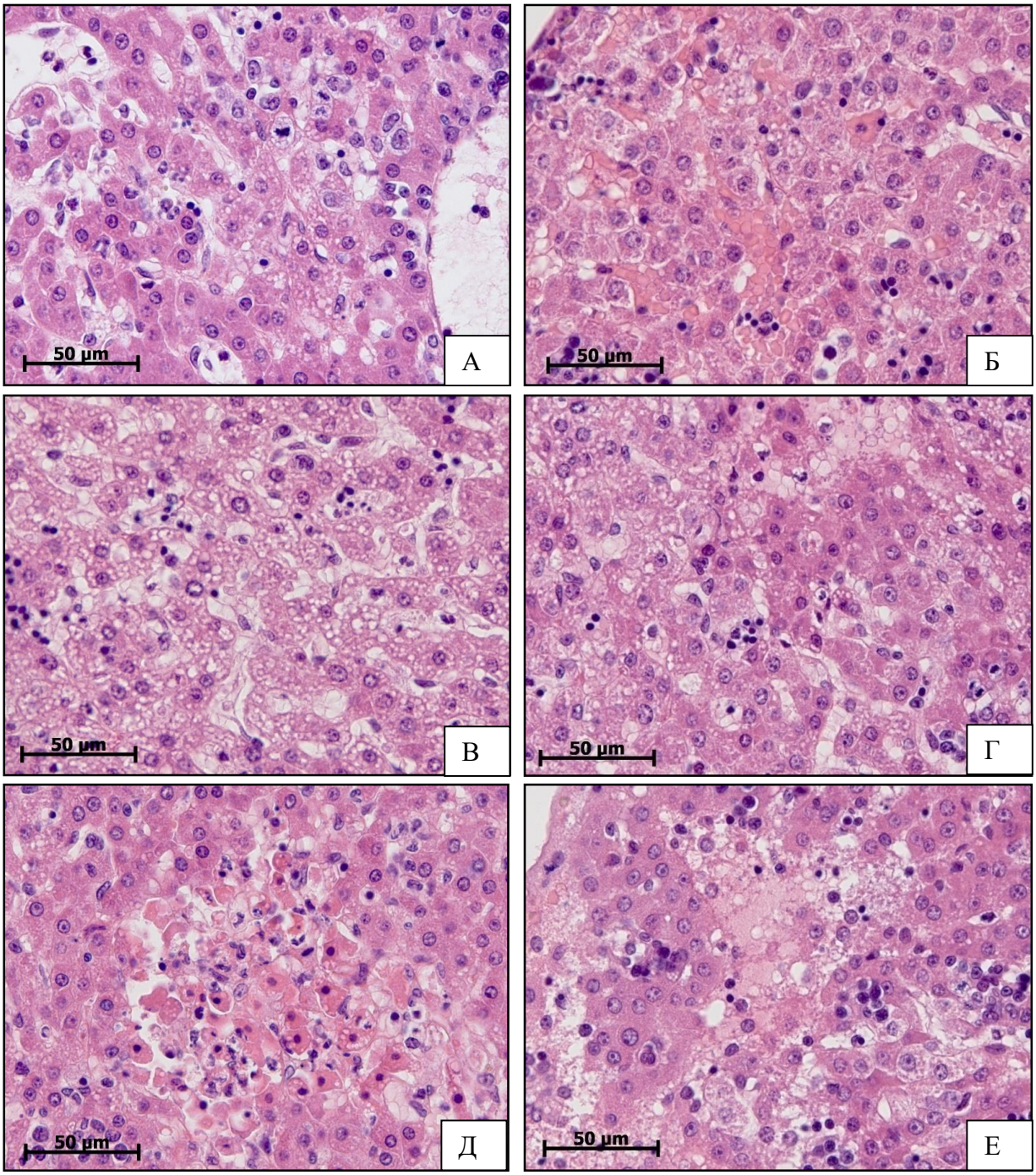


Рис. 3.3.3. Патологические изменения в печени у новорожденных самок (А, В, Д) и самцов (Б, Г, Е) крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС. Самки: А – слабо выраженные дистрофические изменения гепатоцитов; В – выраженные дистрофические изменения гепатоцитов; Д – очаг некроза. Самцы: Б – неравномерное полнокровие сосудов, стазы, сладжи, дистрофия гепатоцитов; Г – Некротические и дистрофические изменения гепатоцитов; Е – очаг некроза. Окраска гематокислином и эозином. Ув. 640

Сравнительная характеристика активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

Биохимический анализ активности ферментов печени показал, что уровень АлАТ на 1-е сут после введения ЛПС статистически значимо повышался как у самцов, так и у самок (табл.

3.3.2, рис. 3.3.4). Уровень активности другого фермента - АсАТ, в эти сроки эксперимента у новорожденных крыс Вистар обоего пола не изменялся (табл. 3.3.2).

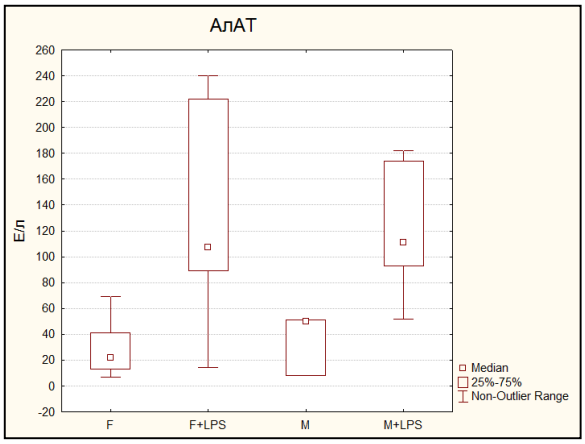


Рис. 3.3.4. Активность АлАТ в сыворотке крови у новорожденных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M) и на 1-е сут после введения ЛПС (F+LPS, M+LPS)

Сравнительная характеристика уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови самцов и самок новорожденных крыс Вистар наблюдалось увеличение уровня эндотоксина. По отношению к соответствующей контрольной группе у самок уровень эндотоксина возрастал в 30 раз, а у самцов – в 70 (табл. 3.3.3, рис. 3.3.5). Содержание кортикостерона на 1-е сут развития СВО как у самцов, так и у самок, не изменялось и статистически значимо не отличалось от контрольной группы (табл. 3.3.3).

Таблица 3.3.3

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=8)**	1,88 (0,47-3,29)[1*]	4,24 (3,88-15,25)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=9)	56,99 (47,30-90,65)[2]	15,11 (8,16-15,51)[2]
Самцы	**Контрольная (n=8)**	0,47 (0,12-2,58)[3]	7,45 (1,24-11,78)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=9)	33,53 (29,66-44,31)[4]	12,17 (7,30-15,94)[4]
Статистическая значимость различий (p)		0,0008[1-2] 0,0066[3-4] 0,2480[1-3] 0,0108[2-4]	0,1531[1-2] 0,1161[3-4] 0,7488[1-3] 0,4822[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

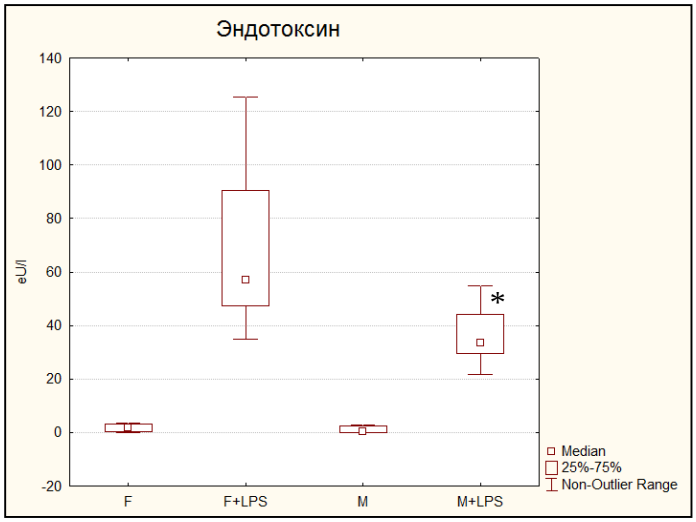


Рис. 3.3.5. Уровень эндотоксина в сыворотке крови у новорожденных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M) и на 1-е сут после введения ЛПС (F+LPS, M+LPS). * - различия статистически значимы по сравнению с группой самок на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По данным морфометрического исследования у самок показатели объемной доли коркового вещества и, соответственно, индекса отношения объемной доли коркового вещества тимуса к мозговому были статистически значимо выше, чем у самцов (табл. 3.3.4; рис. 3.3.6).

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе у самцов и самок обнаруживалась акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризовалась сужением коркового вещества у самок (табл. 3.3.4), картиной «звездного неба» у животных обоего пола (рис. 3.3.6). При морфометрическом исследовании было выявлено сужение коркового вещества тимуса только у самок. Половых различий по исследуемым показателям обнаружено не было (табл. 3.3.6).

Таблица 3.3.4

Морфометрическая характеристика тимуса у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.
		КВ	МВ	
Самки	Контрольная (n=10)	74,39 (68,49-75,57)[1*]	25,61 (24,43-31,51)[1]	3,22 (2,49-3,61)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=9)	62,42 (44,84-69,50)[2]	37,58 (30,50-55,16)[2]	1,86 (0,83-2,44)[2]
Самцы	Контрольная (n=8)	62,75 (55,67-69,04)[3]	37,25 (30,96-44,33)[3]	1,97 (1,34-2,32)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	58,64 (57,24-63,08)[4]	41,36 (36,92-42,76)[4]	1,48 (1,41-1,93)[4]
Статистическая значимость различий (p)		$0,0141^{1-2}$ $0,3682^{3-4}$ $0,0078^{1-3}$ $0,9062^{2-4}$	$0,0141^{1-2}$ $0,3682^{3-4}$ $0,0078^{1-3}$ $0,9062^{2-4}$	$0,0281^{1-2}$ $0,3146^{3-4}$ $0,0078^{1-3}$ $0,6374^{2-4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Примечания. КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

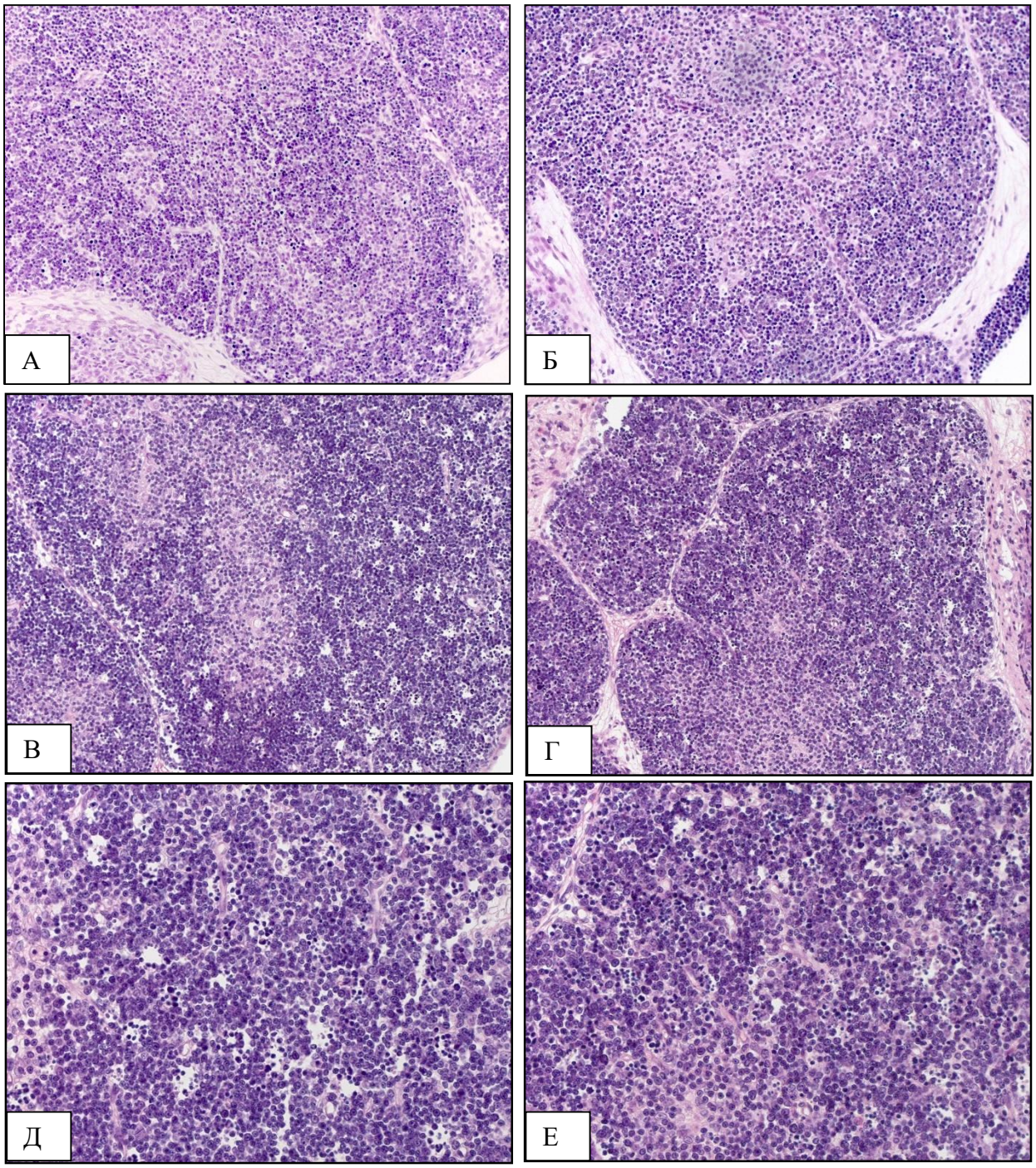


Рис. 3.3.6. Морфологическая характеристика тимуса у новорожденных самок (А, В, Д) и самцов (Б, Г, Е) крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения ЛПС (В-Е). Контрольная группа (А, Б) – границы между корковым и мозговым веществом нечеткие. На 1-е сут после введения ЛПС (В-Е) – акцидентальная инволюция II стадии, картина «звездного неба», в корковом веществе фрагменты ядер погибших лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А-Г 200; Д, Е 400

Показатели относительного содержания апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок и самцов крыс Вистар относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе не изменялось по сравнению с контрольной группой (табл. 3.3.5).

Таблица 3.3.5

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

	Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^-$)	$CD3^+$-лимфоциты
Самки	**Контрольная группа (n=6)**	2,00 (1,40-3,10)^{1*}	4,90 (4,50-8,90)^{1}
	ЛПС 1-е сут (n=6)	3,45 (2,50-4,50)^{2}	5,20 (3,00-8,10)^{2}
Самцы	**Контрольная группа (n=6)**	2,15 (1,50-2,60)^{3}	6,10 (5,80-9,80)^{3}
	ЛПС 1-е сут (n=8)	3,45 (1,95-8,70)^{4}	7,25 (4,50-8,85)^{4}
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}17^{1\text{-}2}$ $0{,}30^{3\text{-}4}$ $0{,}94^{1\text{-}3}$ $0{,}95^{2\text{-}4}$	$0{,}74^{1\text{-}2}$ $1{,}00^{3\text{-}4}$ $0{,}34^{1\text{-}3}$ $0{,}48^{2\text{-}4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика морфологических изменений селезенки у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС

По данным морфометрического исследования не было выявлено статистически значимых половых различий между группами самок и самцов по показателям объемной доли белой и красной пульпы селезенки (рис. 3.3.7).

На 1-е сут после введения ЛПС как у самцов, так и у самок по сравнению с контрольной группой белая пульпа была более выражена (рис. 3.3.8-9). В белой пульпе выявлялись фрагменты ядер лимфоцитов и лимфобласты. Морфометрическая оценка объемной доли функциональных зон селезенки у новорожденных самок и самцов крыс Вистар показала статистически значимое увеличение белой пульпы селезенки (рис. 3.3.7). Половых различий по показателям функциональных зон селезенки у новорожденных крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС выявлено не было (рис. 3.3.7).

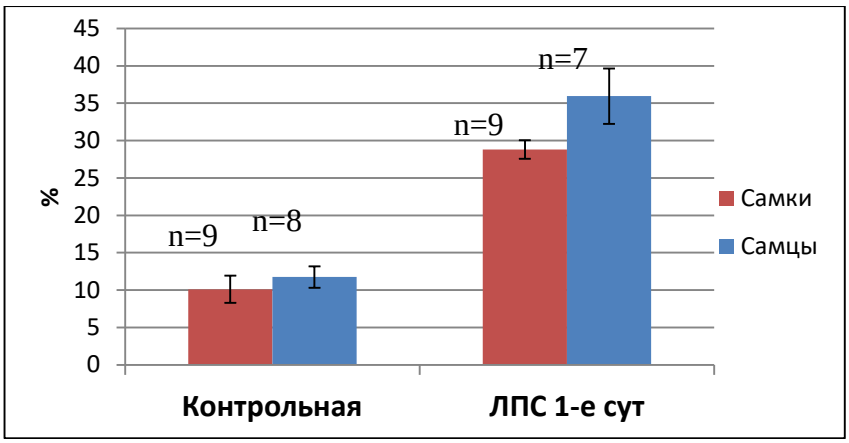


Рис. 3.3.7. Изменение объемной доли белой пульпы (БП) у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС

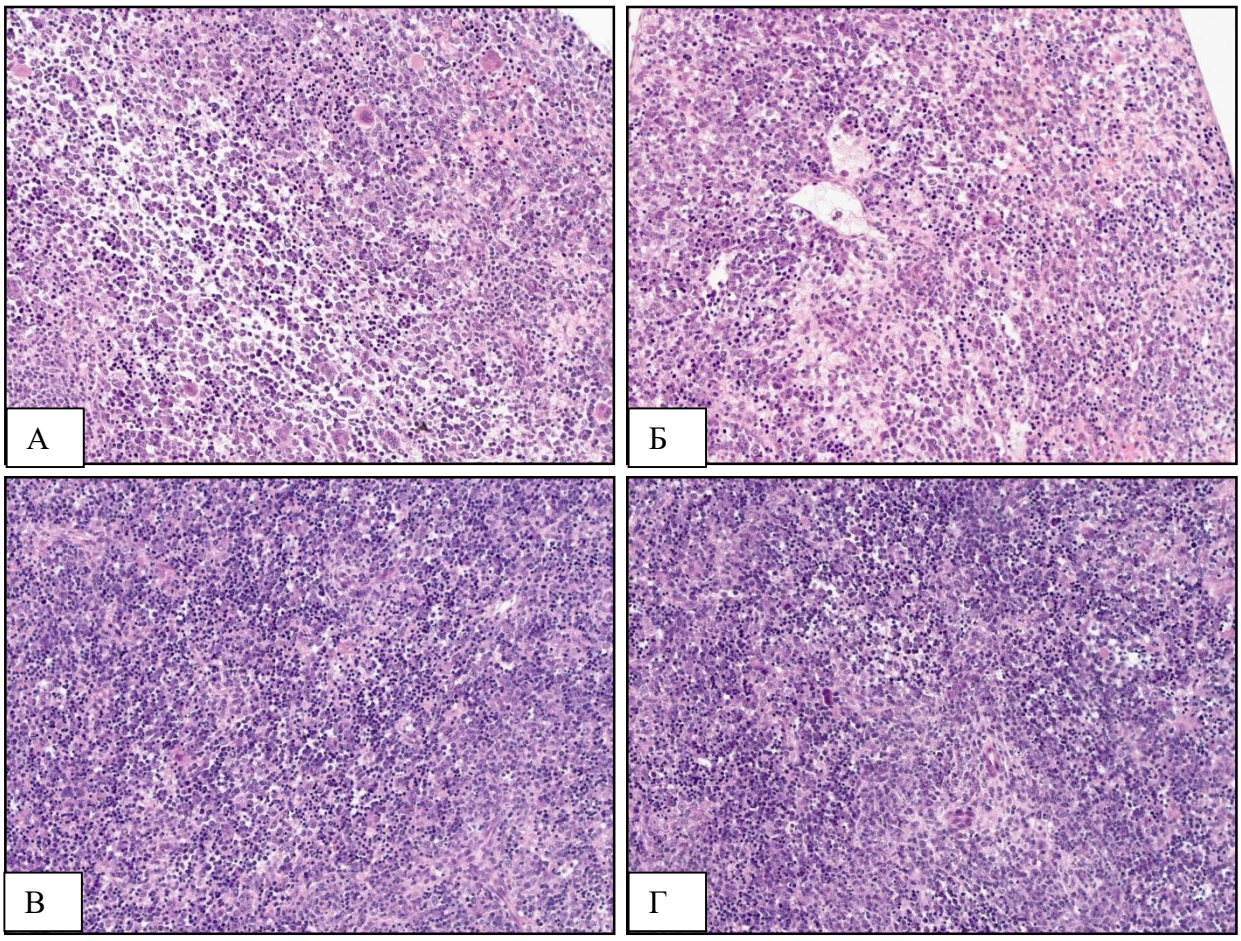


Рис. 3.3.8. Морфологическая характеристика селезенки у новорожденных самок (А, В) и самцов (Б, Г) крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения ЛПС (В, Г). Контрольная группа (А, Б) – в селезенке преобладает красная пульпа, в которой выявляются равномерно распределенные форменные элементы крови, макрофаги и мегакариоциты. На 1-е сут после введения ЛПС (В, Г) – расширение белой пульпы селезенки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

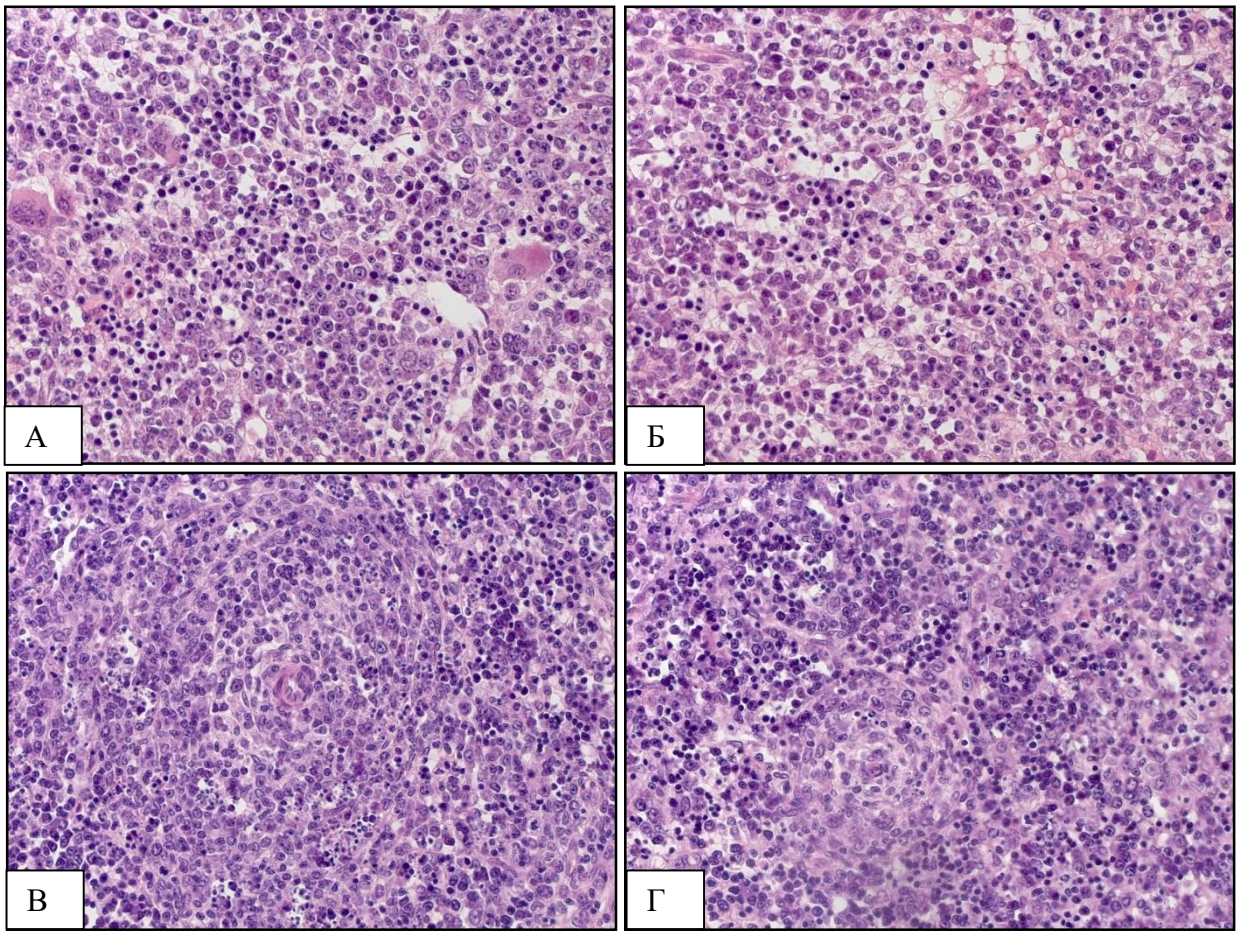


Рис. 3.3.9. Морфологическая характеристика селезенки у новорожденных самок (А, В) и самцов (Б, Г) крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения ЛПС (В, Г). Контрольная группа (А, Б) – белая пульпа слабо выражена, в красной пульпе мегакариоциты. На 1-е сут после введения ЛПС (В, Г) – расширение белой пульпы селезенки, в ней лимфоциты и лимфобласты. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

Сравнительная характеристика содержания цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

При исследовании цитокинового профиля новорожденных крыс Вистар было обнаружено, что у самок по сравнению с самцами выше уровень продукции клетками селезенки Тх1-цитокинов ИЛ-2 и ИФН-γ, а также уровень продукции провоспалительного цитокина ФНО-α (табл. 3.3.6, рис. 3.3.10). По уровню продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного цитокина ИЛ-6 статистически значимых различий между группами самок и самцов выявлено не было (табл. 3.3.6).

После введения ЛПС наблюдается различная динамика секреции цитокинов клетками селезенки у самок и самцов двухдневных крыс Вистар. Так, у самок было выявлено снижение уровня продукции ИЛ-2 и ФНО-α, тогда как у самцов, наоборот, наблюдалось увеличение

продукции этих цитокинов (табл. 3.3.6, рис. 3.3.10). Однако на 1-е сут СВО содержание ИФН-γ в культуральной жидкости клеток селезенки снижалось как у самцов, так и у самок. В сыворотке крови самок на 1-е сут после введения ЛПС увеличивалось содержание неоптерина, тогда как у самцов этот показатель не отличался от контрольной группы. По содержанию TGF-β в сыворотке крови опытных групп различий выявлено не было.

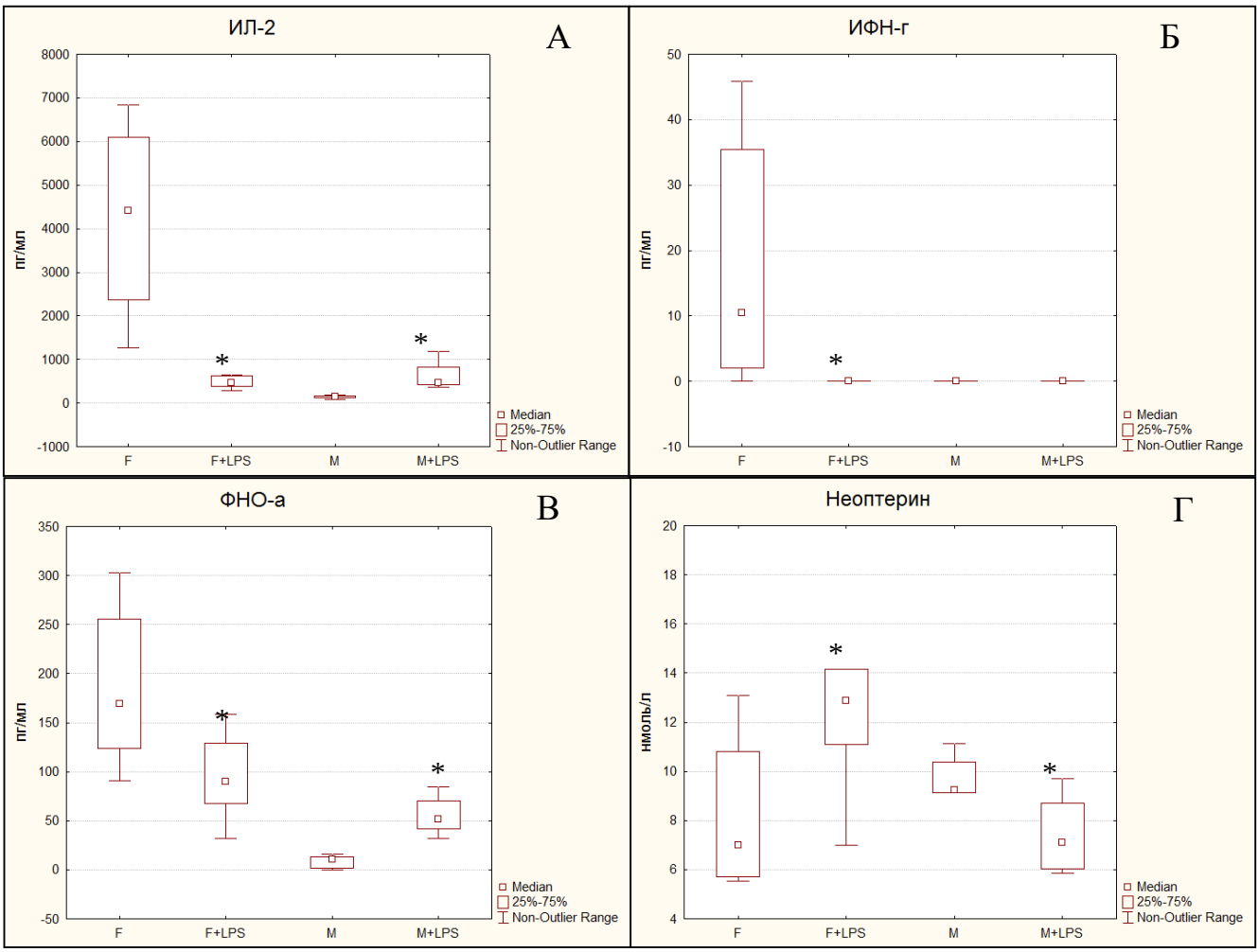


Рис. 3.3.10. Содержание ИЛ-2 (А), ИФН-γ (Б), ФНО-α (В) в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, и концентрация неоптерина (Г) в сыворотке крови у новорожденных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M) и на 1-е сут после введения ЛПС (F+LPS, M+LPS). * - различия статистически значимы по сравнению с соответствующей контрольной группой

Таблица 3.3.6

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у новорожденных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол		Содержание в сыворотке крови		Содержание в культуральной жидкости клеток селезенки, пг/мл			
		TGF-β (нг/мл)	Неоптерин (нмоль/л)	ИЛ-2	ИЛ-4	ИФН-γ	ФНО-α
Самки	Контрольная (n=10)	18,63[1*] (16,11-20,93)	6,99[1] (5,70-10,82)	4403[1] (2378-6093)	0,15[1] (0-0,88)	48,86[1] (32,19-57,87)	169,65[1] (123,55-255,80)
	ЛПС 1-е сут (n=9)	14,48[2] (15,22-18,17)	14,16[2] (11,61-14,16)	456,25[2] (386,1-617,75)	0,36[2] (0,05-0,83)	0[2] (0-0)	89,80[2] (67,42-128,80)
Самцы	Контрольная (n=10)	18,86[3] (16,80-27,12)	9,12[3] (7,12-10,37)	141,70[3] (124,60-158,75)	0,04[3] (0,01-0,31)	0,87[3] (0,30-10,87)	10,79[3] (1,34-13,48)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	17,02[4] (15,23-18,17)	7,33[4] (6,02-8,71)	474,40[4] (426,10-826,15)	0,31[4] (0-0,62)	0[4] (0-0)	51,23[4] (41,80-70,11)
Статистическая значимость различий (p)		0,0831[1-2] 0,0933[3-4] 0,7132[1-3] 0,7962[2-4]	0,0268[1-2] 0,1356[3-4] 0,2531[1-3] 0,0330[2-4]	0,0008[1-2] 0,0066[3-4] 0,0007[1-3] 0,3958[2-4]	0,5995[1-2] 0,3081[3-4] 0,0462[1-3] 0,4447[2-4]	0,0117[1-2] 1,00[3-4] 0,0117[1-3] 1,00[2-4]	0,0209[1-2] 0,0066[3-4] 0,0008[1-3] 0,1264[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

Половых различий основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови в контрольных группах выявлено не было.

По сравнению с контрольной группой при СВО у новорожденных самок и самцов крыс Вистар показатели относительного и абсолютного количества всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов не изменялись (табл. 3.3.7). На 1-е сут после введения ЛПС у самцов относительное количество Т-регуляторных лимфоцитов было выше по сравнению с самками (табл. 3.3.7, рис. 3.3.11).

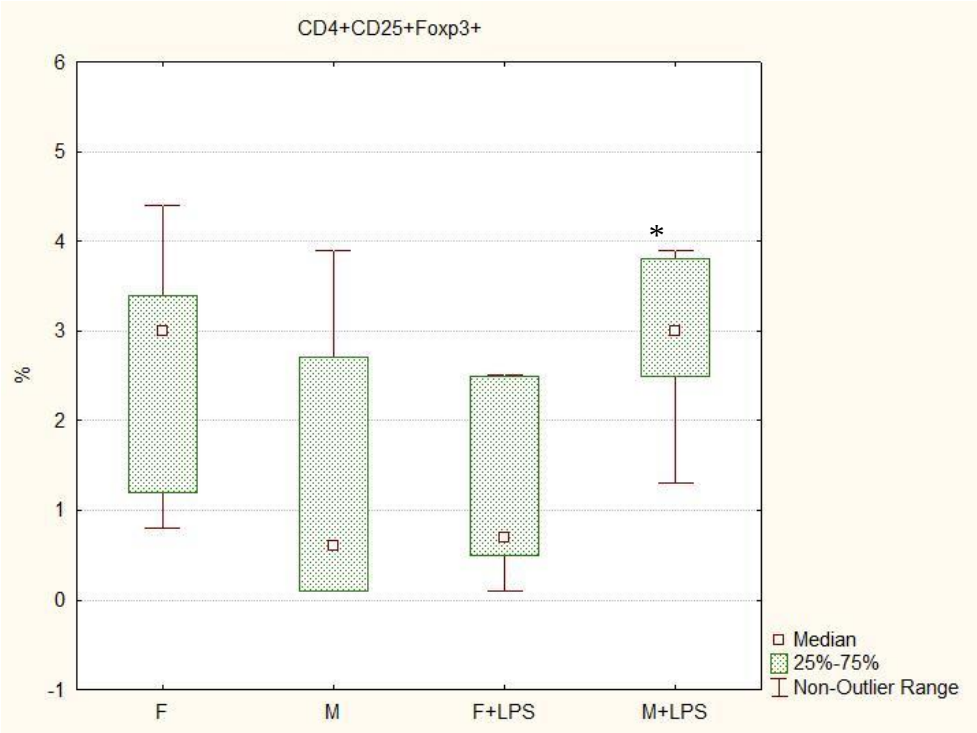


Рис. 3.3.11. Относительное количество Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) в периферической крови самцов (M) и самок (F) новорожденных крыс Вистар контрольной группы (F, M) и на 1-е сут после введения ЛПС (F+LPS; M+LPS). * - различия статистически значимы по сравнению с опытной группой самок

Таблица 3.3.7

Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови самок и самцов новорождённых крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

%	Самки		Самцы	
	Контрольная (n=7)	**ЛПС (n=8)**	**Контрольная (n=5)**	**ЛПС (n=8)**
Т-лимфоциты (CD3+)	5,9 (2,9-7,9)	4,05 (2,85-6,1)	4,15 (1,55-6,85)	2,8 (1,8-6,7)
Т-хелперы (CD3+CD4+)	4,8 (2,1-5,6)	3,45 (2,5-5,15)	3,25 (1,30-5,35)	2,4 (1,4-5,9)
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	2,3 (1,3-4,7)	1,75 (0,75-3,1)	1,7 (0,55-3,5)	1,0 (0,4-2,7)
Двойные позитивные лимфоциты (CD4+CD8+)	2,0 (0,7-2,7)	1,05 (0,55-2,35)	0,9 (0,4-1,95)	0,7 (0,3-1,8)
В-лимфоциты (CD45+)	4,0 (1,0-5,3)	7,0 (3,75-10,9)	1,4 (1,0-1,8)	4,2 (1,5-9,5)
NK-клетки (CD314+)	0,2 (0,1-0,3)	0,1 (0,05-0,2)	0,1 (0-0,1)	0,15 (0,1-0,25)
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	1,0 (0,5-1,3)	1,0 (0,3-1,4)	0,45 (0,1-2,1)	1,1 (0,9-2,1)
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	1,2 (0,8-3,0)	**0,7** (0,5-2,5)	0,6 (0,1-2,7)	**3,0$** (2,5-3,8)
Статистически значимые различия, значения			& = 0,04 (Т-регуляторные ЛФ между группами самок и самцов с СВО)	
млн/мл	**Самки**		**Самцы**	
	Контрольная	**ЛПС**	**Контрольная**	**ЛПС**
Т-лимфоциты (CD3+)	0,84 (0,52-1,37)	0,41 (0,22-0,91)	0,80 (0,27-1,19)	0,63 (0,47-0,83)
Т-хелперы (CD3+CD4+)	0,68 (0,40-0,97)	0,34 (0,19-0,81)	0,65 (0,22-0,93)	0,49 (0,4-0,68)
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	0,46 (0,24-0,81)	0,18 (0,08-0,39)	0,29 (0,09-0,622)	0,18 (0,14-0,44)
Двойные позитивные лимфоциты (CD4+CD8+)	0,31 (0,14-0,40)	0,11 (0,07-0,27)	0,16 (0,06-0,35)	0,13 (0,09-0,28)
В-лимфоциты (CD45+)	0,21 (0,16-0,34)	0,96 (0,49-1,58)	0,27 (0,15-0,49)	0,67 (0,27-1,29)
NK-клетки (CD314+)	0,015 (0,005-0,04)	0,014 (0,007-0,03)	0,02 (0,0-0,02)	0,03 (0,02-0,05)
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	0,007 (0,004-0,02)	0,007 (0,003-0,009)	0,003 (0,0009-0,014)	0,006 (0,004-0,02)
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	0,01 (0,007-0,014)	0,005 (0,004-0,018)	**0,004# (0,0008-0,017)**	**0,015* (0,01-0,026)**
Статистически значимые различия, значения			#=0,00001 (Т-регуляторные ЛФ) *=0,00001(Т-регуляторные ЛФ)	

Оценка информативности статистически значимо изменяющихся показателей у новорожденных самок и самцов крыс Вистар после введения ЛПС

Через сутки после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг количество статистически значимо изменяющихся показателей у новорожденных самок составило 12, а у самцов - 8. Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей было проведено вычисление информативности каждого признака по формуле Кульбака (табл. 3.3.8). В каждой группе были получены значения информативности и отобраны первые пять показателей, которые были максимальными (табл. 3.3.8). На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок выявлена максимальная значимость следующих параметров: уровня продукции ИФН-γ и ИЛ-2 клетками селезенки, уровня эндотоксина и содержания эстрадиола в сыворотке крови, число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких (табл. 3.3.8, рис. 3.3.12).

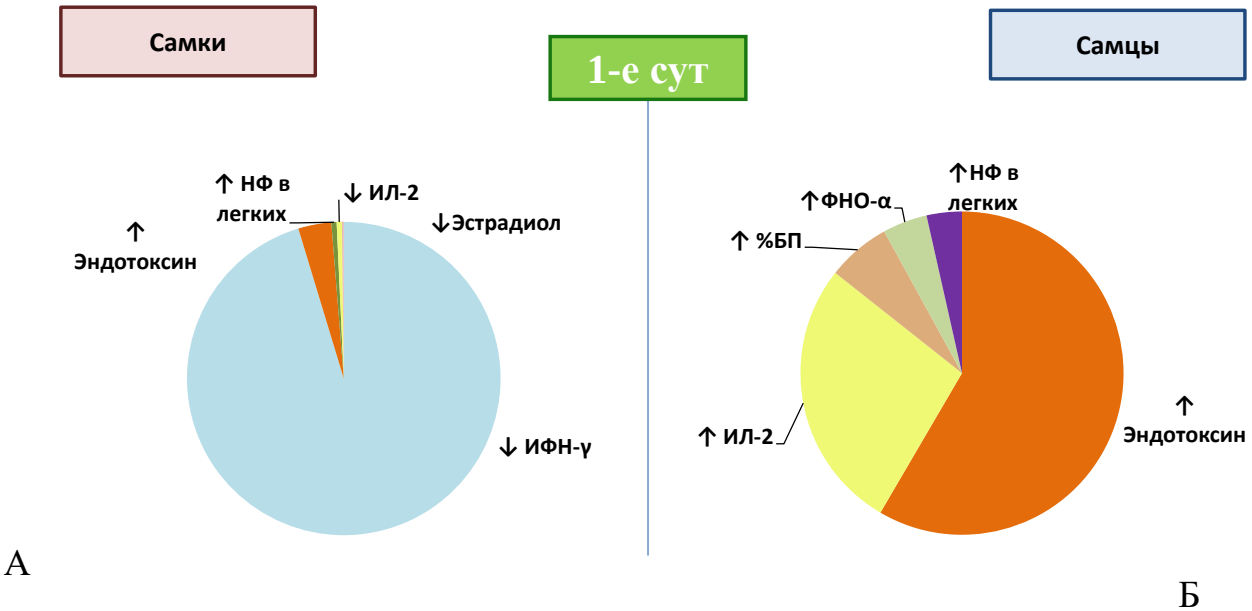
Через сутки после введения ЛПС новорожденным самцам максимальными показателями информативности были – уровень эндотоксина в сыворотке крови, уровень продукции ИЛ-2, объемная доля белой пульпы селезенки, показатель продукции ФНО-α и число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких (табл. 3.3.8, рис. 3.3.12).

Таким образом, через сутки после введения ЛПС у новорожденных самок наиболее значимыми в механизмах развития СВО были иммунологические нарушения – снижение уровня продукции ИФН-γ и ИЛ-2, а также увеличение уровня эндотоксина, снижение концентрации эстрадиола в сыворотке крови и выраженная воспалительная реакция в легких. При введении ЛПС новорожденным самцам наибольшую патогенетическую значимость имело изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови, тогда как иммунологические нарушения - повышение уровня продукции Тх1-цитокина ИЛ-2 и провоспалительного ФНО-α, увеличение объемной доли белой пульпы селезенки, а также воспалительные изменения в легких имели более низкие показатели информативности.

Таблица 3.3.8

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей через сутки после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг новорожденным самкам и самцам крыс Вистар

Новорожденные самки			Новорожденные самцы		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**
ИФН-γ	**↓ в 480**	**7072728**	**Эндотоксин**	**↑ в 71**	**878**
Эндотоксин	**↑ в 30**	**2535**	**ИЛ-2**	**↑ в 3,4**	**409**
НФ в легких	**↑ в 4**	**402**	**%БП**	**↑ в 3,2**	**95,6**
ИЛ-2	**↓ в 9,6**	**399**	**ФНО-α**	**↑ в 5,1**	**67,1**
Эстрадиол	**↓ в 1,7**	**142**	**НФ в легких**	**↑ в 6**	**53**
Баллы, печень	↑ в 5	96	Баллы, печень	↑ в 8	37
%БП	↑ в 2,9	53,8	Эстрадиол	↓ в 2,6	10,6
АлАТ	↑ в 4,9	33,4	АлАТ	↑ в 2	4,7
%КВ	↓ в 1,2	24,4			
ФНО-α	↓ в 1,9	7,8			
Неоптерин	↑ в 2	4,9			



А Б

Рис. 3.3.12. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е сутки после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг новорожденным самкам (А) и самцам (Б) крыс Вистар

Заключение

В результате исследования морфологических проявлений и иммунологических нарушений при СВО у новорожденных самок и самцов крыс Вистар были выявлены особенности его течения, связанные с полом.

По сравнению с новорожденными самцами контрольной группы у самок уровень эстрадиола в сыворотке крови был выше. По уровню прогестерона, тестостерона и кортикостерона, уровня эндотоксина и активности ферментов печени в сыворотке крови статистически значимых различий между группами самок и самцов не выявлено.

На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на фоне уменьшения содержания эстрадиола в сыворотке крови наблюдается повышение активности АлАТ и уровня эндотоксина. При развитии СВО более выраженное снижение содержания эстрадиола в сыворотке крови выявляется у самцов.

Через сутки после введения ЛПС у новорожденных самок и самцов в легких выявляется интраальвеолярный отек в 67% и 56% случаев соответственно, и наблюдается воспалительная реакция, характеризующаяся увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, количество которых у самцов было статистически значимо выше, чем у самок. В печени у крыс обоего пола обнаруживается выраженная дистрофия гепатоцитов и в единичных случаях – очаговые некрозы.

По данным морфометрического исследования у самок показатели объемной доли коркового вещества и, соответственно, индекса отношения объемной доли коркового вещества тимуса к мозговому были статистически значимо выше, чем у самцов. Однако половых различий между группами самок и самцов по показателям объемной доли белой и красной пульпы селезенки не выявлено. На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе как у новорожденных самок, так и самцов выявляется акцидентальная инволюция II стадии, а в селезенке - расширение белой пульпы. В отличие от самцов у самок наблюдается уменьшение показателя объемной доли коркового вещества тимуса при СВО.

При исследовании цитокинового профиля новорожденных крыс Вистар обнаружено, что у самок по сравнению с самцами выше уровень продукции клетками селезенки Тх1-цитокинов ИЛ-2 и ИФН-γ, а также уровень продукции провоспалительного цитокина ФНО-α. По уровню продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного цитокина ИЛ-6 статистически значимых различий между группами самок и самцов не выявлено. При СВО у самок наблюдается снижение уровня продукции ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α, что сопровождается увеличением концентрации неоптерина в сыворотке крови, а у самцов, напротив, – увеличение ИЛ-2 и ФНО-α на фоне снижения ИФН-γ.

Относительное и абсолютное количество субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у новорожденных крыс контрольных групп обоего пола не различается. Половые различия количества Т-регуляторных лимфоцитов обнаружены на 1-е сут после введения СВО: по сравнению с самками у самцов относительное количество CD4+CD25+Foxp3+ лимфоцитов выше.

На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок наиболее значимыми в механизмах развития СВО были иммунологические нарушения – снижение уровня продукции ИФН-γ и ИЛ-2, а также увеличение уровня эндотоксина, снижение концентрации эстрадиола в сыворотке крови и выраженная воспалительная реакция в легких. При введении ЛПС новорожденным самцам наибольшую патогенетическую значимость имело изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови, доминируя над повышением уровня продукции Тх1-цитокина ИЛ-2 и провоспалительного ФНО-α, а также увеличением объемной доли белой пульпы селезенки и воспалительными изменениями в легких.

3.4 Обсуждение

По данным клинических исследований распространенность ССВО и сепсиса, тяжесть их течения и показатели смертности варьируют в разных возрастных группах. Частота встречаемости ССВО и сепсиса у новорожденных детей в 10 раз выше, чем в препубертатном и половозрелом возрастных периодах (Watson R.S. et al., 2003). К сожалению, большинство исследований, посвященных ССВО и сепсису, проводятся, как правило, без учета возраста и пола (Klein S.L. et al., 2015).

Новорожденные дети более подвержены риску возникновения и развития ССВО, так как у них наблюдается физиологическое иммунодефицитное состояние (Wynn J.L., Wong H.R., 2010). По данным патологоанатомических исследований показано, что у новорожденных детей преобладание экссудативного компонента воспаления сочетается с выраженной генерализацией воспалительного процесса (Ивановская Т.Е., Гусман Б.С., 1981; Серов В.В., Пауков В.С., 1995). По сравнению со взрослыми людьми «незрелая» иммунная система новорожденных характеризуется низкой активностью Т-цитотоксических и повышенной – Т-регуляторных лимфоцитов, низким уровнем продукции цитокинов, преимущественной поляризацией иммунного ответа по Т-хелпер 2 типу (Adkins B. et al., 2004; Levy O., 2007). В сыворотке крови у новорожденных уровень продукции иммуноглобулинов всех классов низкий и не развита лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками барьерных органов (Wynn J. et al., 2010; Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014). Однако, показатели смертности от сепсиса у новорожденных детей ниже, чем у взрослых, и составляют 10-20% и 35-50%, соответственно (Angus D.C., et al., 2001; Vincent J.L. et al., 2006; Sprung C.L. et al., 2008). В отличие от сепсиса в

репродуктивном возрасте при неонатальном сепсисе у новорожденных отмечается низкий уровень генерации свободных радикалов кислорода и оксида азота, а также продукции провоспалительных цитокинов (Spasojevic I. et al., 2012).

Ранее было показано, что по сравнению с новорожденными самцами у самок крыс Вистар в сыворотке крови выше содержание эстрадиола (Симонова Е.Ю. и др., 2014; Kosyreva A., 2014). По уровню прогестерона, тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови статистически значимых различий между группами самок и самцов не выявлено. По данным A.T. Konkle и M.M. McCarthy (2011) в сыворотке крови у новорожденных самцов и самок крыс Спрейг-Доули на 1-е сут после рождения выявляется высокий уровень эстрадиола, который поступает с молоком матери. В литературе отсутствуют данные о половых различиях содержания эстрадиола и других стероидных гормонов в сыворотке крови у новорожденных. Нами обнаружена более высокая концентрация эстрадиола в сыворотке крови у новорожденных самок по сравнению с самцами.

По нашим данным через сутки после внутрибрюшинного введения ЛПС *E.coli* O26:B6 в высокой дозе 15 мг/мл, которая вызывает патологические изменения во внутренних органах и является для половозрелых крыс сублетальной, у новорожденных самок и самцов уменьшается содержание эстрадиола в сыворотке крови, причем более выраженное снижение его концентрации отмечается у самцов. Половых различий по показателям летальности от ЛПС не установлено, смертность составила 23% у новорожденных самок (9 крыс из 40) и 24% у самцов (9 крыс из 37).

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у новорожденных самок и самцов крыс Вистар не различался. На 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов развитие СВО сопровождалось увеличением содержания эндотоксина в сыворотке крови, уровень которого у самок превышал контрольные значения в 30, а у самцов – более чем в 60. Уровень эндогенного эндотоксина в крови как в норме, так и при СВО, зависит от количества грамотрицательных бактерий, колонизирующих толстую кишку, от проницаемости кишечного эпителия, а также от интенсивности клиренса эндотоксина моноцитами, гранулоцитами, связывания с липопротеинами и плазменными белками, нейтрализации антиэндотоксиновыми антителами и процессами детоксикации клетками печени (Arrieta M.C., et al., 2014; Adamik B., et al., 2015). В период новорожденности клиренс эндотоксина осуществляется преимущественно антиэндотоксиновыми антителами, поступающими с молоком матери, так как остальные системы детекции и элиминации ЛПС еще незрелые. В первые дни после рождения в материнском молоке также присутствует растворимый белок кластера дифференцировки – CD14 (sCD14) в концентрации, в 10 раз превышающей его содержание в крови (Ward T.L. et al., 2014). По данным R.L. Kitchens и соавт. (2001) sCD14, циркулирующий в крови, препятствует взаимодействию ЛПС с мембранной формой CD14 (mCD14) и TLR4 на моноцитах, в результате

чего эндотоксин элиминируется, поэтому уровень активации каскада провоспалительных реакций более низкий. Очевидно, в связи с этим у новорожденных снижается риск развития эндотоксинового шока и смертности от него.

При гистологическом исследовании легких и печени у новорожденных крыс Вистар половых различий морфофункционального состояния органов-мишеней для ЛПС выявлено не было. При развитии СВО через сутки после введения ЛПС у новорожденных самок и самцов в легких выявлялся интраальвеолярный отек у 67% и 56% животных соответственно, и наблюдается воспалительная реакция, характеризующаяся увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, количество которых у самцов было статистически значимо выше, чем у самок. Легкие – орган-мишень для эндотоксина при ССВО и сепсисе, а развивающаяся пневмония может быть первичным очагом сепсиса (Sands K.E. et al., 1997). Одним из критериев сепсиса и ССВО является острый респираторный дистресс-синдром, который характеризуется полнокровием кровеносных сосудов, интраальвеолярным и интерстициальным отеком, нейтрофильной инфильтрацией за счет повышения их адгезии к эндотелию сосудов (Kangelaris K.N. et al., 2015). Увеличение продукции молекул адгезии лейкоцитами и эндотелиальными клетками приводит к активации миграции нейтрофилов в легкие, а уровень экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках коррелирует с выраженностью полиорганной недостаточности и показателями смертности от сепсиса (Xing K. et al., 2012; Skibsted S. et al., 2013). Более высокое число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, выявленное нами у новорожденных самцов на 1-е сут развития СВО, свидетельствует о более выраженной воспалительной реакции в легких по сравнению с самками. По данным E. Giannoni и соавт. (2011) эстрадиол, концентрация которого выше у новорожденных самок, снижает продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и NO, и, по-видимому, определяет выраженность воспалительной реакции в легких при СВО.

На 1-е сут развития СВО в печени у новорожденных крыс обоего пола обнаруживаются выраженные дистрофические изменения гепатоцитов и у 2 из 19 животных – очаговые некрозы. Половых различий выраженности патологических изменений в печени у новорожденных крыс не выявлено. По данным биохимического исследования сыворотке крови у новорожденных самок и самцов на 1-е сут после введения ЛПС выявлено повышение активности АлАТ. АлАТ – эндогенный фермент из группы трансфераз, синтезируется внутриклеточно, и при повреждении гепатоцитов его активность в крови повышается (Камышников В.С., 2007), что сочетается с патологическими изменениями гепатоцитов, выявленными при гистологическом исследовании.

По данным Е.Ю. Симоновой и соавт. (2014) по сравнению с новорожденными самцами в тимусе у самок показатели объемной доли коркового вещества выше. Авторами не выявлено половых различий показателей объемных долей белой и красной пульпы у новорожденных крыс

Вистар, что согласуется с полученными нами данными. На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе как у новорожденных самок, так и у самцов выявляется акцидентальная инволюция II стадии, а в селезенке – увеличение объемной доли белой пульпы. В отличие от самцов, у которых при СВО не обнаружено изменений морфометрических показателей функциональных зон тимуса, у самок наблюдается снижение объемной доли коркового вещества. Размеры коркового вещества тимуса, как и его клеточность определяются балансом процессов пролиферации, миграции и гибели Т-лимфоцитов. Механизмы, ответственные за опустошение коркового вещества тимуса при инфекционно-воспалительных заболеваниях, до конца не изучены. Показано прямое негативное влияние ЛПС и энтеротоксина *E. coli* на клетки тимуса (Tsuji T. et al., 2000). В тимусе плодов и новорожденных при экспериментальной эндотоксинемии выявлено сужение коркового вещества тимуса на фоне снижения показателей пролиферации лимфоцитов и увеличения числа каспаза-3-положительных тимоцитов, увеличение числа NF-kB позитивных клеток в мозговом веществе, активация экспрессии мРНК Toll-подобных рецепторов - TLR2, TLR4 и провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-17 и ИФН-γ (Kuypers E. et al., 2013; Zhou Y.-J. et al., 2016). По нашим данным при СВО наблюдается сужение коркового вещества только у самок, что отражает более выраженную активацию иммунной системы по сравнению с самцами.

При исследовании цитокинового профиля у новорожденных крыс Вистар обнаружено, что у самок по сравнению с самцами выше уровень продукции клетками селезенки Тх1-цитокинов ИЛ-2 и ИФН-γ, а также провоспалительного цитокина ФНО-α. По уровню продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного цитокина ИЛ-6 статистически значимых различий между группами самок и самцов не выявлено. По данным литературы по сравнению с детьми старшего возраста новорожденные дети характеризуются более высокими показателями относительного числа Т-лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-2, и низкими – Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН-γ (Gasparoni A. et al., 2003). Wiegering V. и соавт. (2009) показали, что уровень продукции Т-хелперами ИФН-γ и ФНО-α с возрастом увеличивается. Кроме того, авторами было установлено, что по сравнению с новорожденными девочками у мальчиков выше уровень продукции ИЛ-2 лимфоцитами. Нами, однако, было показано, что уровень продукции Тх1-цитокинов, опосредующих клеточный иммунный ответ, у новорожденных самок крыс Вистар выше, чем у самцов, что может быть связано как с видовыми особенностями, так и с активацией реакций врожденного иммунитета вследствие иммуностимулирующего влияния эстрогенов

При СВО у новорожденных самцов в культуральной жидкости клеток селезенки выявлено увеличение содержания таких цитокинов, как ИЛ-2 и ФНО-α. Напротив, у самок наблюдалось снижение продукции ИЛ-2, ФНО-α и ИФН-γ. По немногочисленным данным литературы, развитие неонатального сепсиса у детей (без учета пола) сопровождается повышением в сыворотке крови концентрации провоспалительных цитокинов, в частности ИФН-γ и ФНО-α

(Finnerty C.C. et al., 2007; Chaudhry H. et al., 2013; Lv B. et al., 2014). Однако исследования, посвященные половым различиям продукции цитокинов при сепсисе и ССВО у новорожденных, в литературе не представлены. Снижение продукции провоспалительных цитокинов на 1-е сут развития СВО у самок может определять менее выраженную воспалительную реакцию в легких по сравнению с самцами.

По данным, полученным совместно с Е.Ю. Симоновой (2014), в периферической крови у новорожденных самок выше относительное и абсолютное количество Т-хелперов, активированных Т-хелперов, Т-регуляторных и В-лимфоцитов. В литературе представлены единичные работы по изучению половых различий субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у новорожденных детей. I.M. Lisse и соавт. (1997) показали, что у новорожденных девочек выше иммунорегуляторный индекс по сравнению с мальчиками, что согласуется с полученными нами данными. Другими авторами было выявлено, что у девочек в крови выше абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов (Bartlett J.A. et al., 2001). На 1-е сут развития СВО у новорожденных крыс Вистар обоего пола не было выявлено изменений в абсолютном и относительном содержании основных субпопуляций лимфоцитов, за исключением Т-регуляторных. Нами показано, что через сутки после введения ЛПС в периферической крови у самцов относительное число Т-регуляторных лимфоцитов выше по сравнению с самками. По данным, полученным S.G. Zheng (2013), дифференцировка наивных CD4+ лимфоцитов в Т-регуляторные клетки активируется в присутствии ИЛ-2 и TGF-β, а дифференцировка в Тх17-лимфоциты – ИЛ-6 и TGF-β. По нашим данным у самок на 1-е сут развития СВО наблюдалось снижение уровня продукции ИЛ-2, тогда как у самцов – напротив, его повышение, что, возможно, и опосредует более высокое число Т-регуляторных клеток в крови у самцов.

Таким образом, морфофункциональное и иммунологическое проявление СВО у новорожденных самцов и самок крыс Вистар имеет ряд особенностей. По сравнению с самцами в ранние сроки развития СВО у самок снижение содержание эстрадиола в сыворотке крови менее выражено, но выше уровень эндотоксина в крови. Высокий уровень эндотоксина в сыворотке крови у самок с СВО может быть связан с дефектами системы его детекции и элиминации, в том числе с функционально незрелым адаптивным иммунным ответом. Менее выраженная воспалительная реакция в легких у самок сопровождается выраженной активацией иммунной системы, что проявляется в усиленной миграции лимфоцитов из тимуса и сужением его коркового вещества. В культуре клеток селезенки у новорожденных самок выявлена супрессия Тх1-типа и ослабление провоспалительного иммунного ответа.

Напротив, у самцов на фоне менее выраженной эндотоксинемии и более низкого содержания эстрадиола в сыворотке крови, воспалительная реакция в легких более выражена.

При развитии СВО у новорожденных самцов по сравнению с самками не выявлено изменений объемной доли коркового вещества тимуса, в периферической крови у них было выше содержание Т-регуляторных клеток, и наблюдалось повышение секреции ИЛ-2 и ФНО-α клетками селезенки. Выявленные иммунологические нарушения при СВО у новорожденных самцов характеризуют активацию провоспалительных реакций, что сопровождается выраженными воспалительными изменениями в органах-мишенях.

Оценка информативности диагностически значимых различий показала, что при развитии СВО у новорожденных самок основную роль играют иммунологические нарушения, в первую очередь ослабление провоспалительных реакций, тогда как у самцов, наибольшая патогенетическая значимость принадлежит эндотоксинемии и активации провоспалительного иммунного ответа.

Глава 4 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У КРЫС ВИСТАР ПРЕПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

С целью моделирования СВО десятидневным крысам Вистар обоего пола внутрибрюшинно вводили ЛПС *E.coli* (O26:B6) в дозе 15 мг/кг, которая при введении вызывает патологические изменения внутренних органов и является для крыс сублетальной (Макарова О.В. и соавт., 2016). Животных выводили из эксперимента на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС. Выбор сроков забоя обосновывался тем, что через сутки после введения ЛПС развиваются наиболее выраженные иммунологические нарушения и патологические изменения в печени и легких, характерные для СВО. Срок 4-е сут после введения ЛПС был выбран в связи с тем, что в этот период жизни у крыс (14-е сут) не происходит изменений уровня половых стероидных гормонов (Suckow M.A. et al., 2005). Тогда как в более поздние сроки постнатального онтогенеза (17-21 день) у крыс наблюдается половое созревание, что сопровождается увеличением концентрации эстрадиола у самок и общего тестостерона у самцов (Suckow M.A. et al., 2005).

4.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у самок крыс Вистар препубертатного периода

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самок было выявлено снижение содержание прогестерона. Концентрация других стероидных половых гормонов – эстрадиола и общего тестостерона, в эти сроки статистически значимо не изменялась по сравнению с контрольной группой. На 4-е сутки эксперимента наблюдалось снижение концентрации общего тестостерона и эстрадиола (табл. 4.1.1). Содержание прогестерона в эти сроки было ниже показателей контрольной группы и не отличалось от значений в группе крыс, исследование которых проводилось на 1-е сут развития СВО.

Таблица 4.1.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=8)	87,2 (75,59-93,43)^{1*}	17,6 (14,82-18,93)^{1}	0,80 (0,44-1,02)^{1}
ЛПС 1-е сут (n=10)	80,97 (65,6-114,8)^{2}	4,33 (2,84-10,58)^{2}	0,70 (0,41-1,11)^{2}
ЛПС 4-е сут (n=7)	49,31 (46,5-56,2)^{3}	9,64 (2,3-14,2)^{3}	0,40 (0,34-0,41)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	$0{,}5105^{1-2}$ $0{,}0033^{1-3}$ $0{,}0064^{2-3}$	$0{,}0032^{1-2}$ $0{,}0270^{1-3}$ $0{,}0759^{2-3}$	$0{,}9611^{1-2}$ $0{,}0530^{1-3}$ $0{,}0281^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС наблюдается снижение содержания стероидных половых гормонов в сыворотке крови, что может быть связано с нарушением их синтеза и метаболизма вследствие повреждения эндотоксином, в первую очередь, клеток надпочечников и печени.

Морфологические изменения в легких у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании в легких у самок крыс Вистар препубертатного периода в контрольной группе слизистая оболочка бронхов была выстлана кубическим реснитчатым эпителием, который располагался в 1-2 ряда. В их просветах выявлялись единичные десквамированные эпителиальные клетки. Просветы альвеол и альвеолярных ходов были широкими и воздушными, межальвеолярные перегородки тонкие, в них выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы при увеличении 640 (рис. 4.1.1А, Б).

На 1-е сут после введения ЛПС в просветах бронхов выявлялись гомогенные эозинофильные массы и единичные десквамированные эпителиальные клетки (рис. 4.1.1В). В неравномерно утолщенных межальвеолярных перегородках обнаруживалось большое число нейтрофилов (рис. 4.1.1Г). У всех самок из группы выявлен интраальвеолярный отек – гомогенные эозинофильные массы, частично или полностью заполняющие просветы альвеол и альвеолярных ходов (рис. 4.1.1В).

На 4-е сут развития СВО в альвеолах и альвеолярных ходах интраальвеоляный отек сохранялся, но он был менее распространенным (рис. 4.1.1Д). В просветах бронхов определялись эозинофильные массы и десквамированный эпителий. В утолщенных межальвеолярных перегородках количество полиморфноядерных лейкоцитов было высоким, что подтверждалось данными морфометрического исследования (табл. 4.1.2, рис. 4.1.1Е).

Таблица 4.1.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Число нейтрофилов на площади 25 тыс. мкм^2
Контрольная (n=10)	2,60 (1,90-3,55)^{1*}
ЛПС1-е сут (n=9)	8,50 (8,40-9,70)^{2}
ЛПС 4-е сут (n=8)	10,00 (9,20-10,70)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	0,0015$^{1-2}$ 0,0023$^{1-3}$ 0,0801$^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у десятидневных самок в легких наблюдался интраальвеолярный отек и увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса в них после введения ЛПС. На 4-е сут интраальвеолярный отек был менее выражен, однако число нейтрофилов оставалось высоким, т.е. острый воспалительный процесс у самок крыс Вистар в эти сроки сохранялся.

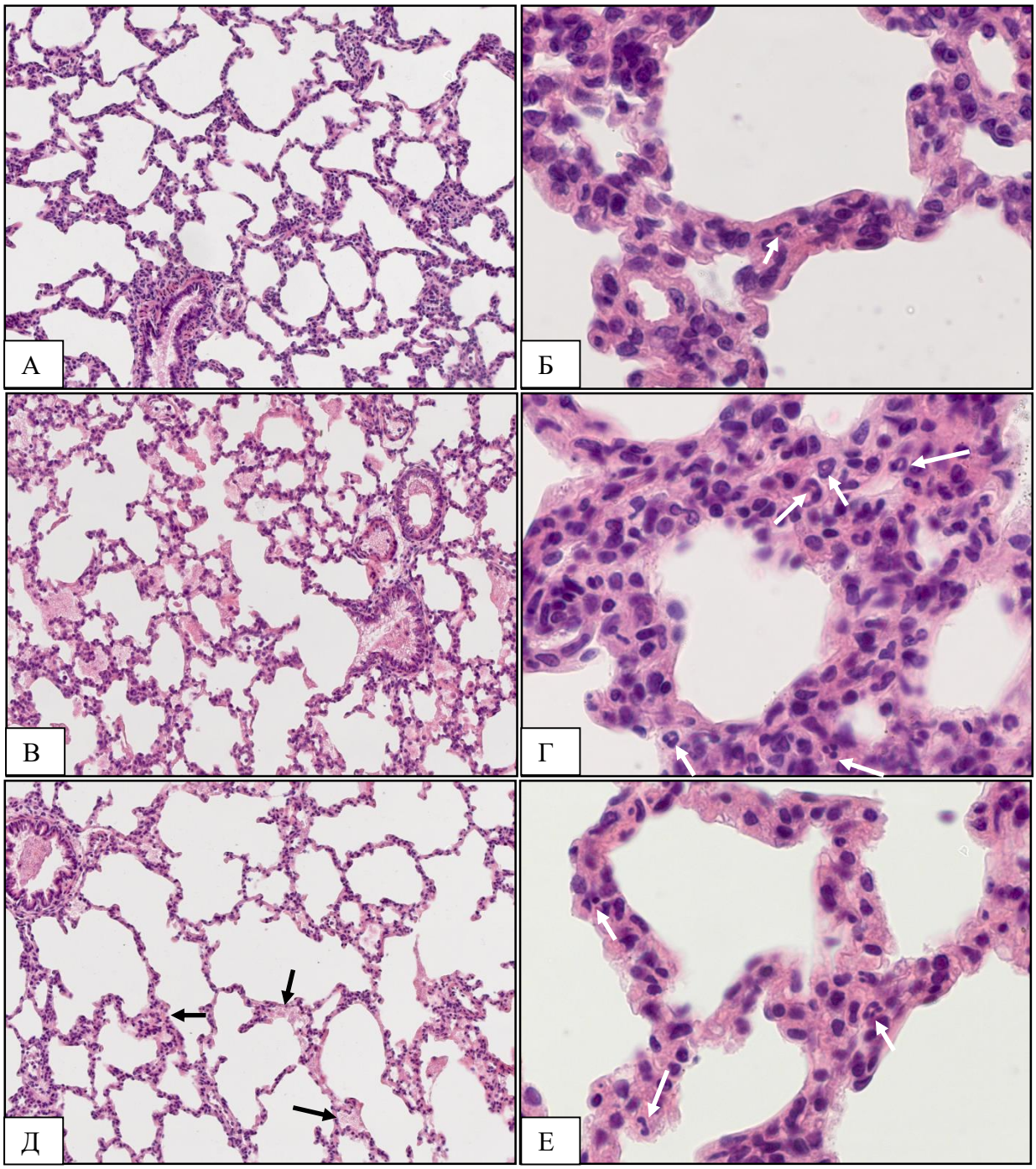


Рис. 4.1.1. Морфологическая характеристика легких у десятидневных самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные; Б – в межальвеолярных перегородках единичные нейтрофилы. *1-е сут после введения ЛПС*: В - обширные зоны интраальвеолярного отека, просветы альвеол и альвеолярных ходов заполнены эритроцитами и эозинофильными массами; Г - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – единичные альвеолы и альвеолярные ходы заполнены гомогенными эозинофильными массами; Е – нейтрофилы в межальвеолярных перегородках. Черные стрелки указывают на мелкие очаги интраальвеолярного отека, белые – на нейтрофилы в межальвеолярных перегородках. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 320; Б, Г, Е 640

Морфологические изменения печени у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании печени у десятидневных самок контрольной группы дистрофических изменений выявлено не было, в цитоплазме гепатоцитов определялась мелкая базофильная зернистость (рис. 4.1.2 А, Б). В соединительной ткани по ходу триад обнаруживались единичные гистиоциты и лимфоциты. Эндотелий центральных вен уплощен.

На 1-е сут после введения ЛПС в печени у самок десятидневных крыс Вистар выявлены ландшафтообразные некрозы (у 1 животного из 10), очаговые некрозы (у 6 животных из 10), тотально распространенная дистрофия гепатоцитов, более выраженная на периферии долек (рис. 4.1.2 В, Г). Обнаруживалось неравномерное полнокровие вен и синусоидных капилляров, стазы, сладжи. По ходу балок определялись единичные в поле зрения неэпителиальные клеточные элементы и небольшое число мегакариоцитов.

На 4-е сут после введения ЛПС у самок в печени были распространенные дистрофические изменения гепатоцитов (рис. 4.1.2 Д, Е), в единичных случаях определялись очаговые некрозы (у 1 животного из 8).

При полуколичественной оценке выраженности патологических изменений в печени на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС альтеративные изменения – дистрофия и некрозы были более выражены на 1-е сут (табл. 4.1.3).

Таблица 4.1.3

Показатель дистрофических и некротических изменений клеток печени у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)
Контрольная (n=8)	0,75 (0,25-1,25)^{1*}
ЛПС 1-е сут (n=10)	4,0 (3,5-4,0)^{2}
ЛПС 4-е сут (n=7)	3,0 (3,0-3,5)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	0,0004$^{1-2}$ 0,001$^{1-3}$ 0,04$^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, в печени у самок на 1-е сут развития СВО выявляются выраженные дистрофические и некротические изменения, которые сохраняются и на 4-е сут после введения ЛПС.

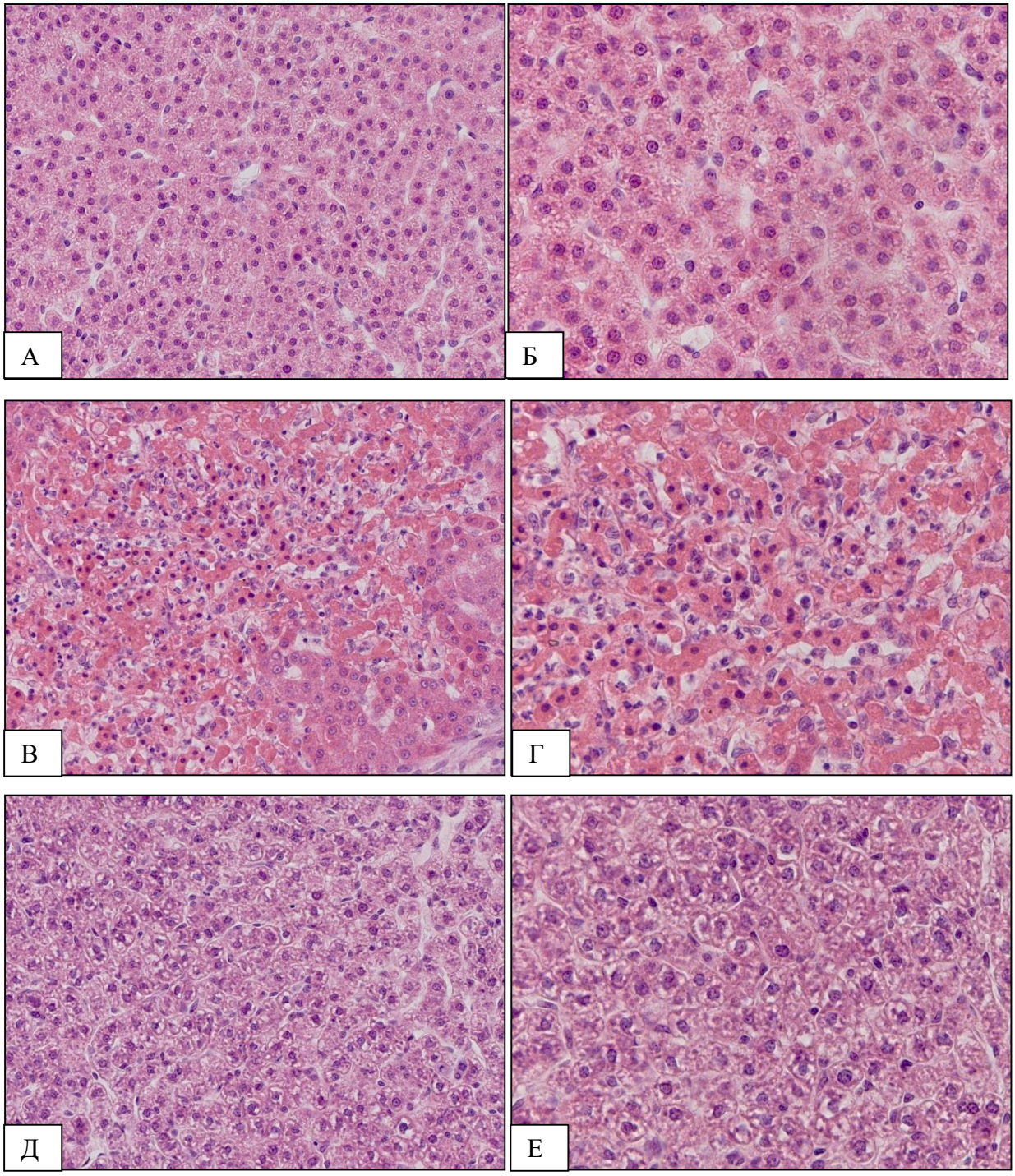


Рис. 4.1.2. Морфологическая характеристика печени у десятидневных самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – балочное строение печени сохранено, дистрофических изменений нет; Б – в цитоплазме гепатоцитов мелкая базофильная зернистость. *1-е сут после введения ЛПС*: В - обширные некрозы; Г – в зоне некроза фрагменты ядер гепатоцитов, нейтрофилы. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – распространенная крупнокапельная дистрофия гепатоцитов; Е – дистрофические изменения гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 400; Б, Г, Е 640

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По данным биохимического исследования уровень активности АлАТ в сыворотке крови у самок на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС был статистически значимо выше показателей у крыс контрольной группы (табл. 4.1.4). Уровень активности другого фермента - АсАТ, в эти сроки эксперимента у опытных животных достоверно не изменялся по сравнению с контрольной группой (табл. 4.1.4).

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у десятидневных самок крыс Вистар наблюдалось увеличение уровня эндотоксина, на 4-е сут этот показатель оставался выше контрольных значений и не отличался от такового на более раннем сроке развития СВО (табл. 4.1.4).

По сравнению с контрольной группой на 1-е сут развития СВО содержание кортикостерона снижалось. На 4-е сут после введения ЛПС концентрация кортикостерона в крови самок была статистически значимо выше контрольных значений и показателей группы животных на более раннем сроке развития СВО (табл. 4.1.4).

Таблица 4.1.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=8)	27^{1} (25-29)	173^{1} (169-213)	$2,60^{1*}$ (1,26-4,75)	$623,75^{1}$ (494,5-692,5)
ЛПС 1-е сут (n=9)	59^{2} (41-60)	200^{2} (161-366)	430^{2} (417,5-451,25)	$231,15^{2}$ (103,1-279,6)
ЛПС 4-е сут (n=7)	40^{3} (40-47)	189^{3} (162-215)	270^{3} (23,34-458,75)	1130^{3} (947,5-1295)
Статистическая значимость различий (p)	$0,0317^{1-2}$ $0,0159^{1-3}$ $0,5515^{2-3}$	$0,8412^{1-2}$ $0,8412^{1-3}$ $0,8412^{2-3}$	$0,0289^{1-2}$ $0,0159^{1-3}$ $1,000^{2-3}$	$0,0005^{1-2}$ $0,0205^{1-3}$ $0,0068^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у десятидневных самок наблюдаются функциональные нарушения в печени, выраженная эндотоксинемия на фоне снижения содержания кортикостерона. На 4-е сут после введения ЛПС высокая активность АлАТ и эндотоксинемия сохраняются, тогда как по сравнению с контрольной группой концентрация кортикостерона возрастает.

Морфологические изменения тимуса и относительное содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По данным морфологического исследования в тимусе у десятидневных самок преобладало корковое вещество, которое было представлено плотно расположенными лимфоцитами и эпителиальными ретикулярными клетками (рис. 4.1.3 А). Субкапсулярная зона тимуса у десятидневных самок была образована 8-12 рядами лимфобластов, среди которых выявлялись единичные делящиеся клетки (рис. 4.1.3 Б). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 4.1.3 А). Мозговое вещество тимуса было представлено равномерно распределенными эпителиальными ретикулярными клетками и лимфоцитами. В мозговом веществе выявлялись единичные тимические тельца I-II фаз развития, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток.

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе у самок выявлена акцидентальная инволюция II-III стадии, которая характеризовалась сужением коркового вещества (табл. 4.1.5), картиной «звездного неба» (рис. 4.1.3 В) – появление светлых зон в корковом веществе, в которых выявлялись фрагменты ядер и макрофаги. Субкапсулярная зона была узкой, состояла из 3-5 рядов лимфобластов, у 6 из 10 самок она очагово не выявлялась. Среди тимических телец I-II фаз развития, состоящих из 3-5 и 5-7 эпителиальных ретикулярных клеток, были тимические тельца с накоплением кератогиалина. При морфометрическом исследовании по сравнению с контрольной группой у самок с СВО обнаружено сужение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны (табл. 4.1.5).

На 4-е сут после введения ЛПС строение тимуса не отличалось от контрольной группы. Корковое вещество было широким, границы между корковым и мозговым веществом четкие (рис. 4.1.3 Д). Субкапсулярная зона тимуса широкая, состояла из 7-10 рядов лимфобластов. В мозговом веществе тимические тельца I-III фаз развития, в том числе и с накоплением кератогиалина. Расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны на 4-е сут СВО по сравнению с более ранним сроком исследования было подтверждено морфометрическими данными (табл. 4.1.5).

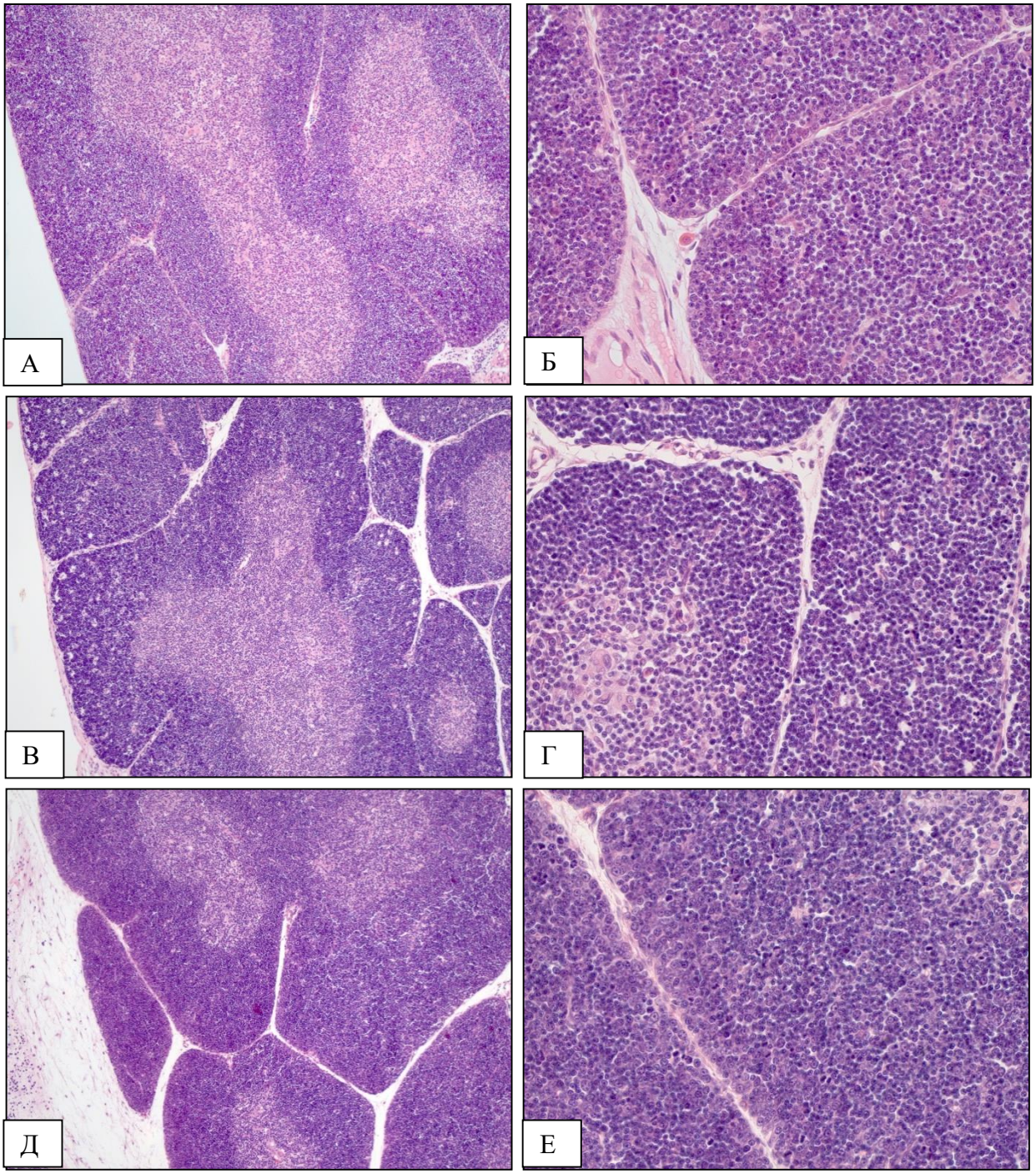


Рис. 4.1.3. Морфологическая характеристика тимуса у десятидневных самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – преобладает корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие; Б – субкапсулярная зона широкая, состоит из 6 рядов лимфобластов. *1-е сут после введения ЛПС*: В – картина «звездного неба» в корковом веществе; Г – субкапсулярная зона отсутствует, в мозговом веществе тимическое тельце, состоящее из 3-5 эпителиальных ретикулярных клеток. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие; Е – широкая субкапсулярная зона, состоит из 5-8 рядов лимфобластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 400

Таблица 4.1.5

Морфометрическая характеристика тимуса у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина субкапсулярной зоны, мкм
	КВ	МВ		
Контрольная (n=11)	74,39[1*] (68,49-75,57)	25,61[1] (24,43-31,51)	3,22[1] (2,49-3,61)	46,52[1] (43,82-47,72)
ЛПС 1-е сут (n=9)	62,42[2] (44,84-69,50)	37,58[2] (30,50-55,16)	1,86[2] (0,83-2,44)	17,78[2] (7,96-19,15)
ЛПС 4-е сут (n=6)	81,31[3] (79,37-83,68)	18,69[3] (16,32-20,63)	4,38[3] (3,85-5,13)	47,23[3] (44,93-52,16)
Статистическая значимость различий (p)	0,006[1-2] 0,07[1-3] 0,16[2-3]	0,006[1-2] 0,07[1-3] 0,16[2-3]	0,006[1-2] 0,07[1-3] 0,16[2-3]	0,014[1-2] 0,46[1-3] 0,009[2-3]

Примечания. КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество.
Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

По сравнению с контрольной группой у крыс на 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе, включая $CD3^+$-лимфоциты, повышалось (табл. 4.1.6).

Таблица 4.1.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^-$)	$CD3^+$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	15,1 (6,1-20,0)	10,9 (3,7-12,0)
ЛПС 1-е сут (n=6)	33,1 (22,6-53,4)	13,8 (13,2-20,0)
ЛПС 4-е сут (n=6)	-	-
Статистическая значимость различий (p)	0,049	0,049

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самок крыс Вистар в тимусе выявлена акцидентальная инволюция II-III стадий, что сопровождалось выраженной апоптотической гибелью тимоцитов, в том числе $CD3^+$-лимфоцитов. На 4-е сут после введения ЛПС наблюдалось восстановление функциональных зон органа, но в этот период расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны свидетельствовало об акцидентальной инволюции I стадии.

Морфологические изменения селезенки у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По данным морфологического исследования белая пульпа селезенки у десятидневных самок была представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной (рис. 4.1.4 А). Лимфоидные узелки в селезенке не выявлялись. В красной пульпе обнаруживались равномерно распределенные незрелые и зрелые форменные элементы крови, макрофаги и мегакариоциты (рис. 4.1.4 Б).

На 1-е сут после введения ЛПС в селезенке самок белая пульпа была представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной, которая располагалась вокруг сосудов в 5-6 рядов. Лимфоидные узелки не выявлялись (рис. 4.1.4 В). В красной пульпе обнаружено неравномерное полнокровие капилляров, большое число диффузно рассеянных нейтрофилов, лимфобластов, фрагменты ядер погибших клеток, лимфобласты и мегакариоциты (рис. 4.1.4 Г).

На 4-е сут развития СВО в селезенке у десятидневных самок ПАЛМ-зона была представлена 5-8 рядами лимфоцитов (рис. 4.1.4 Д). В красной пульпе выявлялось большое число мегакариоцитов, незрелых и зрелых клеток крови, неравномерное полнокровие сосудов (рис. 4.1.4 Е).

При морфометрической оценке объемной доли функциональных зон селезенки у десятидневных самок крыс Вистар по сравнению с контрольной группой в разные сроки после введения ЛПС статистически значимых различий не выявлено (табл. 4.1.7).

Таблица 4.1.7

Морфометрическая характеристика селезенки у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения БП к КП, усл. ед.
	БП	КП	
Контрольная (n=10)	$11,3^{1*}$ (10,7-14,7)	$88,7^{1}$ (85,3-89,3)	$0,13^{1}$ (0,12-0,17)
ЛПС 1-е сут (n=10)	$13,0^{2}$ (10,25-18,0)	$87,0^{2}$ (82,0-89,75)	$0,14^{2}$ (0,11-0,22)
ЛПС 4-е сут (n=8)	$11,7^{3}$ (9,7-14)	$88,3^{3}$ (86,0-90,3)	$0,13^{3}$ (0,11-0,16)
Статистическая значимость различий (p)	$0,85^{1-2}$ $0,46^{1-3}$ $0,28^{2-3}$	$0,85^{1-2}$ $0,46^{1-3}$ $0,28^{2-3}$	$0,85^{1-2}$ $0,46^{1-3}$ $0,28^{2-3}$

Примечания. БП – белая пульпа, КП – красная пульпа.

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, в разные сроки после введения ЛПС десятидневным самкам крыс Вистар изменений показателей объемных долей функциональных зон селезенки выявлено не было.

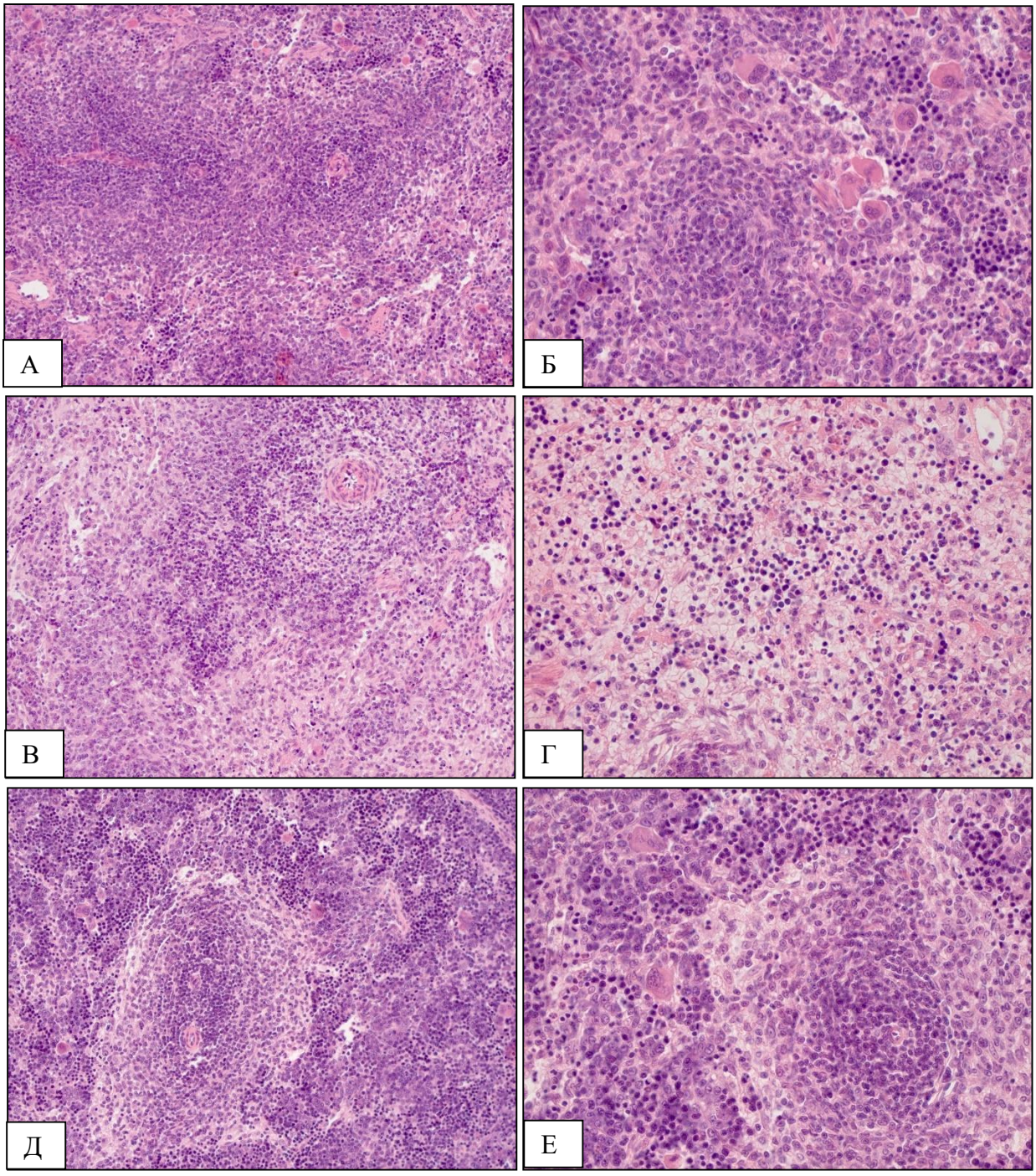


Рис. 4.1.4. Морфологическая характеристика селезенки у десятидневных самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – белая пульпа представлена ПАЛМ-зоной, лимфоидные узелки не выявляются; Б – скопления лимфобластов, в красной пульпе мегакариоциты, форменные элементы крови. *1-е сут после введения ЛПС*: В – белая пульпа представлена ПАЛМ-зоной, расположенной вокруг сосудов в 6-8 рядов; Г – в красной пульпе зрелые и незрелые форменные элементы крови, небольшое число лимфоцитов, фрагменты ядер. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – белая пульпа вокруг сосудов, лимфоидные узелки не выявляются, форменные элементы крови, мегакариоциты; Е – ПАЛМ-зона представлена 7-8 рядами лимфоцитов, в красной пульпе лимфобласты, мегакариоциты, скопления форменных элементов крови. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 200; Б, Г, Е 400

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

Через сутки после введения ЛПС у самок было выявлено снижение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α. В сыворотке крови у самок на 1-е сут после введения ЛПС увеличивалось содержание неоптерина, а концентрация TGF-β статистически значимо снижалась. Показатели содержания ИЛ-6 и ИФН-γ в культуральной жидкости клеток селезенки у животных опытных групп статистически значимо не отличались от контрольных значений (табл. 4.1.8).

На 4-е сут после введения ЛПС уровень продукции ИЛ-2 и ФНО-α клетками селезенки оставался на низком уровне и отличий от значений другой опытной группы выявлено не было. Показатель содержания ИЛ-4 в культуральной жидкости нормализовался. На 4-е сут развития СВО концентрация ИФН-γ снижалась, однако его показатель статистически значимо не отличался от такового в группе, исследованной на более раннем сроке после введения ЛПС. В сыворотке крови содержание неоптерина и TGF-β повышалось по сравнению с 1-ми сут после введения ЛПС и не отличалось от значений контрольных групп (табл. 4.1.8).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самок наблюдалась супрессия продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов клетками селезенки на фоне активации Тх1-типа иммунного ответа, о чем свидетельствовало повышение концентрации неоптерина в крови. На 4-е сут эксперимента уровень продукции Тх1-цитокинов – ИЛ-2 и ИФН-γ, а также провоспалительного ФНО-α оставались сниженными, тогда как содержание остальных исследуемых цитокинов нормализовалось.

Таблица 4.1.8

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, и концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови у десятидневных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Среда	Цитокины	Контрольная (n=10)	ЛПС 1-е сут (n=6)	ЛПС 4-е сут (n=7)	Статистическая значимость различий (p)
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	**ИЛ-2**	8000[1*] (6672-8000)	2586[2] (636-6138)	2198[3] (1383-4166)	0,003[1-2] 0,002[1-3] 0,25[2-3]
	ИЛ-4	47,15[1] (7,15-126,3)	8,33[2] (0,46-44,5)	25,00[3] (19,79-72,9)	0,03[1-2] 0,47[1-3] 0,11[2-3]
	ИЛ-6	1992[1] (1634-2976)	2243[2] (1392-3492)	не опр.	0,83[1-2]
	ИФН-γ	85,48[1] (13,69-695,2)	61,44[2] (7,83-211,3)	7,83[3] (7,83-19,07)	0,39[1-2] 0,009[1-3] 0,48[2-3]
	ФНО-α	470,40[1] (63,23-1171,4)	19,14[2] (0-85,20)	38,27[3] (0-100,2)	0,01[1-2] 0,03[1-3] 0,67[2-3]
Сыворотка крови	**TGF-β (нг/мл)**	41,29[1] (31,14-52,08)	17,99[2] (13,77-26,57)	54,32[3] (32,82-62,74)	0,011[1-2] 0,45[1-3] 0,03[2-3]
	Неоптерин (нмоль/л)	2,74[1] (2,26-3,91)	4,62[2] (3,98-5,76)	3,13[3] (2,29-5,61)	0,018[1-2] 0,48[1-3] 0,1[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения, не опр. – не определяли

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у десятидневных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По сравнению с контрольной группой при СВО у десятидневных самок крыс Вистар было выявлено снижение относительного и абсолютного числа Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов и Т-цитотоксических, незрелых двойных позитивных Т-лимфоцитов ($CD4^+CD8^+$) и регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 4.1.9).

Таблица 4.1.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у десятидневных самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Субпопуляция	Относительное число, %		Абсолютное число, млн/мл	
	Контрольная (n=8)	**ЛПС (n=8)**	**Контрольная (n=8)**	**ЛПС (n=8)**
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$15,7^{1*}$ (13,5-24,1)	$\mathbf{6,8^2}$ (5,0-11,2)	$4,3^1$ (3,5-7,0)	$\mathbf{1,7^2}$ (1,4-1,9)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$12,5^3$ (10,9-18,6)	$\mathbf{5,8^4}$ (3,9-9,7)	$3,4^3$ (2,9-5,4)	$\mathbf{1,5^4}$ (0,9-1,7)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$4,6^5$ (3,8-7,2)	$\mathbf{1,6^6}$ (1,2-2,2)	$1,2^5$ (1,0-2,2)	$\mathbf{0,4^6}$ (0,2-0,5)
Двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$)	$2,0^7$ (1,4-2,2)	$\mathbf{0,6^8}$ (0,4-1,1)	$0,6^7$ (0,4-0,6)	$\mathbf{0,12^8}$ (0,06-0,2)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$10,8^9$ (7,0-13,1)	$8,9^{10}$ (5,1-11,7)	$3,0^9$ (2,2-3,6)	$1,8^{10}$ (0,9-3,1)
NK-клетки ($CD314^+$)	$2,8^{11}$ (1,5-6,3)	$2,7^{12}$ (0,65-5,5)	$0,8^{11}$ (0,4-1,7)	$0,7^{12}$ (0,1-1,8)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$1,9^{13}$ (1,2-4,1)	$2,1^{14}$ (1,0-4,5)	$0,5^{13}$ (0,3-1,1)	$0,3^{14}$ (0,1-0,5)
Регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$3,8^{15}$ (1,9-4,3)	$\mathbf{0,9^{16}}$ **(0,4-2,1)**	$1,0^{15}$ (0,6-1,1)	$\mathbf{0,07^{16}}$ (0,02-0,3)
Статистически значимые различия, значения	$0,041^{1-2}$ $0,049^{3-4}$ $0,009^{5-6}$ $0,007^{7-8}$	$0,46^{9-10}$ $0,63^{11-12}$ $0,94^{13-14}$ $0,049^{15-16}$	$0,009^{1-2}$ $0,006^{3-4}$ $0,006^{5-6}$ $0,01^{7-8}$	$0,14^{9-10}$ $0,72^{11-12}$ $0,21^{13-14}$ $0,02^{15-16}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС наблюдается снижение числа основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, что, очевидно, обусловлено их гибелью и усилением миграции в барьерные органы и ткани.

Заключение

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у десятидневных самок Вистар развивается СВО, который характеризуется распространенным интраальвеолярным отеком легких, увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, выраженными некротическими и дистрофическими изменениями гепатоцитов, повышением активности АлАТ, концентрации эндотоксина и неоптерина в сыворотке крови на фоне снижения содержания кортикостерона и прогестерона. В тимусе у самок развивается акцидентальная инволюция II-III стадии со снижением объемной доли коркового вещества и выраженным апоптозом тимоцитов. В периферической крови выявлено снижение количества Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов,

Т-цитотоксических, незрелых двойных позитивных и регуляторных Т-лимфоцитов. Уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α клетками селезенки и содержание TGF-β сыворотке крови снижались.

На 4-е сут развития СВО в этом возрастном периоде у самок выявлен интраальвеолярный отек, воспалительные изменения в межальвеолярных перегородках, о чем свидетельствует высокое число нейтрофилов в них, выраженные дистрофические и некротические изменения в печени, повышение уровня эндотоксина, кортикостерона и активности АлАТ в сыворотке крови на фоне снижения эстрадиола и прогестерона. В тимусе акцидентальная инволюция I стадии с увеличением объемной доли коркового вещества. Уровень продукции ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α остается в эти сроки низким на фоне нормализации содержания ИЛ-4 в культуре клеток селезенки, а также TGF-β и неоптерина в сыворотке крови.

По сравнению с поздним сроком развития СВО на 1-е сут после введения ЛПС у самок воспалительные изменения в органах-мишенях, как и эндотоксинемия более выражены. В органах иммунной системы наблюдается гибель лимфоцитов, что сопровождается акцидентальной инволюцией тимуса II-III стадий. На фоне снижения концентрации кортикостерона и прогестерона в сыворотке крови наблюдается уменьшение уровня продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В отличие от 1-х сут развития СВО на 4-е сут воспалительные изменения в печени и легких и эндотоксинемия менее выражены. В тимусе наблюдается восстановление функциональных зон, и расширение коркового вещества. В этот срок остаются на низком уровне показатели продукции Тх1-цитокинов – ИЛ-2 и ИФН-γ и провоспалительного ФНО-α клетками селезенки. В этот период развития СВО у десятидневных самок на фоне повышения содержания противовоспалительного гормона кортикостерона в сыворотке крови наблюдается снижение женских половых стероидных гормонов – эстрадиола и прогестерона, которые в физиологических концентрациях оказывают иммуностимулирующее действие.

4.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар препубертатного периода

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самцов крыс Вистар было выявлено повышение содержание эстрадиола и тестостерона. Концентрация прогестерона в эти сроки статистически значимо не изменялась по сравнению с контрольной группой. На 4-е сутки эксперимента наблюдалось снижение концентрации эстрадиола и общего тестостерона по сравнению с более ранним сроком эксперимента (табл. 4.2.1). Содержание прогестерона в оба срока после введения ЛПС не отличалось от контрольных значений.

Таблица 4.2.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=9)	79,26 (70,35-89,85)[1*]	10,58 (5,70-12,26)[1]	0,42 (0,33-0,65)[1]
ЛПС 1-е сут (n=10)	110,6 (87,96-126,08)[2]	10,28 (3,09-15,72)[2]	0,84 (0,60-1,10)[2]
ЛПС 4-е сут (n=8)	72,28 (65,64-86,44)[3]	9,03 (4,11-15,14)[3]	0,27 (0,23-0,37)[3]
Статистическая значимость различий (p)	$0{,}0154^{1\text{-}2}$ $0{,}5901^{1\text{-}3}$ $0{,}0065^{2\text{-}3}$	$0{,}9282^{1\text{-}2}$ $0{,}8049^{1\text{-}3}$ $0{,}9118^{2\text{-}3}$	$0{,}0230^{1\text{-}2}$ $0{,}0461^{1\text{-}3}$ $0{,}0062^{2\text{-}3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у десятидневных самцов крыс Вистар повышалось содержание эстрадиола и общего тестостерона. На 4-е сут развития СВО концентрация половых стероидов нормализовалась.

Морфологические изменения в легких у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании в легких у десятидневных самцов крыс Вистар контрольной группы слизистая оболочка бронхов была выстлана 1-2 рядным кубическим реснитчатым эпителием. В их просветах выявлялись единичные десквамированные эпителиальные клетки. Просветы альвеол и альвеолярных ходов были широкими и воздушными, межальвеолярные перегородки тонкие, в них выявлялись единичные нейтрофилы (рис. 4.2.1 А, Б).

На 1-е сут после введения ЛПС в просветах бронхов выявлялись гомогенные эозинофильные массы и единичные десквамированные эпителиальные клетки (рис. 4.2.1 В). В утолщенных межальвеолярных перегородках обнаруживалось большое число нейтрофилов (рис. 4.2.1 Г). У 8 из 10 самцов выявлен интраальвеолярный отек: в альвеолах определялись

гомогенные эозинофильные массы, частично или полностью заполняющие их просветы (рис. 4.2.1 В).

На 4-е сут развития СВО интраальвеоляный отек частично сохранялся, но он был менее распространенным по сравнению с 1-ми сут эксперимента (рис. 4.2.1 Д). В просветах бронхов определялись эозинофильные массы и десквамированный эпителий. В межальвеолярных перегородках количество нейтрофилов было более высоким, чем в контрольной группе, что подтверждалось данными морфометрического исследования (табл. 4.2.2, рис. 4.2.1 Е).

Таблица 4.2.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдений	**Число нейтрофилов на площади 25 тыс. мкм^2**
Контрольная (n=10)	2,10 (2,10-2,50)^{1*}
ЛПС1-е сут (n=9)	12,20 (10,80-14,30)^{2}
ЛПС 4-е сут (n=8)	9,40 (6,60-11,00)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	0,0003$^{1-2}$ 0,0024$^{1-3}$ 0,0431$^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО в легких у десятидневных самцов выявлялся распространенный интраальвеолярный отек и увеличивалось число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. На 4-е сут развития СВО морфологические изменения в легких, наблюдаемые на 1-е сут после введения ЛПС, сохранялись, однако они были менее выражены и распространены.

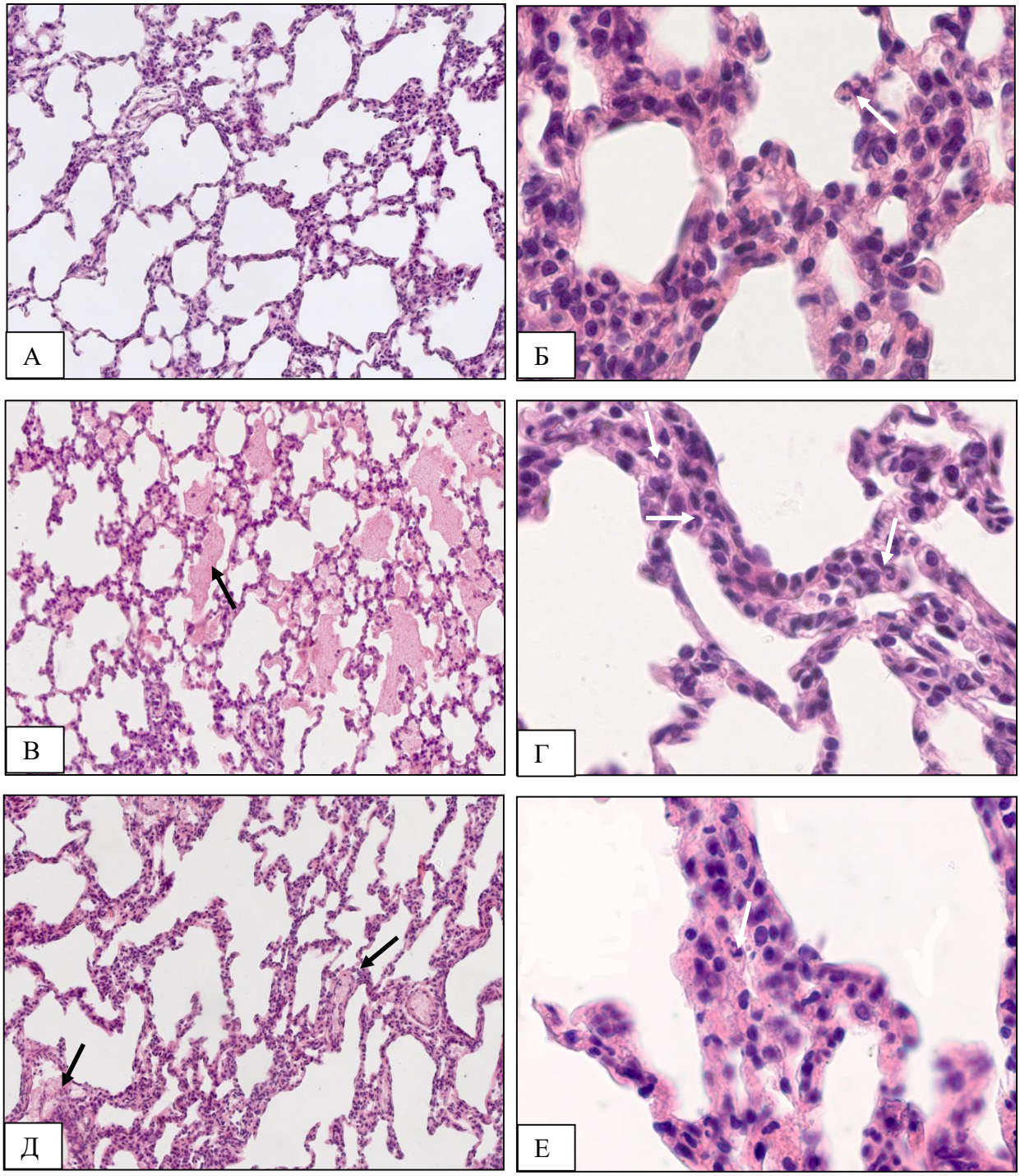


Рис. 4.2.1. Морфологическая характеристика легких у десятидневных самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные; Б – в межальвеолярных перегородках единичные нейтрофилы. *1-е сут после введения ЛПС*: В – обширные очаги интраальвеолярного отека; Г - диффузно рассеянные нейтрофилы в межальвеолярных перегородках. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – единичные альвеолы и альвеолярные ходы заполнены гомогенными эозинофильными массами, полнокровие сосудов; Е – нейтрофилы в межальвеолярных перегородках. Черные стрелки указывают на мелкие очаги интраальвеолярного отека, белые – на нейтрофилы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 200; Б, Г, Е 1000

Морфологические изменения в печени у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании печени у десятидневных самцов контрольной группы дистрофических изменений выявлено не было, в цитоплазме гепатоцитов выявлялась мелкая базофильная зернистость (рис. 4.2.2 А, Б). В соединительной ткани по ходу триад определялись единичные гистиоциты и лимфоциты. Стенки центральных вен выстланы плоским эпителием.

На 1-е сут после введения ЛПС в печени самцов десятидневных крыс Вистар были выявлены ландшафтообразные некрозы (4 животных из 10), очаговые некрозы (4 животных из 10), тотальная дистрофия гепатоцитов, особенно на периферии дольки (рис. 4.2.2 В, Г). В эти сроки обнаруживалось неравномерное полнокровие сосудов, стазы, сладжи. По ходу балок определялись единичные в поле зрения (ув. 640) неэпителиальные клеточные элементы, единичные в гистологических срезах мегакариоциты.

На 4-е сут после введения ЛПС у 5 из 8 самцов в печени обнаруживались тотальные дистрофические изменения гепатоцитов (рис. 4.2.2 Д, Е), у одного животного из 8 определялись очаговые некрозы.

При полуколичественной оценке выраженности патологических изменений в печени на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС альтеративные изменения – дистрофия и некрозы были более выражены на 1-е сут (табл. 4.2.3).

Таблица 4.2.3

Показатель выраженности дистрофических и некротических изменений в печени у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)
Контрольная (n=7)	0,50 (0,00-1,00)[1*]
ЛПС 1-е сут (n=10)	4,00 (4,00-5,00)[2]
ЛПС 4-е сут (n=7)	3,00 (2,75-3,25)[3]
Статистическая значимость различий (p)	0,0006[1-2] 0,0012[1-3] 0,0164[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС в печени у десятидневных самцов крыс Вистар развивались некротические и дистрофические изменения, которые на 4е сут эксперимента сохранялись.

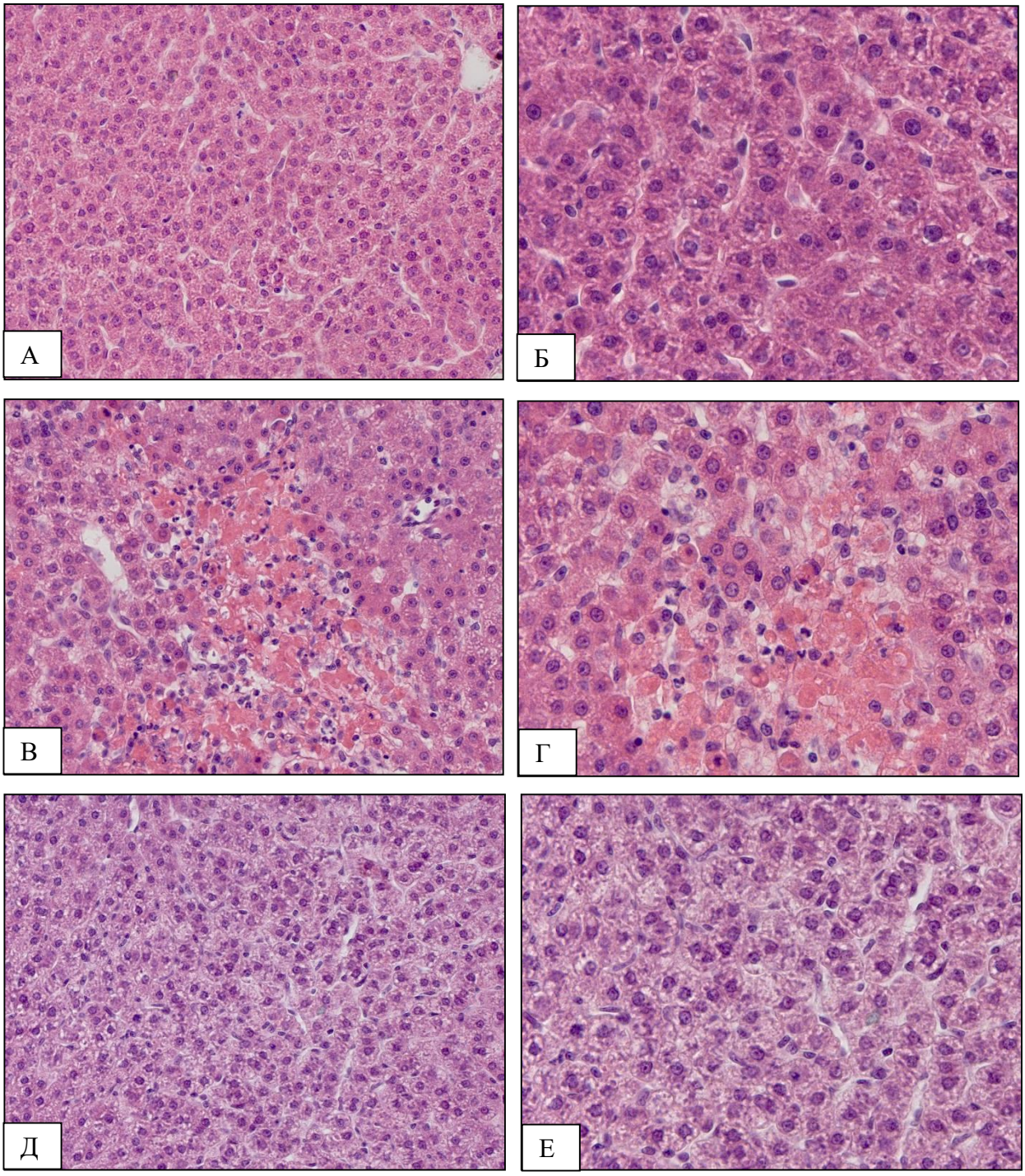


Рис. 4.2.2. Морфологическая характеристика печени у десятидневных самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – балочное строение печени сохранено, дистрофических изменений нет; Б – в цитоплазме гепатоцитов мелкая базофильная зернистость. *1-е сут после введения ЛПС*: В - очаговый некроз; Г – в зоне некроза фрагменты ядер гепатоцитов, нейтрофилы. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – распространенная вакуольная дистрофия гепатоцитов; Е – дистрофические изменения гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 400; Б, Г, Е 640

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По данным биохимического исследования уровень активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у самцов крыс на 1-е сут после введения ЛПС был статистически значимо выше значений контрольной группы (табл. 4.2.4). На 4-е сут показатели активности обоих ферментов печени не отличались от таковых в контрольной группе (табл. 4.2.4).

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у десятидневных самцов крыс Вистар наблюдалось увеличение уровня эндотоксина, на 4-е сут этот показатель оставался выше контрольных значений и статистически значимо не отличался от показателя на 1-е сут развития СВО (табл. 4.2.4).

По сравнению с контрольной группой через сутки после введения ЛПС содержание кортикостерона увеличивалось. На 4-е сут после введения ЛПС концентрация кортикостерона в крови у самцов была статистически значимо выше, чем в контрольной группе и не отличалась от показателей у животных на более раннем сроке развития СВО (табл. 4.2.4).

Таблица 4.2.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=8)	31 (19-31)[1]	161 (126-170)[1]	2,25[1] (0,67-3,75)	97,15[1] (57,89-214,65)
ЛПС 1-е сут (n=9)	154 (75-180)[2]	529 (398-660)[2]	42,24[2] (9,60-188,75)	244,8[2] (181,18-462,48)
ЛПС 4-е сут (n=7)	40 (38-40)[3]	201 (192-310)[3]	74,92[3] (8,93-300,0)	272,1[3] (225,88-286,1)
Статистическая значимость различий (p)	0,0317[1-2] 0,4206[1-3] 0,0079[2-3]	0,0286[1-2] 0,2222[1-3] 0,0159[2-3]	0,0001[1-2] 0,0104[1-3] 0,9626[2-3]	0,0244[1-2] 0,0115[1-3] 0,8371[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у десятидневных самцов крыс Вистар наблюдалось повышение уровня активности ферментов печени, выраженная эндотоксинемия на фоне увеличения содержания кортикостерона в сыворотке крови. На 4-е сут после введения ЛПС активность ферментов печени нормализовалась, а показатели содержания кортикостерона и уровня эндотоксина оставались высокими.

Морфологические изменения тимуса и относительное содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По данным морфологического исследования в тимусе у десятидневных самцов корковое вещество преобладало и было представлено лимфоцитами и эпителиальными ретикулярными клетками (рис.4.2.3 А). Субкапсулярная зона тимуса у десятидневных самцов была широкой и включала 5-8 рядов лимфобластов, среди которых выявлялись единичные делящиеся клетки (рис. 4.2.3 Б). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 4.2.3 А). Мозговое вещество тимуса у самцов было представлено равномерно распределенными эпителиальными ретикулярными клетками и лимфоцитами. В мозговом веществе выявлялись единичные тимические тельца I-II фаз развития, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток.

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе у самцов выявлена акцидентальная инволюция II стадии. Она характеризовалась сужением коркового вещества (табл. 4.2.5), картиной «звездного неба» (рис. 4.2.3 В) – наличием светлых зон в корковом веществе с фрагментами ядер погибших лимфоцитов и макрофагами. Субкапсулярная зона была широкой, состояла из 5-8 рядов лимфобластов и не отличалась от контрольной группы. Среди тимических телец I-II фаз развития, состоящих из 3-5 и 5-7 эпителиальных клеток тимуса, были тимические тельца с накоплением кератогиалина и единичные кистоподобные полости. При морфометрическом исследовании по сравнению с контрольной группой у самцов на 1-е сут развития СВО обнаружено сужение коркового вещества тимуса, тогда как показатель ширины субкапсулярной зоны статистически значимо не изменялся (табл. 4.2.5).

На 4-е сут после введения ЛПС корковое вещество тимуса было широким, границы между корковым и мозговым веществом четкие (рис. 4.2.3 Д). На гистологических препаратах у 2 из 7 самцов в корковом веществе наблюдалась картина «звездного неба», которая характеризовалась наличием гибнущих лимфоцитов и появлением макрофагов. Субкапсулярная зона тимуса была широкой и включала 10-12 рядов лимфобластов. В мозговом веществе выявлялись тимические тельца I-III фаз развития, в том числе и с накоплением кератогиалина. Расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны на 4-е сут СВО по сравнению с более ранним сроком исследования было подтверждено данными морфометрического исследования (табл. 4.2.5).

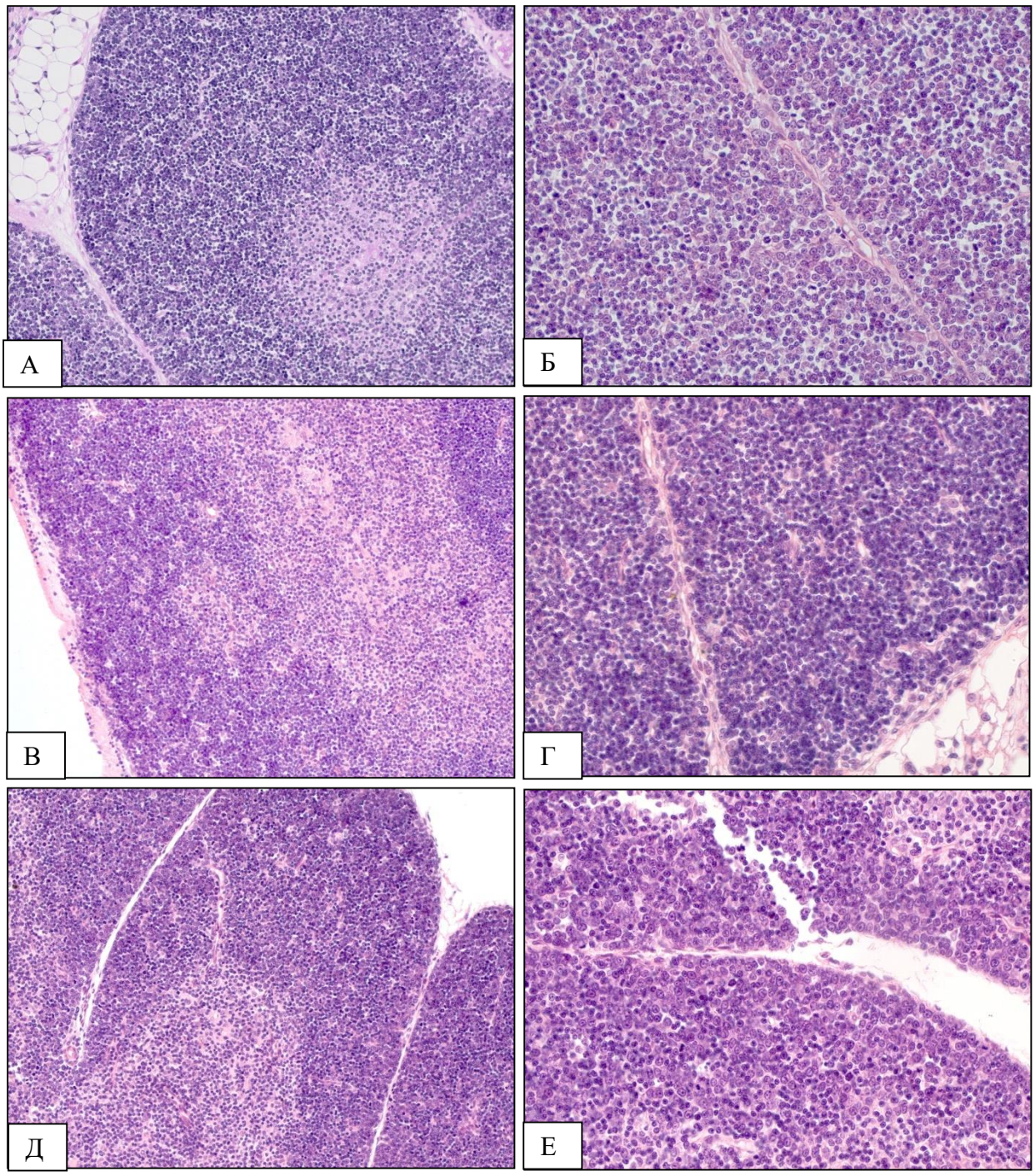


Рис. 4.2.3. Морфологическая характеристика тимуса у десятидневных самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – преобладает корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие; Б – субкапсулярная зона широкая, состоит из 5 рядов лимфобластов. *1-е сут после введения ЛПС*: В – в корковом веществе картина «звездного неба», в мозговом веществе тимические тельца I-II фаз развития; Г – субкапсулярная зона состоит из 5 рядов лимфобластов, в корковом веществе светлые зоны. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие, картина «звездного неба»; Е – широкая субкапсулярная зона, состоит из 8-10 рядов лимфобластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 400

Таблица 4.2.5

Морфометрическая характеристика тимуса у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина субкапсулярной зоны, мкм
	КВ	МВ		
Контрольная (n=9)	81,62[1*] (80,65-86,15)	18,38[1] (13,85-19,34)	4,44[1] (4,17-6,49)	40,60[1] (38,51-41,84)
ЛПС 1-е сут (n=10)	76,77[2] (71,43-80,25)	23,22[2] (19,75-28,57)	3,31[2] (2,50-4,06)	41,40[2] (37,74-42,16)
ЛПС 4-е сут (n=8)	81,25[3] (75,04-82,30)	18,74[3] (17,70-24,99)	4,33[3] (3,01-4,65)	61,50[3] (60,61-62,71)
Статистическая значимость различий (p)	0,033[1-2] 0,25[1-3] 0,49[2-3]	0,033[1-2] 0,25[1-3] 0,49[2-3]	0,033[1-2] 0,25[1-3] 0,49[2-3]	0,621[1-2] 0,00006[1-3] 0,00003[2-3]

Примечания. КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество.
Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе, включая $CD3^+$-лимфоциты, статистически значимо повышалось по сравнению с контрольной группой (табл. 4.2.6).

Таблица 4.2.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^-$)	$CD3^+$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	5,00 (4,7-6,8)	6,30 (3,3-11,0)
ЛПС 1-е сут (n=5)	27,90 (16,1-38,8)	17,90 (14-19,9)
ЛПС 4-е сут	не опр.	не опр.
Статистическая значимость различий (p)	0,01	0,033

Условные обозначения: не опр. – не определяли

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самцов крыс Вистар в тимусе была выявлена акцидентальная инволюция II стадии, что сопровождалось выраженной апоптотической гибелью тимоцитов, в том числе $CD3^+$-лимфоцитов. На 4-е сут после введения ЛПС наблюдалось восстановление структуры органа, однако в корковом веществе выявлялась картина «звездного неба», что свидетельствует о II стадии акцидентальной инволюции.

Морфологические изменения селезенки у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По данным морфологического исследования в селезенке у десятидневных самцов белая пульпа была представлена ПАЛМ-зоной (рис. 4.2.4 А). Лимфоидные узелки не выявлялись. В красной пульпе обнаруживались равномерно распределенные незрелые и зрелые клетки крови, макрофаги и мегакариоциты (рис. 4.2.4 Б).

На 1-е сут после введения ЛПС в селезенке самцов морфологических изменений на качественном уровне выявлено не было: белая пульпа представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной, которая располагалась вокруг сосудов в 5-6 рядов, лимфоидные узелки не определялись (рис. 4.2.4 В). В красной пульпе обнаружено неравномерное полнокровие капилляров, диффузно рассеянные нейтрофилы, лимфобласты, кроветворные элементы и мегакариоциты (рис. 4.2.4 Г).

На 4-е сут развития СВО морфологическая картина селезенки не отличалась от таковой в контрольной группе: белая пульпа была представлена ПАЛМ-зоной, которая располагалась вокруг сосудов. Лимфоидные узелки не выявлялись (рис. 4.2.4 Д). В красной пульпе выявлялось большое число мегакариоцитов, незрелых и зрелых клеток крови, неравномерное полнокровие сосудов (рис. 4.2.4 Е).

По данным морфометрической оценки показатели объемной доли функциональных зон селезенки у десятидневных самцов крыс Вистар контрольной группы и в разные сроки после введения ЛПС статистически значимо не различались (табл. 4.2.7).

Таблица 4.2.7

Морфометрическая характеристика селезенки у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения БП к КП, усл. ед.
	БП	КП	
Контрольная (n=9)	13,00[1*] (10,7-14,0)	87,00[1] (86,00-89,30)	0,15[1] (0,12-0,16)
ЛПС 1-е сут (n=10)	13,70[2] (12,00-15,70)	86,30[2] (84,30-88,00)	0,16[2] (0,14-0,19)
ЛПС 4-е сут (n=8)	12,65[3] (10,30-15,00)	87,35[3] (85,00-89,70)	0,14[3] (0,11-0,18)
Статистическая значимость различий (p)	0,46[1-2] 0,78[1-3] 0,72[2-3]	0,46[1-2] 0,78[1-3] 0,72[2-3]	0,46[1-2] 0,78[1-3] 0,72[2-3]

Примечания. БП – белая пульпа, КП – красная пульпа.
Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, в разные сроки после введения ЛПС у десятидневных самцов крыс Вистар изменений показателей объемных долей функциональных зон селезенки не выявлено.

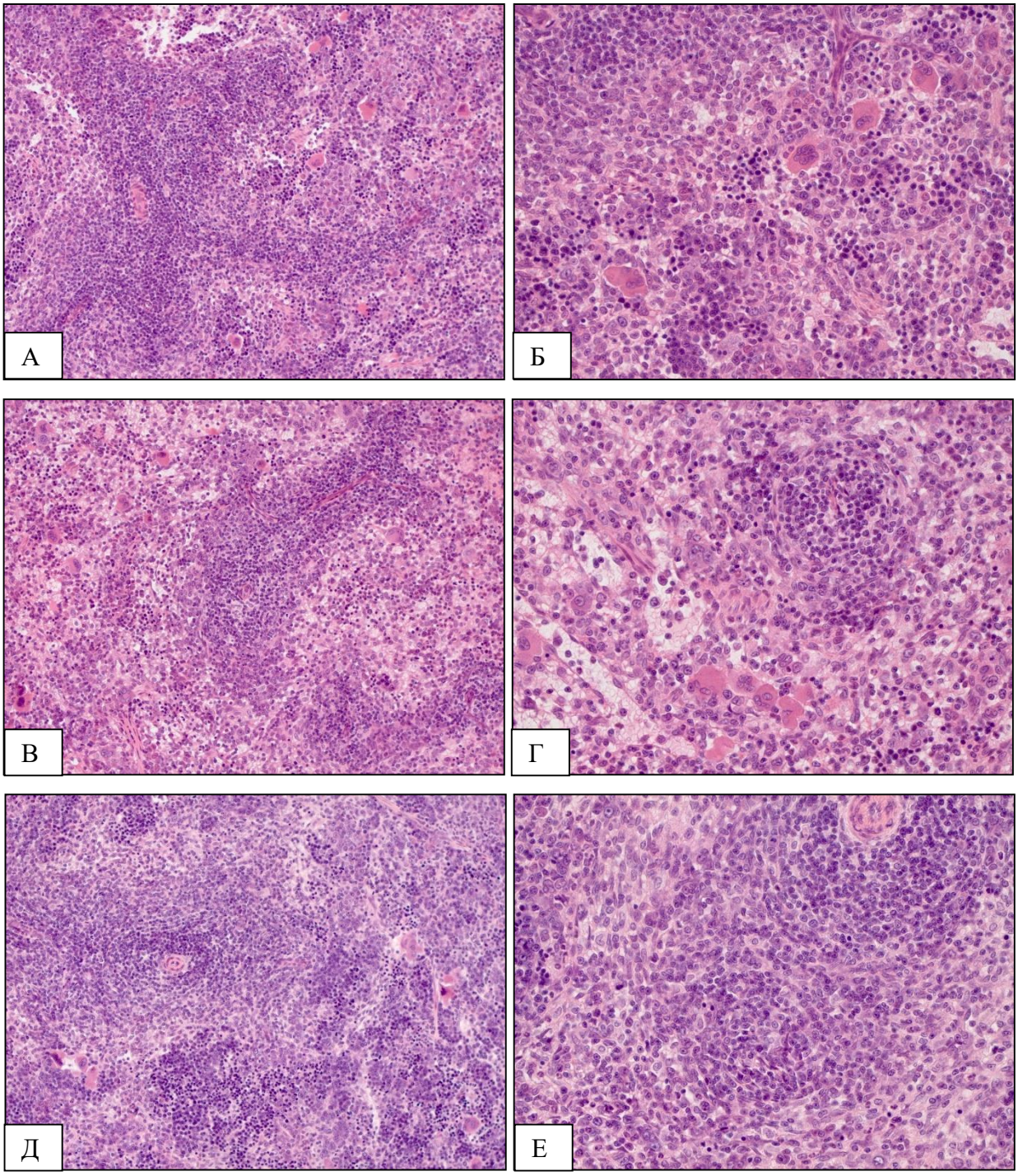


Рис. 4.2.4. Морфологическая характеристика селезенки у десятидневных самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 4-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – белая пульпа представлена ПАЛМ-зоной, лимфоидные узелки не выявляются; Б –в красной пульпе мегакариоциты, форменные элементы крови, лимфобласты. *1-е сут после введения ЛПС*: В – белая пульпа представлена ПАЛМ-зоной, расположенной вокруг сосудов в 6-8 рядов; Г – в красной пульпе зрелые и незрелые форменные элементы крови, мегакариоциты. *4-е сут после введения ЛПС:* Д – белая пульпа вокруг сосудов, лимфоидные узелки не выявляются, форменные элементы крови, мегакариоциты; Е – ПАЛМ-зона представлена 7-8 рядами лимфоцитов, в красной пульпе лимфобласты, скопления форменных элементов крови. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 200; Б, Г, Е 400

Содержание цитокинов в культуральной жидкости активированных КонА клеток селезенки у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

Через сутки после введения ЛПС у самцов крыс было выявлено снижение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α. В эти сроки развития СВО в сыворотке крови у них содержание неоптерина не изменялось, а концентрация TGF-β статистически значимо снижалась. Показатели содержания ИЛ-6 и ИФН-γ в культуральной жидкости клеток селезенки у животных опытных групп статистически значимо не отличались от показателей контрольной группы (табл. 4.2.8).

На 4-е сут после введения ЛПС уровень продукции ИЛ-2 и ФНО-α клетками селезенки оставался на низком уровне и отличий от значений другой опытной группы выявлено не было. Показатель содержания ИЛ-4 в культуральной жидкости повышался по сравнению с 1-ми сут эксперимента и контрольной группой. На 4-е сут развития СВО концентрация ИФН-γ не изменялась. В сыворотке крови содержание TGF-β повышалось по сравнению с 1-ми сут после введения ЛПС и не отличалось от значений контрольных групп, а концентрация неоптерина статистически значимо не изменялась (табл. 4.2.8).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самцов наблюдалась супрессия продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов клетками селезенки. На 4-е сут эксперимента уровень продукции Тх1-цитокина ИЛ-2, а также провоспалительного ФНО-α оставался низким, тогда как содержание остальных исследуемых цитокинов нормализовалось.

Таблица 4.2.8

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, и концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови у десятидневных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Биологическая среда	Цитокины	Контрольная (n=8)	ЛПС 1-е сут (n=7)	ЛПС 4-е сут (n=7)	Статистическая значимость различий (p)
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	ИЛ-2	3214[1*] (1136-3620)	460[2] (0-1034)	1102[3] (500-2504)	0,02[1-2] 0,08[1-3] 0,21[2-3]
	ИЛ-4	15,61[1] (12,56-51,21)	8,76[2] (3,48-14,3)	26,70[3] (20,94-48,84)	0,004[1-2] 0,92[1-3] 0,04[2-3]
	ИЛ-6	1925[1] (529-3322)	3173[2] (1680-3793)	не опр.	0,56[1-2]
	ИФН-γ	9,78[1] (5,87-219,87)	9,78[2] (6,85-21,9)	10,76[3] (4,89-19,57)	0,79[1-2] 0,81[1-3] 0,96[2-3]
	ФНО-α	149,2[1] (69,88-281,8)	53,24[2] (42,84-68,22)	69,05[3] (44,09-86,20)	0,001[1-2] 0,012[1-3] 0,33[2-3]
Сыворотка крови	TGF-β (нг/мл)	57,29[1] (45,01-63,49)	20,85[2] (17,44-31,32)	58,04[3] (49,85-66,61)	0,001[1-2] 0,63[1-3] 0,001[2-3]
	Неоптерин (нмоль/л)	2,08[1] (1,85-2,30)	3,15[2] (2,01-3,96)	2,19[3] (1,39-3,33)	0,07[1-2] 0,93[1-3] 0,38[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения, не опр. – не определяли

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у десятидневных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

По сравнению с контрольной группой на 1-е сут развития СВО у десятидневных самцов крыс Вистар было выявлено снижение относительного и абсолютного числа Т-цитотоксических и В-лимфоцитов (табл. 4.2.9).

Таблица 4.2.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у десятидневных самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Субпопуляция лимфоцитов	Относительное число, %		Абсолютное число, млн/мл	
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=6)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=6)
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$25,5^{1}$ (12,2-37,4)	$15,9^{2}$ (14,4-18,8)	$4,3^{1}$ (2,3-5,3)	$2,2^{2}$ (1,9-2,5)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$17,9^{3}$ (8,9-28,7)	$12,8^{4}$ (12,3-15,7)	$3,0^{3}$ (1,6-4,1)	$1,9^{4}$ (1,8-2,0)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$8,7^{5}$ (4,6-9,8)	**$3,7^{6}$** (3,6-4,7)	$1,4^{5}$ (1,2-1,7)	**$0,5^{6}$** (0,49-0,54)
Двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$)	$1,5^{7}$ (1,2-2,3)	$1,2^{8}$ (1,2-1,2)	$0,2^{7}$ (0,2-0,3)	$0,16^{8}$ (0,15-0,18)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$12,3^{9}$ (8,5-18,2)	**$1,9^{10}$** (1,8-7,5)	$2,3^{9}$ (1,2-3,8)	**$0,3^{10}$** (0,2-1,0)
NK-клетки ($CD314^+$)	$1,2^{11}$ (0,4-1,7)	$0,6^{12}$ (0,6-1,5)	$0,2^{11}$ (0,04-0,3)	$0,09^{12}$ (0,09-0,2)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$1,9^{13}$ (1,2-4,8)	$5,2^{14}$ (1,9-9,7)	$0,2^{13}$ (0,2-0,5)	$0,8^{14}$ (0,2-1,5)
Регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$2,6^{15}$ (1,5-3,8)	$1,8^{16}$ (1,0-3,0)	$0,4^{15}$ (0,3-0,5)	$0,3^{16}$ (0,2-0,4)
Статистически значимые различия, значения	$0,46^{1-2}$ $0,46^{3-4}$ $0,02^{5-6}$ $0,17^{7-8}$	$0,02^{9-10}$ $0,82^{11-12}$ $0,34^{13-14}$ $0,26^{15-16}$	$0,14^{1-2}$ $0,14^{3-4}$ $0,006^{5-6}$ $0,07^{7-8}$	$0,04^{9-10}$ $0,99^{11-12}$ $0,37^{13-14}$ $0,34^{15-16}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС наблюдается снижение числа некоторых субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, что, очевидно, обусловлено их гибелью и усилением миграции в барьерные органы и ткани.

Заключение

На 1-е сут после введения ЛПС у десятидневных самцов Вистар развивается СВО, который характеризуется распространенным интраальвеолярным отеком легких, увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, выраженными некротическими и дистрофическими изменениями гепатоцитов, повышением активности АлАТ и АсАТ, уровня эндотоксина, а также содержания кортикостерона, эстрадиола и общего тестостерона в сыворотке крови. В тимусе у самцов развивается акцидентальная инволюция II стадии со снижением объемной доли коркового вещества и выраженным апоптозом тимоцитов. В

периферической крови выявлено снижение абсолютного и относительного количества Т-цитотоксических и В-лимфоцитов. Уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α клетками селезенки и содержание TGF-β сыворотке крови снижается.

На 4-е сут развития СВО в этом возрастном периоде у самцов выявлен очаговый интраальвеолярный отек, воспалительные изменения в межальвеолярных перегородках, о чем свидетельствует повышение числа нейтрофилов в них, выраженные дистрофические изменения печени, повышение уровня эндотоксина, высокие показатели концентрации кортикостерона и низкие – тестотстерона в сыворотке крови на фоне нормализации уровня активности ферментов печени и эстрадиола. В тимусе – нормализация объемной доли коркового вещества и расширение его субкапсулярной зоны, что свидетельствует об акцидентальной инволюции I стадии. Уровень продукции ИЛ-2 и ФНО-α остается в эти сроки низким на фоне нормализации содержания ИЛ-4 в культуре клеток селезенки, как и TGF-β в сыворотке крови.

По сравнению с поздним сроком развития СВО на 1-е сут после введения ЛПС у самцов воспалительные изменения в органах-мишенях более выражены. Наблюдается гибель лимфоцитов, что сопровождается акцидентальной инволюцией тимуса II стадии. На фоне увеличения концентрации кортикостерона, эстрадиола и общего тестостерона в сыворотке крови наблюдается уменьшение уровня продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В отличие от 1-х сут развития СВО на 4-е сут воспалительные изменения в печени и легких менее выражены, однако уровень эндотоксина в крови более высокий, чем на более ранних сроках развития СВО. В тимусе наблюдается акцидентальная инволюция I стадии. В этот срок остаются на низком уровне показатели продукции Тх1-цитокинов – ИЛ-2 и провоспалительного ФНО-α клетками селезенки. В этот период развития СВО на фоне высокого содержания противовоспалительного гормона кортикостерона в сыворотке крови наблюдается нормализация концентрации эстрадиола и снижение общего тестостерона.

4.3 Половые различия выраженности иммунологических нарушений и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у десятидневных крыс Вистар

Сравнительная характеристика содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

По сравнению с десятидневными самцами контрольной группы у самок в сыворотке крови содержание прогестерона было выше (табл. 4.3.1). По показателям концентрации эстрадиола и тестостерона статистически значимых различий между группами самок и самцов выявлено не было (табл. 4.3.1).

По сравнению с контрольной группой на 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самок концентрация прогестерона снижалась, а у самцов наблюдалось увеличение содержания эстрадиола и тестостерона (табл. 4.3.1, рис. 4.3.1).

На 4-е сут развития СВО у самок концентрация эстрадиола и тестостерона снижалась, а содержание прогестерона оставалось на низком уровне. В эти сроки развития СВО у самцов наблюдалась нормализация показателей содержания эстрадиола и снижение тестостерона в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой (табл. 4.3.1, рис. 4.3.1).

Таким образом, при развитии СВО у самок и самцов были выявлены различия в динамике изменений содержания половых гормонов. На 1-е сут после введения ЛПС у самцов повышалась концентрация эстрадиола и тестостерона, в отличие от самок, у которых наблюдалось снижение прогестерона. На 4-е сут развития СВО у самок содержание половых стероидов было низким по сравнению с контрольной группой, тогда как у самцов показатели нормализовались.

Таблица 4.3.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения		Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=8)**	87,2 (75,59-93,43)[1*]	17,6 (14,82-18,93)[1]	0,80 (0,44-1,02)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=10)	80,97 (65,6-114,8)[2]	4,33 (2,84-10,58)[2]	0,70 (0,41-1,11)[2]
	ЛПС 4-е сут (n=7)	49,31 (46,5-56,2)[3]	9,64 (2,3-14,2)[3]	0,40 (0,34-0,41)[3]
Самцы	**Контрольная (n=8)**	79,26 (70,35-89,85)[4]	10,58 (5,70-12,26)[4]	0,42 (0,33-0,65)[4]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	110,6 (87,96-126,08)[5]	10,28 (3,09-15,72)[5]	0,84 (0,60-1,10)[5]
	ЛПС 4-е сут (n=7)	72,28 (65,64-86,44)[6]	9,03 (4,11-15,14)[6]	0,27 (0,23-0,37)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,5105^{1-2}$ $0,0033^{1-3}$ $0,0064^{2-3}$ $0,0154^{4-5}$ $0,5901^{4-6}$ $0,0065^{5-6}$ $0,8625^{1-4}$ $0,2507^{2-5}$ $0,0476^{3-6}$	$0,0032^{1-2}$ $0,0270^{1-3}$ $0,0759^{2-3}$ $0,9282^{4-5}$ $0,8049^{4-6}$ $0,9118^{5-6}$ $0,041^{1-4}$ $0,4875^{2-5}$ $0,8864^{3-6}$	$0,9611^{1-2}$ $0,0530^{1-3}$ $0,0281^{2-3}$ $0,0230^{4-5}$ $0,0461^{4-6}$ $0,0062^{5-6}$ $0,7112^{1-4}$ $0,4624^{2-5}$ $0,3017^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

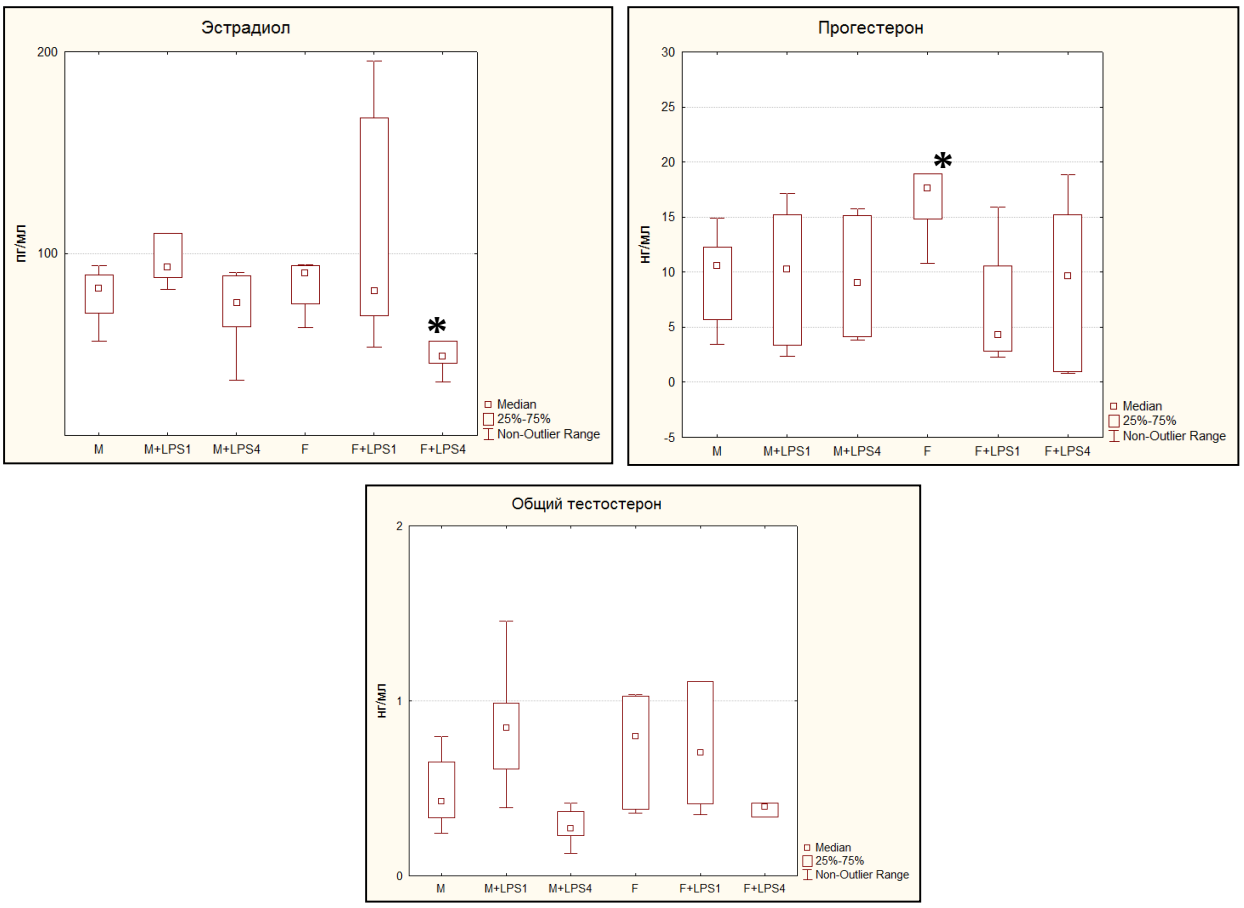


Рис. 4.3.1. Изменение содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови у самок (F) и самцов (M) десятидневных крыс Вистар на 1-е (F+LPS1; M+LPS1) и 4-е сут (F+LPS4; M+LPS4) после введения ЛПС. * - различия статистически значимы по сравнению с соответствующей группой самцов

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При гистологическом исследовании легких у десятидневных крыс Вистар с СВО половых различий морфологических изменений в них выявлено не было. Интраальвеолярный отек развивался у 100% самок (10 животных из 10), а у самцов – в 80% (у 8 животных из 10). Через сутки после введения ЛПС десятидневным крысам обоего пола количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у них увеличивалось по сравнению с соответствующей контрольной группой, однако более выраженная инфильтрация нейтрофилами была выявлена у самцов (табл. 4.3.2, рис. 4.3.2).

На 4-е сут развития СВО у самок и самцов определялись небольшие очаги интраальвеолярного отека, а в межальвеолярных перегородках число нейтрофилов оставалось высоким. В эти сроки эксперимента половых различий выявлено не было (табл. 4.3.2).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было более высоким у самцов по сравнению с самками. На 4-е сут после введения ЛПС половых различий морфологических изменений в легких выявлено не было.

Таблица 4.3.2

Морфометрическая характеристика легких у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Легкие Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (25 тыс. мкм^2)		
Самки	**Контрольная (n=10)**	2,60 (1,90-3,55)^{1*}		
	ЛПС1-е сут (n=9)	8,50 (8,40-9,70)^{2}		
	ЛПС 4-е сут (n=8)	10,00 (9,20-10,70)^{3}		
Самцы	**Контрольная (n=10)**	2,10 (2,10-2,50)^{4}		
	ЛПС1-е сут (n=9)	12,20 (10,80-14,30)^{5}		
	ЛПС 4-е сут (n=8)	9,40 (6,60-11,00)^{6}		
Статистическая значимость различий (p)		0,0015$^{1-2}$ 0,0023$^{1-3}$ 0,0801$^{2-3}$	0,0003$^{4-5}$ 0,0024$^{4-6}$ 0,0431$^{5-6}$	0,5040$^{1-4}$ 0,049$^{2-5}$ 0,5161$^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

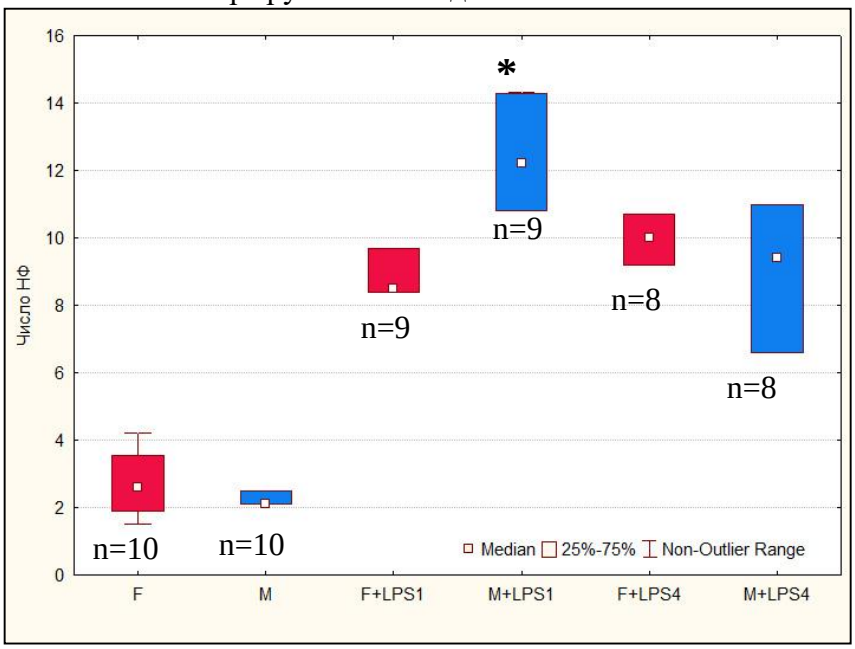


Рис. 4.3.2. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у десятидневных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M), на 1-е (F+LPS1, M+LPS1) и 4-е (F+LPS4, M+LPS4) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы: * - по сравнению с самками на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений печени у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании печени на 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов выявлялись патологические изменения, характерные для СВО: очаговые и ландшафтообразные некрозы, разные по выраженности дистрофические изменения (от слабо выраженных до выраженных и тотальных), неравномерное полнокровие сосудов, стазы и сладжи. При полуколичественной оценке тяжести поражений печени между самками и самцами половых различий выявлено не было (табл. 4.3.3). Подсчет площади некрозов показал, что у самцов площадь некрозов была больше по сравнению с самками (табл. 4.3.3, рис. 4.3.3).

На 4-е сут после введения ЛПС у самцов и самок в печени выявлены тотальные и умеренно выраженные дистрофические изменения гепатоцитов, у 1 самца из 7 и у 1 самки из 8 определялись очаговые некрозы. Половые различия морфологических изменений в печени в эти сроки развития СВО не обнаружены (табл. 4.3.3).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО морфологические изменения в печени у самцов и самок были сходными, однако показатель площади некрозов был выше у самцов (табл. 4.3.3, рис. 4.3.3). На 4-е сут половых различий морфологических изменений в печени выявлено не было.

Таблица 4.3.3

Патологические изменения в печени десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Печень	
		Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)	**Площадь некрозов (тыс. мкм^2)**
Самки	**Контрольная**	0,75 (0,25-1,25)^{1*}	-
	ЛПС1-е сут	4,00 (3,50-4,00)^{2}	45,8 (39,7-202,5)^{1}
	ЛПС 4-е сут	3,00 (3,00-3,50)^{3}	-
Самцы	**Контрольная**	0,50 (0,00-1,00)^{4}	-
	ЛПС1-е сут	4,00 (4,00-5,00)^{5}	288,8 (135,6-1167,5)^{2}
	ЛПС 4-е сут	3,00 (2,75-3,25)^{6}	-
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}0004^{1\text{-}2}$ $0{,}0006^{4\text{-}5}$ $0{,}5245^{1\text{-}4}$ $0{,}0010^{1\text{-}3}$ $0{,}0012^{4\text{-}6}$ $0{,}2899^{2\text{-}5}$ $0{,}0401^{2\text{-}3}$ $0{,}0164^{5\text{-}6}$ $0{,}7285^{3\text{-}6}$	$0{,}049^{1\text{-}2}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

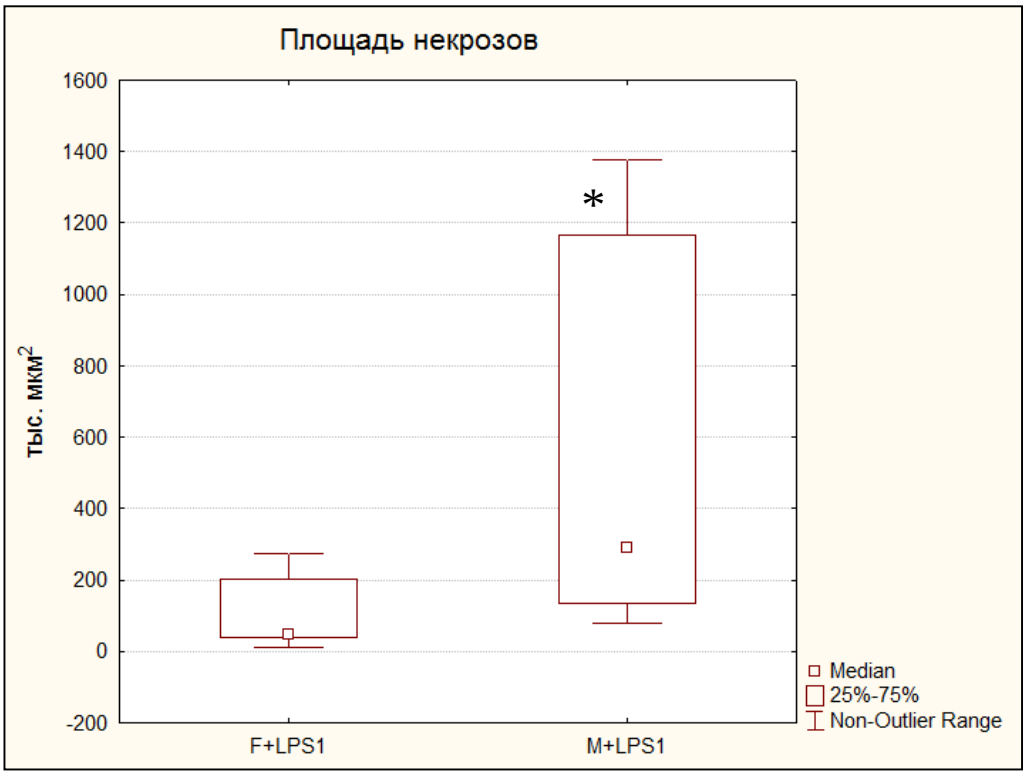


Рис. 4.3.3. Показатель площади некрозов в печени у самок (F+LPS1) и самцов (M+LPS1) на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у животных обоего пола обнаруживалось повышение активности АлАТ, однако по сравнению с самками у самцов она была более высокая (табл. 4.3.4, рис. 4.3.4). В эти сроки у самок показатель активности АсАТ не изменялся по сравнению с контрольной группой, а у самцов на 1-е сут после введения ЛПС уровень активности АсАТ повышался (табл. 4.3.4). На 4-е сут СВО у самок активность АлАТ оставалась выше контрольной группы, а у самцов снижалась по сравнению с 1-ми сут после введения ЛПС. Показатель активности АсАТ у самок не изменялся в эти сроки эксперимента, а у самцов нормализовался (табл. 4.3.4, рис. 4.3.4).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО по сравнению с самками у самцов было выявлено более выраженное увеличение уровня активности АлАТ и АсАТ. На 4-е сут у десятидневных крыс обоего пола наблюдалась нормализация уровня активности ферментов печени, половых различий по этим показателям выявлено не было.

Таблица 4.3.4

Активность ферментов печени у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л	
		АлАТ	АсАТ
Самки	Контрольная	27 (25-29)[1]	173 (169-213)[1]
	ЛПС 1-е сут	59 (41-60)[2]	200 (161-366)[2]
	ЛПС 4-е сут	40 (40-47)[3]	189 (162-215)[3]
Самцы	Контрольная	31 (19-31)[4]	161 (126-170)[4]
	ЛПС 1-е сут	154 (75-180)[5]	529 (398-660)[5]
	ЛПС 4-е сут	40 (38-40)[6]	201 (192-310)[6]
Статистическая значимость различий (p)		0,0317[1-2] 0,0317[4-5] 1,000[1-4] 0,0159[1-3] 0,4206[4-6] 0,0286[2-5] 0,5515[2-3] 0,0079[5-6] 0,5476[3-6]	0,8412[1-2] 0,0286[4-5] 0,4206[1-4] 0,8412[1-3] 0,2222[4-6] 0,5476[2-5] 0,8412[2-3] 0,0159[5-6] 0,3095[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

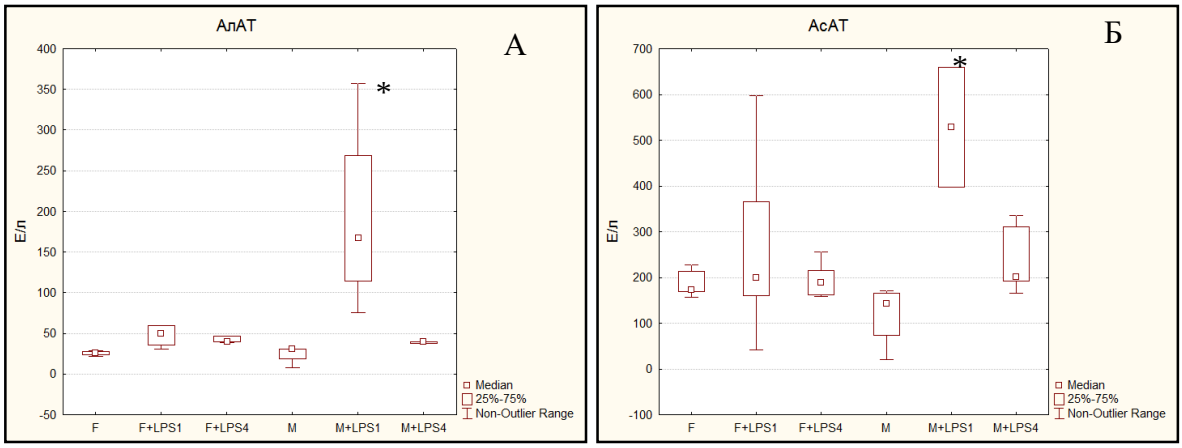


Рис. 4.3.4. Динамика показателей активности АлАТ (А) и АсАТ (Б) у десятидневных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F; M), на 1-е (F+LPS1; M+LPS1) и 4-е (F+LPS4; M+LPS4) сут после введения ЛПС. * - различия статистически значимы по сравнению с группой самок на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО у самцов и самок в сыворотке крови повышался уровень эндотоксина, однако по сравнению с самками у самцов его показатель был в 10 раз ниже. На 4-е сутки эксперимента у крыс обоего пола показатель уровня эндотоксина в сыворотке крови был статистически значимо выше контрольных значений (табл. 4.3.5). Однако у самок эндотоксинемия на 4-е сут развития СВО была более выражена (табл. 4.3.5, рис. 4.3.5).

На 1-е сут после введения ЛПС у самок наблюдалось снижение содержания кортикостерона в сыворотке крови, а у самцов, наоборот, повышение (табл. 4.3.5, рис. 4.3.5). На

4-е сут эксперимента уровень кортикостерона у самок повышался по сравнению с контрольной группой и 1-ми сут после введения ЛПС, а у самцов не изменялся по сравнению с другой опытной группой и оставался на высоком уровне по сравнению со значениями контрольной группы (табл. 4.3.5, рис. 4.3.5).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО по сравнению с самками у самцов на фоне эндотоксинемии наблюдается увеличение содержания кортикостерона в сыворотке крови. Концентрация кортикостерона у самок снижается, а показатель уровня эндотоксина по сравнению с самцами в 10 раз выше. На 4-е сут эксперимента эндотоксинемия сохраняется как у самок, так и у самцов, однако у самок она более выражена. Содержание кортикостерона у крыс обоего пола высокое и превышает значения соответствующих контрольных групп в 2 раза.

Таблица 4.3.5

Уровень эндотоксина и кортикостерона в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=8)**	2,60 (1,26-4,75)[1*]	623,75 (494,5-692,5)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=9)	430 (417,5-451,25)[2]	231,15 (103,1-279,6)[2]
	ЛПС 4-е сут (n=7)	270 (23,34-458,75)[3]	1130 (947,5-1295)[3]
Самцы	**Контрольная (n=8)**	2,25 (0,67-3,75)[4]	97,15 (57,89-214,65)[4]
	ЛПС 1-е сут (n=9)	42,24 (9,60-188,75)[5]	244,8 (181,18-462,48)[5]
	ЛПС 4-е сут (n=7)	74,92 (8,93-300,0)[6]	272,1 (225,88-286,1)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}0289^{1\text{-}2}$ $0{,}0159^{1\text{-}3}$ $1{,}000^{2\text{-}3}$ $0{,}0001^{4\text{-}5}$ $0{,}0104^{4\text{-}6}$ $0{,}9626^{5\text{-}6}$ $0{,}5697^{1\text{-}4}$ $0{,}0336^{2\text{-}5}$ $0{,}0016^{3\text{-}6}$	$0{,}0005^{1\text{-}2}$ $0{,}0205^{1\text{-}3}$ $0{,}0068^{2\text{-}3}$ $0{,}0244^{4\text{-}5}$ $0{,}0115^{4\text{-}6}$ $0{,}8371^{5\text{-}6}$ $0{,}0002^{1\text{-}4}$ $0{,}2428^{2\text{-}5}$ $0{,}0262^{3\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

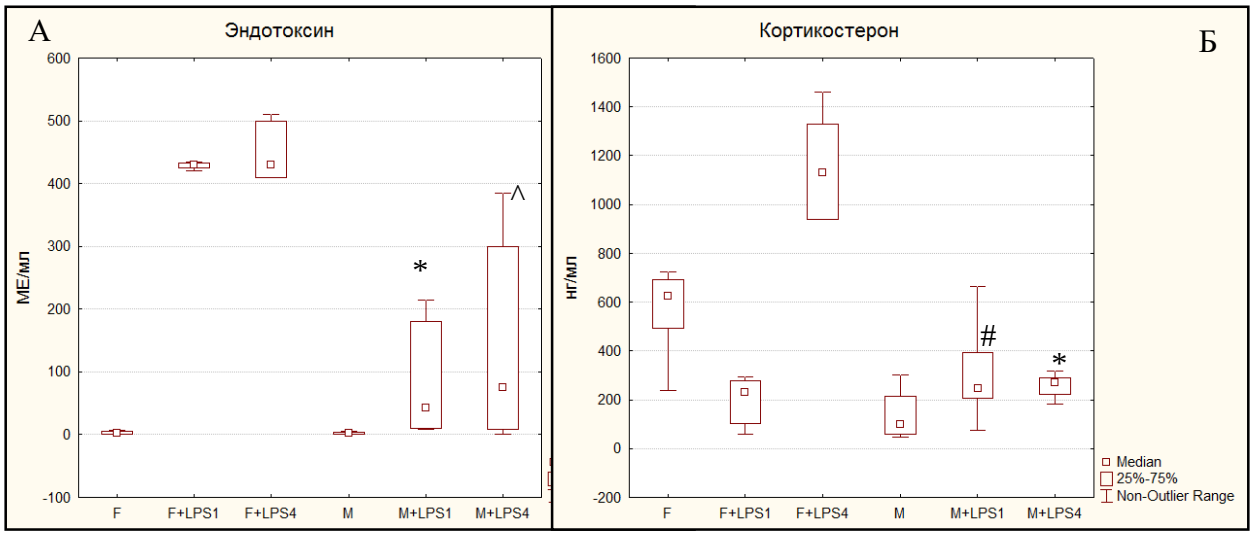


Рис. 4.3.5. Динамика уровня эндотоксина (А) и содержания кортикостерона (Б) в сыворотке крови у десятидневных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F; M), на 1-е (F+LPS1; M+LPS1) и 4-е (F+LPS4; M+LPS4) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: # - контрольной группой самок, * - группой самок на 1-е сут после введения ЛПС, ^ - группой самок на 4-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе крыс Вистар обоего пола была выявлена акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризовалась сужением коркового вещества тимуса. Динамика изменений показателей объемной доли коркового и мозгового вещества на 1-е и 4-е сут СВО у крыс обоего пола была сходной (табл. 4.3.6, рис. 4.3.6). Однако по сравнению с самцами, у которых на 1-е сут после введения ЛПС ширина субкапсулярной зоны тимуса достоверно не изменялась, у самок наблюдалось снижение этого показателя. К 4-м сут развития СВО у самок показатель ширины субкапсулярной зоны достигал значений контрольной группы, а у самцов – статистически значимо был выше показателей в контрольной группе (табл. 4.3.6, рис. 4.3.6).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самок акцидентальная инволюция тимуса сопровождалась сужением субкапсулярной зоны, по сравнению с самцами – у которых ширина субкапсулярной зоны статистически значимо не изменялась. На 4-е сут у самок восстанавливалась нормальная морфологическая структура тимуса, а у самцов наблюдалось расширение субкапсулярной зоны.

Таблица 4.3.6

Морфометрическая характеристика тимуса у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Объемная доля, %	Ширина, мкм
		КВ	СКЗ
Самки	Контрольная (n=11)	74,39[1]* (68,49-75,57)	46,52[1] (43,82-47,72)
	ЛПС 1-е сут (n=9)	62,42[2] (44,84-69,50)	17,78[2] (7,96-19,15)
	ЛПС 4-е сут (n=6)	81,31[3] (79,37-83,68)	47,23[3] (44,93-52,16)
Самцы	Контрольная (n=9)	81,62[4] (80,65-86,15)	40,60[4] (38,51-41,84)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	76,77[5] (71,43-80,25)	41,40[5] (37,74-42,16)
	ЛПС 4-е сут (n=8)	81,25[6] (75,04-82,30)	61,50[6] (60,61-62,71)
Статистическая значимость различий (p)		0,006[1-2] 0,07[1-3] 0,16[2-3] 0,033[4-5] 0,25[4-6] 0,49[5-6] 0,49[1-4] 0,62[2-5] 0,34[3-6]	0,014[1-2] 0,46[1-3] 0,009[2-3] 0,621[1-2] 0,00006[1-3] 0,00003[2-3] 0,35[1-4] 0,0079[2-5] 0,015[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения; КВ – корковое вещество; СКЗ – субкапсулярная зона

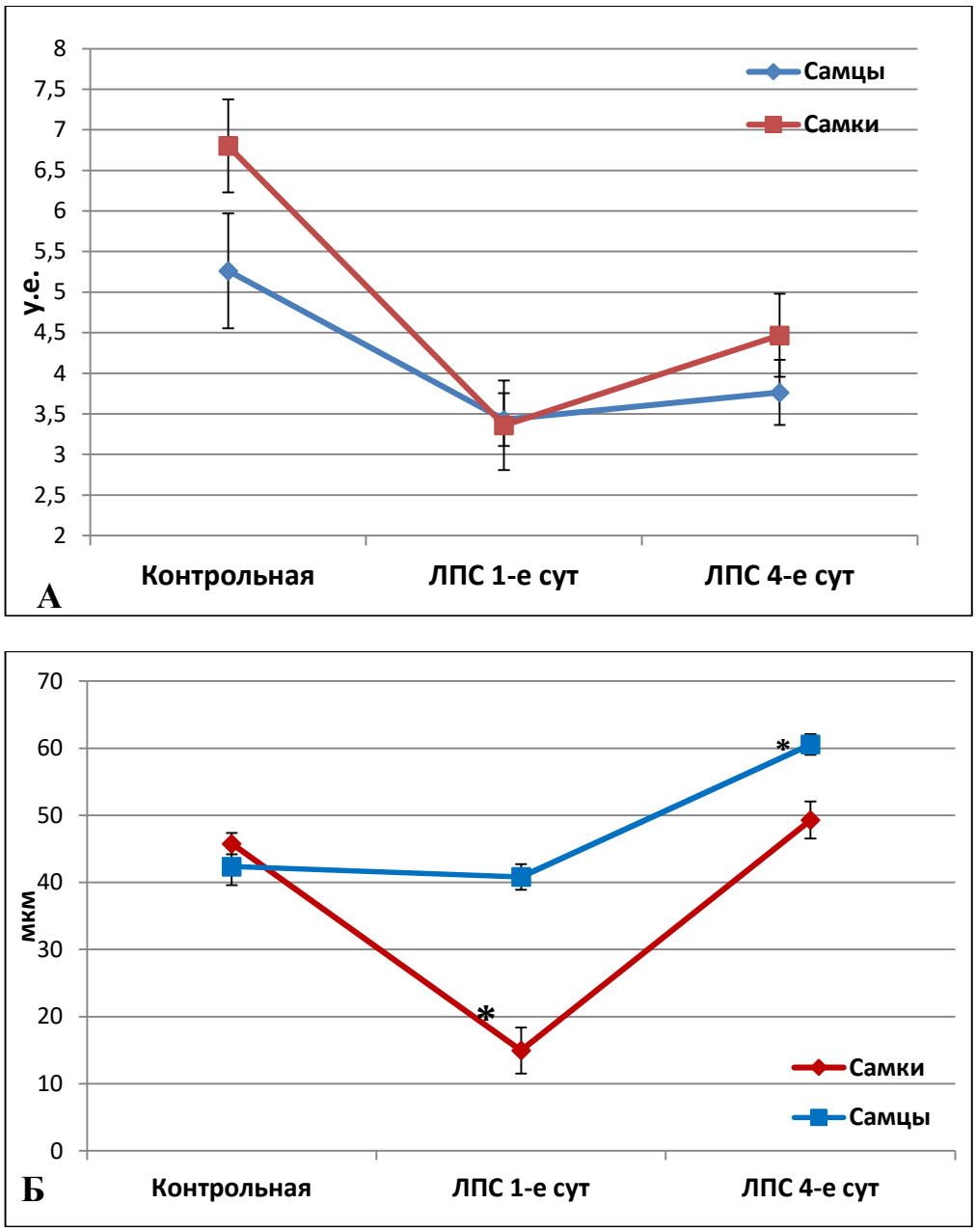


Рис. 4.3.6. Изменение индекса отношения объемной доли коркового вещества к мозговому (А) и ширины субкапсулярной зоны (Б) тимуса у самцов и самок контрольной группы, на 1-е и 4-е сут после введения ЛПС. Значения представлены в виде m±M. * - различия показателей между самками и самцами статистически значимы

Показатели относительного содержания апоптотически гибнущих клеток тимуса и CD3$^+$-лимфоцитов у десятидневных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у десятидневных самок и самцов крыс Вистар относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе увеличивалось по сравнению с соответствующими контрольными группами. Половых различий числа апоптотически гибнущих тимоцитов на 1-е сут развития СВО обнаружено не было (табл. 4.3.7).

Таблица 4.3.7

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса и CD3$^+$-лимфоцитов у десятидневных самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Все клетки тимуса	CD3$^+$-лимфоциты
Самки	**Контрольная группа (n=5)**	$15,1^{1*}$ (6,1-20,0)	$10,9^{1}$ (3,7-12,0)
	ЛПС 1-е сут (n=6)	$33,1^{2}$ (22,6-53,4)	$13,8^{2}$ (13,2-20,0)
Самцы	**Контрольная группа (n=6)**	$5,00^{3}$ (4,7-6,8)	$6,30^{3}$ (3,3-11,0)
	ЛПС 1-е сут (n=5)	$27,90^{4}$ (16,1-38,8)	$17,90^{4}$ (14-19,9)
Статистическая значимость различий (p)		$0,049^{1-2}$ $0,01^{3-4}$ $0,07^{1-3}$ $0,61^{2-4}$	$0,049^{1-2}$ $0,033^{3-4}$ $0,48^{1-3}$ $0,72^{2-4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения.

Сравнительная характеристика морфологических изменений в селезенке у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО у десятидневных крыс половые различия не выявлялись. Белая пульпа была представлена ПАЛМ-зоной, которая располагалась вокруг сосудов. В красной пульпе неравномерное полнокровие сосудов, стазы, сладжи (табл. 4.3.8).

На 4-е сут после введения ЛПС морфологическая картина селезенки не отличалась от контрольной группы. Половых различий показателей объемной доли белой пульпы выявлено не было (табл. 4.3.7).

Таблица 4.3.8

Морфометрическая характеристика селезенки у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол	Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения БП к КП, усл. ед.
		БП	КП	
Самки	Контрольная (n=10)	11,3[1*] (10,7-14,7)	88,7[1] (85,3-89,3)	0,13[1] (0,12-0,17)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	13,0[2] (10,25-18,0)	87,0[2] (82,0-89,75)	0,14[2] (0,11-0,22)
	ЛПС 4-е сут (n=8)	11,7[3] (9,7-14)	88,3[3] (86,0-90,3)	0,13[3] (0,11-0,16)
Самцы	Контрольная (n=9)	13,00[4] (10,7-14,0)	87,00[4] (86,00-89,30)	0,15[4] (0,12-0,16)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	13,70[5] (12,00-15,70)	86,30[5] (84,30-88,00)	0,16[5] (0,14-0,19)
	ЛПС 4-е сут (n=8)	12,65[6] (10,30-15,00)	87,35[6] (85,00-89,70)	0,14[6] (0,11-0,18)
	Статистическая значимость различий (p)	0,85[1-2] 0,46[1-3] 0,28[2-3] 0,46[4-5] 0,78[4-6] 0,72[5-6] 0,67[1-4] 0,94[2-5] 0,31[3-6]	0,85[1-2] 0,46[1-3] 0,28[2-3] 0,46[4-5] 0,78[4-6] 0,72[5-6] 0,67[1-4] 0,94[2-5] 0,31[3-6]	0,85[1-2] 0,46[1-3] 0,28[2-3] 0,46[4-5] 0,78[4-6] 0,72[5-6] 0,67[1-4] 0,94[2-5] 0,31[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа

Сравнительная характеристика содержания цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

В контрольных группах уровень продукции клетками селезенки ИЛ-2 был выше у самок. В сыворотке крови содержание неоптерина у десятидневных самок было выше, чем у самцов (табл. 4.3.9, рис. 4.3.7).

На 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов выявлена супрессия продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α клетками селезенки и снижение содержания TGF-β в сыворотке крови. В отличие от самцов у самок в крови наблюдалось повышение концентрации неоптерина, что свидетельствует об активации Тх1-типа иммунного ответа (табл. 4.3.9, рис. 4.3.7).

На 4-е сут развития СВО у крыс обоего пола наблюдался низкий уровень продукции ИЛ-2, ФНО-α клетками селезенки по сравнению с контрольными группами, нормализация продукции

ИЛ-4 и концентрации TGF-β в сыворотке крови. В отличие от самцов у самок уровень продукции клетками селезенки иммунорегуляторного ИФН-γ снижался, а у самцов не изменялся. В эти сроки эксперимента у самок наблюдалась нормализация содержания неоптерина в сыворотке крови (табл. 4.3.9, рис. 4.3.7).

Таким образом, динамика изменения уровня продукции цитокинов клетками селезенки у самцов и самок в ответ на введения СВО была сходной. Однако, как на 1-е, так и на 4-е сут эксперимента у самок продукция ИЛ-2 была статистически значимо выше, чем у самцов, что свидетельствует о более выраженной иммунной реакции.

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

В контрольных группах относительное и абсолютное число NK-клеток было выше у самок. По показателям остальных исследуемых популяций статистически значимых различий между самками и самцами выявлено не было (табл. 4.3.10, рис. 4.3.8).

На 1-е сут после введения ЛПС у самок обнаруживалось снижение числа большинства субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-хелперов, Т-цитотоксических, Т-регуляторных и двойных позитивных лимфоцитов. Тогда как у самцов было выявлено снижение только Т-цитотоксических лимфоцитов. Помимо этого, у самцов наблюдалось снижение В-лимфоцитов в ответ на введение ЛПС, тогда как у самок относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов статистически значимо не отличалось от значений контрольной группы (табл. 4.3.10, рис. 4.3.8).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО снижение числа Т-лимфоцитов в периферической крови было более выражено у самок, чем у самцов. Тогда как у самцов на 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось выраженное уменьшение числа В-лимфоцитов.

Таблица 4.3.9

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у десятидневных самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Пол		Содержание в сыворотке крови		Содержание в культуральной жидкости клеток селезенки, пг/мл				
		TGF-β (нг/мл)	Неоптерин (нмоль/л)	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИФН-γ	ФНО-α
Самки	Контрольная (n=10)	41,29[1] (31,14-52,08)	2,74[1] (2,26-3,91)	8000[1*] (6672-8000)	47,15[1] (7,15-126,3)	1992[1] (1634-2976)	85,48[1] (13,69-695,2)	470,40[1] (63,23-1171,4)
	ЛПС 1-е сут (n=9)	17,99[2] (13,77-26,57)	4,62[2] (3,98-5,76)	2586[2] (636-6138)	8,33[2] (0,46-44,5)	2243[2] (1392-3492)	61,44[2] (7,83-211,3)	19,14[2] (0-85,20)
	ЛПС 4-е сут (n=9)	54,32[3] (32,82-62,74)	3,13[3] (2,29-5,61)	2198[3] (1383-4166)	25,00[3] (19,79-72,9)	-	7,83[3] (7,83-19,07)	38,27[3] (0-100,2)
Самцы	Контрольная (n=10)	57,29[4] (45,01-63,49)	2,08[4] (1,85-2,30)	3214[4] (1136-3620)	15,61[4] (12,56-51,21)	1925[3] (529-3322)	9,78[4] (5,87-219,87)	149,2[4] (69,88-281,8)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	20,85[5] (17,44-31,32)	3,15[5] (2,01-3,96)	460[5] (0-1034)	8,76[5] (3,48-14,3)	3173[4] (1680-3793)	9,78[5] (6,85-21,9)	53,24[5] (42,84-68,22)
	ЛПС 4-е сут (n=10)	58,04[6] (49,85-66,61)	2,19[6] (1,39-3,33)	1102[6] (500-2504)	26,70[6] (20,94-48,84)		10,76[6] (4,89-19,57)	69,05[6] (44,09-86,20)
Статистическая значимость различий (p)		0,011[1-2] 0,45[1-3] 0,03[2-3] 0,001[4-5] 0,63[4-6] 0,001[5-6] 0,1[1-4] 0,31[2-5] 0,20[3-6]	0,018[1-2] 0,48[1-3] 0,1[2-3] 0,07[4-5] 0,93[4-6] 0,38[5-6] 0,04[1-4] 0,08[2-5] 0,42[3-6]	0,003[1-2] 0,002[1-3] 0,25[2-3] 0,02[4-5] 0,08[4-6] 0,21[5-6] 0,02[1-4] 0,02[2-5] 0,03[3-6]	0,03[1-2] 0,47[1-3] 0,11[2-3] 0,004[4-5] 0,92[4-6] 0,04[5-6] 0,07[1-4] 0,55[2-5] 0,82[3-6]	0,83[1-2] 0,56[3-4] 0,56[1-3] 0,83[2-4]	0,039[1-2] 0,009[1-3] 0,48[2-3] 0,049[4-5] 0,81[4-6] 0,96[5-6] 0,21[1-4] 0,47[2-5] 0,95[3-6]	0,01[1-2] 0,03[1-3] 0,67[2-3] 0,001[4-5] 0,012[4-6] 0,33[5-6] 0,87[1-4] 0,44[2-5] 0,56[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

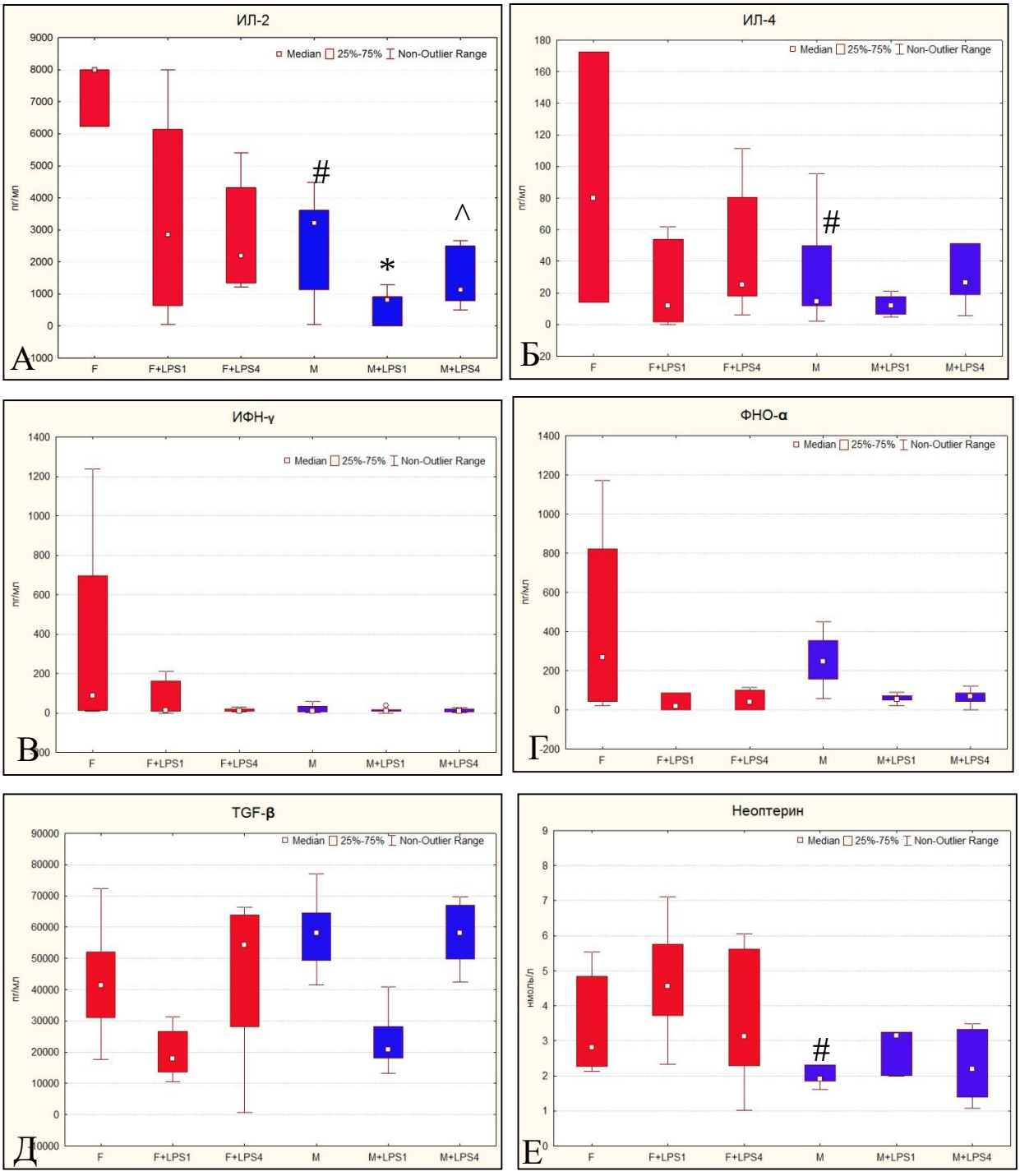


Рис. 4.3.7. Продукция ИЛ-2 (А), ИЛ-4 (Б), ИФН-γ (В), ФНО-α (Г) активированными КонА клетками селезенки и содержание TGF-β (Д) и неоптерина (Е) в сыворотке крови у десятидневных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M), на 1-е (F+LPS1; M+LPS1) и 4-е (F+LPS4; M+LPS4) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: # - контрольной группой самок, * - группой самок на 1-е сут после введения ЛПС, ^ - группой самок на 4-е сут после введения ЛПС

Таблица 4.3.10

Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у самок и самцов десятидневных крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Относительное число, %	Самки		Самцы	
	Контрольная	ЛПС	Контрольная	ЛПС
Т-лимфоциты (CD3+)	15,7 (13,5-24,1)	**6,8*** (5,0-11,2)	25,5 (12,2-37,4)	15,9$^{\&}$ (14,4-18,8)
Т-хелперы (CD3+CD4+)	12,5 (10,9-18,6)	**5,8** (3,9-9,7)	17,9 (8,9-28,7)	12,8$^{\&\&}$ (12,3-15,7)
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	4,6 (3,8-7,2)	**1,6**** (1,2-2,2)	8,7 (4,6-9,8)	**3,7*$^{\&\&\&}$** (3,6-4,7)
Двойные позитивные лимфоциты (CD4+CD8+)	2,0 (1,4-2,2)	**0,6***** (0,4-1,1)	1,5 (1,2-2,3)	1,2 (1,2-1,2)
В-лимфоциты (CD45+)	10,8 (7,0-13,1)	8,9 (5,1-11,7)	12,3 (8,5-18,2)	**1,9**** (1,8-7,5)
NK-клетки (CD314+)	2,8 (1,5-6,3)	2,7 (0,65-5,5)	1,2 (0,4-1,7)	0,6 (0,6-1,5)
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	1,9 (1,2-4,1)	2,1 (1,0-4,5)	1,9 (1,2-4,8)	5,2 (1,9-9,7)
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	3,8 (1,9-4,3)	**0,9** (0,4-2,1)	2,6 (1,5-3,8)	1,8 (1,0-3,0)
Статистически значимые различия, значения	*-0,04 **- 0,01 ***- 0,007		*- 0,03 ** - 0,03 & 0,02	&&- 0,01 &&& - 0,01

Абсолютное число, млн/мл	Самки		Самцы	
	Контрольная	ЛПС	Контрольная	ЛПС
Т-лимфоциты (CD3+)	4,3 (3,5-7,0)	**1,7*** (1,4-1,9)	4,3 (2,3-5,3)	2,2$^{\&}$ (1,9-2,5)
Т-хелперы (CD3+CD4+)	3,4 (2,9-5,4)	**1,5**** (0,9-1,7)	3,0 (1,6-4,1)	1,9$^{\&\&}$ (1,8-2,0)
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	1,2 (1,0-2,2)	**0,4***** (0,2-0,5)	1,2 (0,8-1,6)	**0,51** (0,49-0,54)
Двойные позитивные лимфоциты (CD4+CD8+)	0,6 (0,4-0,6)	**0,12****** (0,06-0,2)	0,2 (0,2-0,3)	0,16 (0,15-0,18)
В-лимфоциты (CD45+)	3,0 (2,2-3,6)	1,8 (0,9-3,1)	2,3 (1,2-3,8)	**0,3*** (0,2-1,0)
NK-клетки (CD314+)	0,8 (0,4-1,7)	0,7 (0,1-1,8)	**0,2$^{\#}$** (0,04-0,3)	0,09 (0,09-0,2)
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	0,5 (0,3-1,1)	0,3 (0,1-0,5)	0,2 (0,2-0,5)	0,8 (0,2-1,5)
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	1,0 (0,6-1,1)	**0,07******* (0,02-0,3)	0,4 (0,3-0,5)	0,3 (0,2-0,4)
Статистически значимые различия, значения	*- 0,009 **- 0,006 ***- 0,006	****- 0,01 ***** - 0,02	*- 0,04 # - 0,01	&- 0,03 && - 0,04

Примечания. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой, # контрольной группой самок, & - группой самок на 1-е сут после введения ЛПС

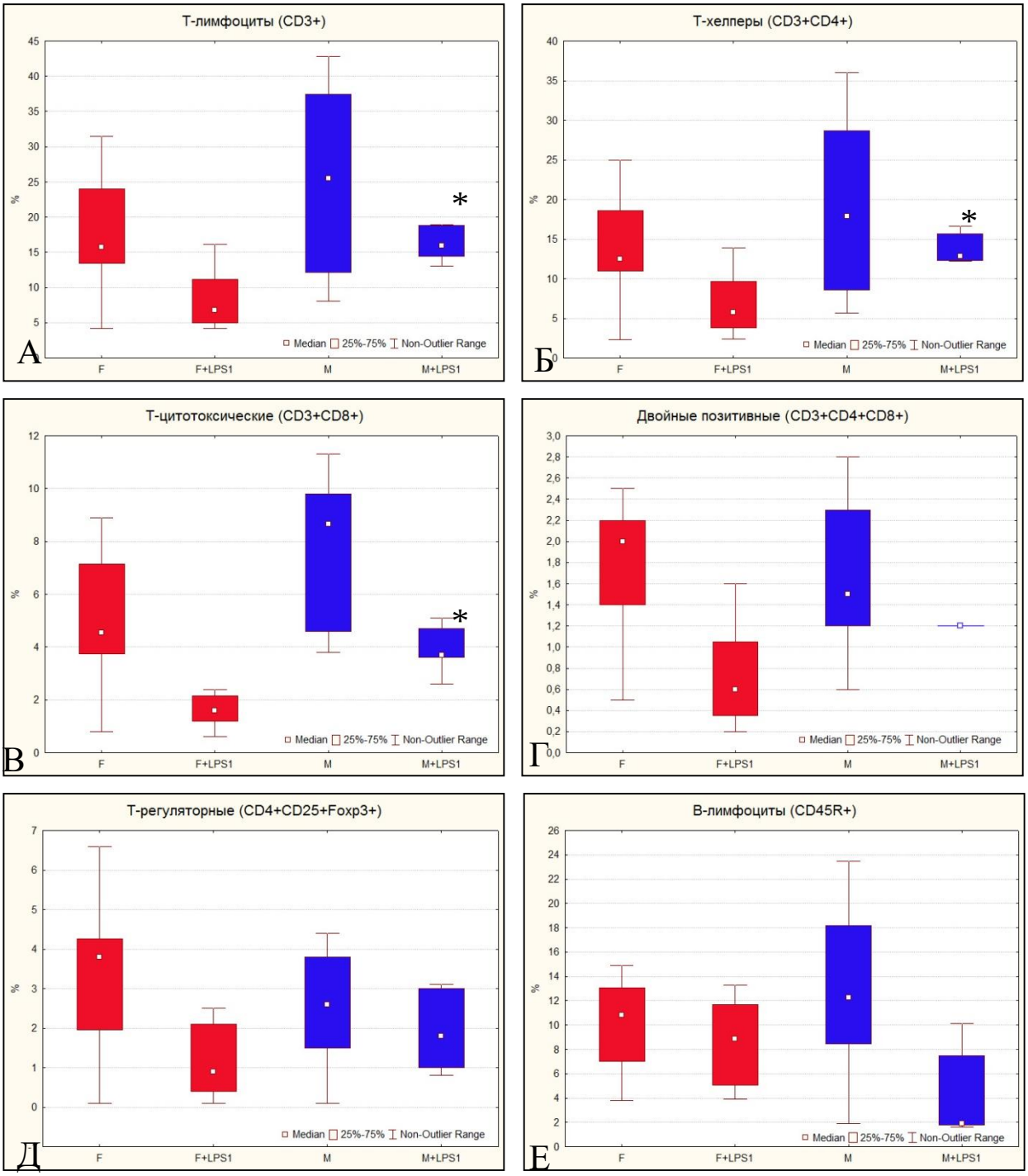


Рис. 4.3.8. Относительное содержание Т-лимфоцитов (А), Т-хелперов (Б), Т-цитотоксических (В), двойных позитивных (Г), Т-регуляторных (Д) и В-лимфоцитов (Е) в периферической крови у десятидневных самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M), на 1-е сут (F+LPS1; M+LPS1) после введения ЛПС. * - различия статистически значимы по сравнению с группой самок на 1-е сут после введения ЛПС

Оценка информативности статистически значимо изменяющихся морфологических и иммунологических параметров при СВО у десятидневных самок и самцов крыс Вистар

Через сутки после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг количество статистически значимо изменяющихся показателей у десятидневных самок составило 18, а у самцов – 17, а на 4-е сут развития СВО – 11 и 8 соответственно. Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей было проведено вычисление информативности каждого признака по формуле Кульбака (табл. 4.3.11). В каждой группе были получены значения информативности и отобраны первые пять показателей, которые были максимальными (табл. 4.3.11). На 1-е сут после введения ЛПС у десятидневных самок выявлена максимальная значимость следующих параметров: уровня эндотоксина и активность АлАТ в сыворотке крови, ширины субкапсулярной зоны тимуса, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и показателя выраженности патологических изменений в печени (табл. 4.3.11, рис. 4.3.9). Через сутки после введения ЛПС десятидневным самцам максимальными показателями информативности также как и у самок были – уровень эндотоксина в сыворотке крови, нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, показатель выраженности патологических изменений в печени, а также уровень продукции ФНО-α и содержание апоптотически гибнущих тимцоцитов (табл. 4.3.11, рис. 4.3.9).

На 4-е сут развития СВО у десятидневных самок максимальными показателями информативности как и в ранние сроки оставались: уровень эндотоксина в сыворотке крови, число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и показатель выраженности патологических изменений в печени, а также патогенетически значимыми в развитии СВО у самок в поздние сроки стали иммунологические нарушения – снижение уровня продукции ИФН-γ и ФНО-α (табл. 4.3.12, рис. 4.3.9).

На 4-е сут развития СВО у десятидневных самцов, также как и на 1-е сут выявлена максимальная значимость параметров, характеризующих патологические изменения в органах-мишенях – повышение уровня эндотоксина, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, показателя выраженности патологических изменений в печени, также как и расширение субкасулярной зоны тимуса и снижение уровня продукции провоспалительного цитокина ФНО-α.

Таким образом, в разные сроки после введения ЛПС у десятидневных крыс Вистар обоего пола наиболее значимым в механизмах развития СВО были увеличение уровня эндотоксина, выраженность воспалительной реакции в легких и патологических изменений в печени. На 1-е и 4-е сут развития СВО у десятидневных самцов одним из наиболее информативных критериев оказалось снижение уровня продукции ФНО-α клетками селезенки, тогда как у самок максимальную значимость такие иммунологические нарушения, как снижение уровня продукции провоспалительных ИФН-γ и ФНО-α, приобрели только в более поздние сроки.

Таблица 4.3.11

Показатели информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся параметров через сутки после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг у десятидневных самок и самцов крыс Вистар

Десятидневные самки			Десятидневные самцы		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информативность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информативность**
Эндотоксин	**↑ в 165**	**34538**	**Эндотоксин**	**↑ в 18,7**	**9625**
АлАТ	**↑ в 2**	**398**	**НФ в легких**	**↑ в 6**	**2215**
СКЗ	**↓ в 2,5**	**123,5**	**Апоптоз тимоцитов**	**↑ в 5,6**	**505**
НФ в легких	**↑ в 3,3**	**50,34**	**ФНО-α**	**↓ в 2,8**	**99,3**
Печень (некрозы)	**↑ в 5,3**	**40,8**	**Печень (некрозы)**	**↑ в 8**	**67,7**
ФНО-α	↓ в 24,7	34,6	Тестостерон	↑ в 2	39,4
Кортикостерон	↓ в 2,7	24,3	ИЛ-4	↓ в 1,8	31,2
Т-цитотоксические	↓ в 2,9	21,3	Т-цитотоксические	↓ в 2,4	24,5
Прогестерон	↓ в 4,1	20,3	Эстрадиол	↑ в 1,4	15,4
Апоптоз тимоцитов	↑ в 2	16,8	Кортикостерон	↑ в 2,5	12,3
Т-регуляторные	↓ в 4,2	10,1	TGF-β	↓ в 2,7	11,7
%КВ	↓ в 1,2	7,2	АлАТ	↑ в 5	11,6
Т-хелперы	↓ в 2,6	6,3	Апоптоз CD3	↑ в 2,8	10,7
Апоптоз CD3	↑ в 1,3	6,1	В-лимфоциты	↓ в 6,5	8
TGF	↓ в 2,3	5,8	%КВ	↓ в 1,1	3,8
ИЛ-4	↓ в 5,9	2,7	АсАТ	↑ в 3,3	2,9
Неоптерин	↑ в 1,7	1,6	ИЛ-2	↓ в 7	0,36
ИЛ-2	↓ в 3,1	0,14			

Условные обозначения: КВ – корковое вещество тимуса, НФ – нейтрофилы, СКЗ – субкапсулярная зона тимуса

Таблица 4.3.12

Показатели информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся параметров на 4-е сут после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг у десятидневных самок и самцов крыс Вистар

Десятидневные самки			Десятидневные самцы		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информативность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информативность**
Эндотоксин	**↑ в 104**	**19107**	**Эндотоксин**	**↑ в 33**	**13714**
ИФН-γ	**↓ в 10.9**	**2072**	**НФ в легких**	**↑ в 4,5**	**1040**
ФНО-α	**↓ в 12,3**	**182,4**	**СКЗ**	**↑ в 1,5**	**40,5**
НФ в легких	**↑ в 3.8**	**145,8**	**ФНО-α**	**↓ в 2**	**43,8**
Печень (некрозы)	**↑ в 4**	**38,7**	**Печень (некрозы)**	**↑ в 6**	**51**
Эстрадиол	↓ в 1,8	21,8	Тестостерон	↓ в 1.6	1,36
Кортикостерон	↑ в 1.8	15,2	Кортикостерон	↑ в 2.8	11,5
Тестостерон	↓ в 2	7,7	ИЛ-2	↓ в 7	0,36
ИЛ-2	↓ в 3.6	3,5			
Прогестерон	↓ в 1,8	2,04			
%КВ	↑ в 1.1	1,57			

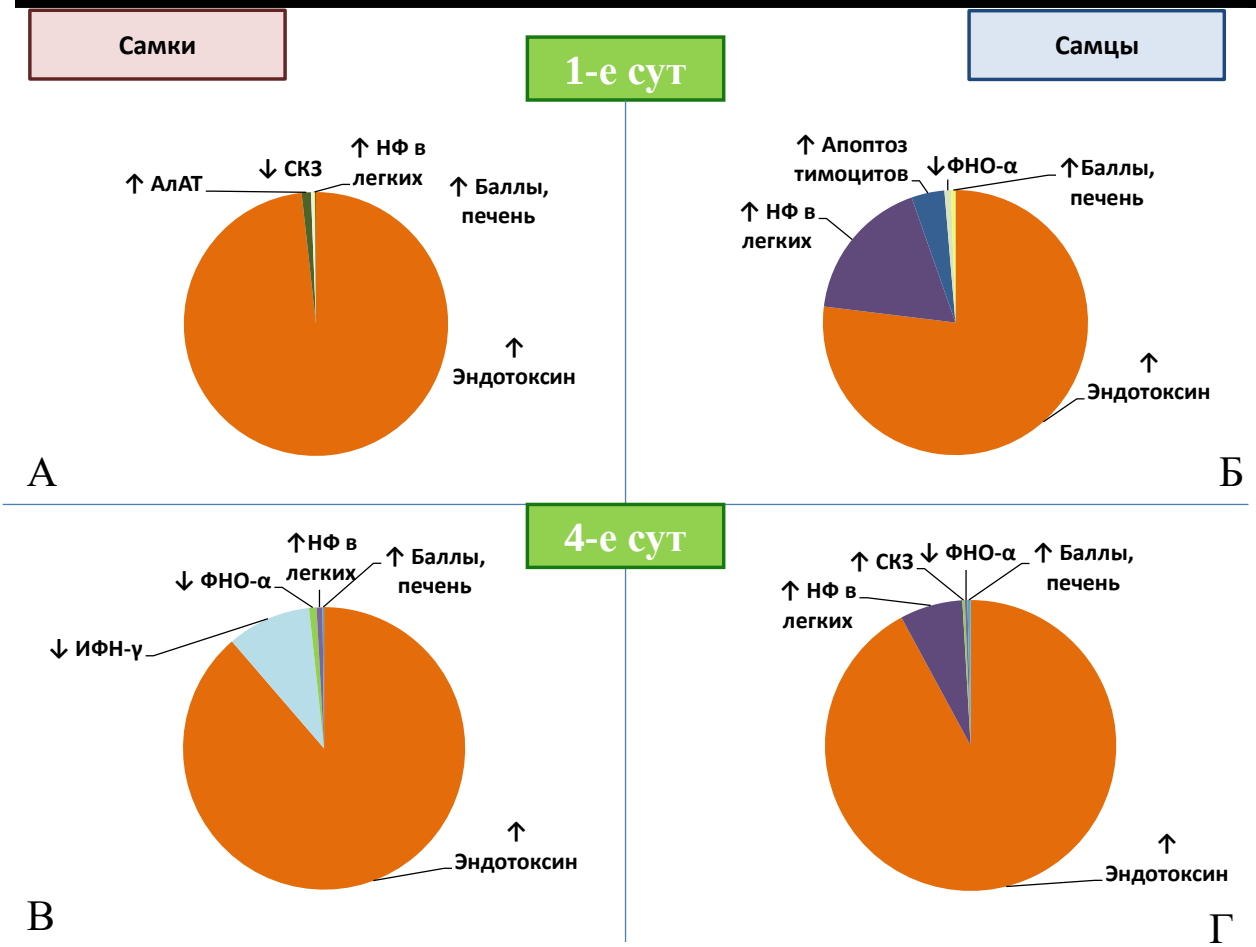


Рис. 4.3.9. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е сутки (А, Б) и 4-е сут (В, Г) после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг новорожденным самкам (А) и самцам (Б) крыс Вистар.

Заключение

В результате исследования развития СВО у десятидневных крыс Вистар выявлены половые различия морфологических проявлений и иммунологических нарушений при введении ЛПС.

По сравнению с десятидневными самками крыс Вистар контрольной группы в сыворотке крови у самцов содержание прогестерона было ниже. На 1-е сут развития СВО на фоне эндотоксинемии у самцов в сыворотке крови повышалось содержание эстрадиола, тестостерона и кортикостерона, в отличие от самок, у которых наблюдалось снижение концентрации прогестерона и кортикостерона, а показатель уровня эндотоксина был в 10 раз выше, чем у самцов. На 4-е сут развития СВО у самок концентрация половых стероидов была низкой по сравнению с контрольной группой, тогда как у самцов показатели нормализовались. Эндотоксинемия сохранялась как у самок, так и у самцов, однако у самок она была более высокой. Содержание кортикостерона на 4-е сут развития СВО в сыворотке крови у крыс обоего пола было высоким и превышало значения соответствующих показателей у животных контрольных групп в 2 раза.

Через сутки после введения ЛПС у десятидневных крыс Вистар в легких был выявлен интраальвеолярный отек – 100% у самок и 80% у самцов. Количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких увеличивалось у крыс обоего пола, однако более выраженная инфильтрация нейтрофилами выявлена у самцов. В печени у крыс обоего пола в эти сроки СВО обнаруживались обширные некрозы, площадь которых была выше у самцов. В сыворотке крови у десятидневных самок и самцов отмечалось увеличение уровня активности ферментов печени, показатели которых также были выше у самцов. На 4-е сут после введения ЛПС половых различий морфологических изменений в легких и печени выявлено не было.

На 1-е сут развития СВО у десятидневных крыс обоего пола в тимусе развивалась акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризовалась сужением объемной доли коркового вещества, картиной «звездного неба» и повышением содержания апоптотически гибнущих тимоцитов. Акцидентальная инволюция тимуса у самок сопровождалась сужением субкапсулярной зоны, а у самцов в эти сроки ширина субкапсулярной зоны статистически значимо не изменялась. На 4-е сут у самок морфологическая структура тимуса восстанавливалась, а у самцов наблюдалось расширение субкапсулярной зоны, и у некоторых – в корковом веществе выявлялась картина «звездного неба». В селезенке у десятидневных самок и самцов в разные сроки развития СВО морфологических изменений и половых различий выявлено не было.

В контрольной группе у десятидневных самок уровень продукции клетками селезенки ИЛ-2 и содержание неоптерина в сыворотке крови было выше, чем у самцов, что свидетельствует

о более выраженной активности иммунной системы у самок. На 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов обнаружена супрессия продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α клетками селезенки и снижение содержания TGF-β в сыворотке крови. В отличие от самцов у самок в крови наблюдалось повышение концентрации неоптерина, что свидетельствует об активации Тх1-типа иммунного ответа. На 4-е сут развития СВО у крыс обоего пола наблюдалась супрессия продукции ИЛ-2, ФНО-α, однако у самок также было выявлено снижение ИФН-γ и нормализация содержания неоптерина в сыворотке крови.

В периферической крови у самок контрольной группы число NK-клеток было выше, чем у самцов. На 1-е сут после введения ЛПС у самок обнаруживалось снижение числа Т-хелперов, Т-цитотоксических, Т-регуляторных и двойных позитивных лимфоцитов. Тогда как у самцов снижалось содержание только Т-цитотоксических и В-лимфоцитов, что, по-видимому, свидетельствует о менее выраженной миграции и гибели лимфоцитов.

4.4 Обсуждение

Данные литературы о половых различиях морфофункционального состояния иммунной системы и органов-мишеней при ССВО у животных и человека в препубертатном периоде отсутствуют. В литературе в основном представлены данные о половых различиях частоты развития, тяжести течения и показателях смертности от сепсиса у детей в период новорожденности и полового созревания (Ahmed R. et al., 2007). Немногочисленными работами показано, что среди грудных детей 1-12 месяцев жизни в 2,8 раз чаще сепсис встречается у мальчиков, чем у девочек. В возрастном периоде от 1 года до 8 лет частота встречаемости сепсиса у мальчиков снижается, и к 8-ми годам показатели не отличаются от таковых у девочек (Bindl L. et al., 2003).

По данным, полученным ранее, по сравнению с десятидневными самками крыс Вистар в сыворотке крови у самцов содержание прогестерона и кортикостерона было ниже (Симонова Е.Ю. и др., 2014). Половых различий по показателям концентрации эстрадиола и общего тестостерона у десятидневных животных выявлено не было. Высокое содержание кортикостерона в сыворотке крови у крыс препубертатного периода было показано в работе A.R. Willey и соавт. (2012), что согласуется с полученными нами данными.

На 1-е сут развития СВО, который моделировали внутрибрюшинным введением ЛПС *E.coli* в высокой дозе 15 мг/кг, у самцов в сыворотке крови повышалось содержание эстрадиола, тестостерона и кортикостерона, в отличие от самок, у которых наблюдалось снижение концентрации прогестерона и кортикостерона. Изменения в уровне половых стероидных гормонов у самцов и самок при СВО, по-видимому, связаны с нарушением функции системы гипофиз-надпочечники–гонады, которое, как показано В.Б. Писаревым и соавт. (2008),

определяется изменениями в процессах метаболизма и синтеза половых стероидов семенниками и яичниками. На 4-е сут развития СВО у самок концентрация половых стероидов была ниже, чем в контрольной группе, тогда как у самцов показатели содержания эстрадиола, тестостерона нормализовались. В то время как содержание кортикостерона на 4-е сут развития СВО в сыворотке крови у крыс обоего пола было высокое и превышало значения соответствующих контрольных групп в 2 раза.

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар не различался. По данным литературы у младенцев, находящихся на грудном вскармливании, качественный состав микрофлоры относительно постоянный, а к 3-летнему возрасту количество бактерий, заселяющих толстую кишку, не отличается от такового у взрослых людей (Claesson M.J., et al., 2011; Salazar N. et al., 2014; Cresci G., Bawden E, 2015).

На 1-е сут развития СВО по сравнению с самцами у самок наблюдалась более выраженная эндотоксинемия, что характеризовалось увеличением уровня эндотоксина в 165 раз, тогда как у самцов этот показатель повышался только в 18 раз. На 4-е сут эксперимента эндотоксинемия сохранялась как у самок, так и у самцов, однако у самок она была более выражена. По данным литературы с возрастом изменяется количество и состав микрофлоры, колонизирующей кишечник (Arrieta M.-C. et al., 2014), что сопровождается повышением интенсивности клиренса эндотоксина, тогда как собственный анти-эндотоксиновый иммунитет у крыс в препубертатном период еще не сформирован, а концентрация антител в молоке матери к этому периоду снижается (German J.B. et al., 2002). Однако показатели летальности от ЛПС у десятидневных самцов были выше по сравнению с самками и составили 42% у новорожденных самцов (8 крыс из 19) и 23% у самок (3 крысы из 13), что согласуется с немногочисленными данными литературы, в которых выявлены высокие показатели смертности от инфекционно-воспалительных заболеваний у мальчиков препубертатного периода (Ahmed R. et al., 2007).

При гистологическом исследовании легких и печени у десятидневных крыс Вистар половых различий морфофункционального состояния органов-мишеней на 1-е сут после введения ЛПС выявлено не было. Через сутки после введения ЛПС у десятидневных крыс Вистар в легких обнаруживался интраальвеолярный отек – 100% у самок и 80% у самцов. Количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких увеличивалось у крыс обоего пола, однако более выраженная инфильтрация нейтрофилами была выявлена у самцов. Миграция нейтрофилов и их активация – основные механизмы, ответственные за развитие острого воспаления, в том числе острого респираторного дистресс синдрома (Kruger P. et al., 2015).

В печени у крыс обоего пола в ранние сроки развития СВО обнаруживались обширные некрозы, площадь которых была выше у самцов. В сыворотке крови у десятидневных самок и самцов было выявлено увеличение уровня активности ферментов печени, показатели которых у

самцов были выше, чем у самок, что подтверждает данные морфологического исследования. На 4-е сут после введения ЛПС половых различий морфологических изменений в легких и печени выявлено не было. По данным H.S. Holley и соавторов (2012) самцы крыс в возрасте 10-15 дней постнатального онтогенеза более чувствительны к гипоксии, чем самки, что, вероятно, определяет развитие более выраженных патологических изменений в печени у самцов крыс Вистар препубертатного периода.

По ранее полученным данным по показателям объемных долей функциональных зон тимуса и селезенки у десятидневных крыс Вистар половых различий выявлено не было (Косырева А.М. и соавт. 2016). Данные литературы о половых различиях морфофункционального состояния тимуса и селезенки у животных и человека в препубертатном периоде немногочисленны и согласуются с полученными нами результатами. В исследовании на человеке показано, что масса и размеры тимуса у мальчиков и девочек в возрасте до 2 лет не различаются (Yekeler E. et al., 2004). Г.В. Ковалевский (1996) выявил, что у самцов и самок крыс-альбиносов в возрасте 1-2 недель соотношение объемной доли коркового и мозгового вещества тимуса статистически значимо не различается. В исследованиях на человеке не выявлено половых различий по показателям размера и массы селезенки у мальчиков и девочек в грудном возрасте (Megremis S.D. et al., 2004).

На 1-е сут развития СВО у десятидневных крыс обоего пола в тимусе развивалась акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризовалась сужением объемной доли коркового вещества, картиной «звездного неба» и повышением содержания апоптотически гибнущих тимоцитов. Акцидентальная инволюция тимуса у самок сопровождалась сужением субкапсулярной зоны, а у самцов в эти сроки ширина субкапсулярной зоны статистически значимо не изменялась. На 4-е сут у самок морфологическая структура тимуса восстанавливалась, а у самцов наблюдалось расширение субкапсулярной зоны, и у некоторых – в корковом веществе выявлялась картина «звездного неба». Механизмы, ответственные за опустошение тимуса при инфекционно-воспалительных заболеваниях, до конца не изучены. Одним из возможных механизмов, опосредующих активацию апоптоза клеток тимуса, является повышение уровня глюкокортикоидов в сыворотке крови (Savino W., 2006). Хорошо известно, что стероидные гормоны оказывают влияние на тимоциты через соответствующие рецепторы, экспрессирующиеся на их поверхности (Herold M.J. et al., 2006). Наиболее чувствительны к действию глюкокортикоидов двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$), в которых активируется каспаза-зависимый внутриклеточный каскад, приводящий к их апоптозу (Wang D. et al., 2006). Тогда как зрелые Т-лимфоциты ($CD4^+$ или $CD8^+$) более устойчивы к глюкокортикоидам, вследствие активации CD28-зависимого внутриклеточного каскада, который подавляет транскрипцию генов-апоптоза Bcl-X(L) (van den Brandt J. et al., 2004). Помимо

кортикостерон-зависимого апоптоза тимоцитов немаловажную роль в этом процессе играют провоспалительные цитокины (ФНО-α и ИФН-γ), уровень продукции которых при инфекционно-воспалительных заболеваниях увеличивается. Показано, что высокий уровень ФНО-α может приводить к снижению количества двойных позитивных лимфоцитов даже при инкубации тимоцитов с антагонистами глюкокортикоидов (Pozzesi N. et al., 2014). Также прямое негативное влияние на клетки тимуса оказывают ЛПС и энтеротоксин *E. coli* (Tsuji T. et al., 2000).

В селезенке у десятидневных самок и самцов в разные сроки развития СВО не было выявлено морфологических изменений и половых различий. Иммунная система у животных и человека в препубертатный период еще функционально незрелая, а селезенка в этот период у крыс выполняет в основном гемопоэтическую функцию (Artinger K. et al., 2015). Видимо поэтому у десятидневных крыс Вистар обоего пола в разные сроки развития СВО изменений объемных долей белой пульпы селезенки выявлено не было.

В контрольной группе у десятидневных самок уровень продукции клетками селезенки ИЛ-2 и содержание неоптерина в сыворотке крови были выше, чем у самцов, что свидетельствует о более выраженной активности иммунной системы у самок. Однако по данным V. Wiegering и соавт. (2009) по сравнению с девочками у мальчиков в возрасте до 6 лет уровень продукции Т-лимфоцитами ИЛ-2 выше, что не согласуется с полученными нами результатами, что возможно, связано с видовыми особенностями и разными методическими подходами к определению уровня продукции цитокинов: авторы определяли продукцию цитокинов ФГА стимулированными моноцитами периферической крови.

Показатели содержания неоптерина в разные сроки эксперимента у самцов десятидневных крыс Вистар не отличались от контрольной группы, а у самок, напротив, наблюдалось увеличение этого показателя. Известно, что неоптерин - амино-производное конденсированного азотистого гетероцикла птеридина, синтезируется при активации макрофагов, оказывает провоспалительное действие и является маркером активации ИФН-γ–зависимого Тх1-типа иммунного ответа (Pourakbari B. et al., 2010). Согласно полученным данным, в отличие от самок, у самцов десятидневных крыс Вистар в разные сроки развития СВО не происходит активация ИФН-γ зависимого Тх1-типа иммунного ответа.

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у десятидневных самок и самцов крыс Вистар обнаружено снижение содержания TGF-β – противовоспалительного цитокина. Однако в эти сроки развития СВО у крыс обоего пола выявлена супрессия продукции провоспалительного ФНО-α, Тх1-цитокина ИЛ-2 и Тх2-цитокина ИЛ-4 клетками селезенки. На 4-е сут развития СВО у крыс обоего пола наблюдалась супрессия продукции ИЛ-2, ФНО-α, однако у самок также было выявлено снижение ИФН-γ и нормализация содержания неоптерина в сыворотке крови.

Снижение продукции и секреции клетками селезенки ИЛ-2 и ФНО-α после введения ЛПС у десятидневных крыс может быть обусловлено высоким содержанием кортикостерона, который оказывает противовоспалительное и иммуносупрессорное действие (Wang D. et al., 2006). Также показано, что дети в препубертатном возрасте характеризуются низким уровнем экспрессии селектинов и хемокинов, уровень которых у них при сепсисе резко возрастает, что способствует усилению миграции лейкоцитов в очаг воспаления (Zonneveld R. et al., 2014). Показано, что у здоровых мышей в возрасте 5-7 дней снижен уровень экспрессии генов, ответственных за развитие адаптивного иммунитета (гены, ответственные за экспрессию главного комплекса гистосовместимости MHC II - *Mhc II,* костимулирующего белка антигенпредставляющих клеток CD40 – *Cd40,* B- и T-лимфоцитарного ингибирующего рецептора BTLA – *Btla*) и воспаления (гены, ответственные за экспрессию ИЛ1β – *il1β,* и аргиназы, катализирующей гидролиз аргинина, – *Arg2*). В этот возрастной период активирована экспрессия генов, участвующих в пролиферации и дифференцировке лимфоцитов – *Rag1* и *Rag2 (*Recombination activating gene 1, 2 - гены, активирующие рекомбинацию*)*, что, в целом, свидетельствует о процессах функционального созревания иммунной системы у животных препубертатного периода (Gentile L.F. et al., 2014).

При развитии так называемого абдоминального сепсиса у самцов мышей препубертатного периода по сравнению с животными репродуктивного возраста отмечается более высокая смертность в перпубертатный период, что сопровождается снижением уровня продукции про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-6 и ИЛ-10), как и хемокинов MCP-1 и MIP-1α, низким количеством перитонеальных нейтрофилов и макрофагов, а также продукцией реактивных форм кислорода (Gentile L.F. et al., 2014). Иммунный ответ у мышей препубертатного периода при развитии абдоминального сепсиса не выражен, что, по-видимому, связано со сниженной экспрессией генов, ответственных за пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку числа Т-лимфоцитов, развитие и созревание клеток крови и лейкоцитов (Gentile L.F. et al., 2014).

В периферической крови у самок контрольной группы число NK-клеток было выше, чем у самцов. NK-клетки – компонент врожденного звена иммунного ответа, они оказывают провоспалительное действие, фагоцитируют чужеродные клетки, а также приводят к их лизису и продуцируют провоспалительные цитокины (Vivier E. et al., 2008). Выраженность провоспалительного ответа, опосредованного функционированием NK-клеток, регулируется многими факторами, в том числе и половыми стероидами, которые связываются с соответствующими рецепторами, экспрессируемыми на их мембранах (Vivier E. et al., 2011). Согласно полученным данным самки в препубертатном периоде характеризуются более выраженным врожденным NK-компонентом иммунного ответа по сравнению с самцами.

На 1-е сут после введения ЛПС у самок обнаруживалось снижение числа Т-хелперов, Т-цитотоксических, Т-регуляторных и двойных позитивных лимфоцитов. Тогда как у самцов было выявлено снижение только Т-цитотоксических и В-лимфоцитов. По данным литературы снижение числа $CD8^+$ лимфоцитов коррелирует с тяжестью течения абдоминального сепсиса у мышей (Condotta S.A. et al., 2013). В клинике у септических больных снижение количества Т-цитотоксических лимфоцитов является одним из показателей развития «иммунного паралича» (Boomer J.S. et al., 2011). Многочисленными исследованиями показано снижение количества CD4+ лимфоцитов в периферической крови в ранние сроки заболевания у септических больных как репродуктивного возраста, так и детей в возрасте от 1 года до 18 лет, а также выявлена отрицательная корреляция между числом Т-лимфоцитов и тяжестью течения сепсиса (Gouel-Cheron A. et al., 2012; Hoser G.A. et al., 2012; Wu H.P. et al., 2013; Cabrera-Perez J. et al., 2014; Muszynski J.A. et al., 2014). Однако в этих исследованиях авторами пол не учитывался. K.M. Kelly-Scumpia и соавт. (2011) установлена взаимосвязь между количеством В-лимфоцитов в периферической крови у мышей с СВО, обусловленном перитонитом, и тяжестью течения заболевания. Также показано снижение числа Т-регуляторных лимфоцитов в крови в экспериментальных моделях сепсиса на ранних фазах его развития, что сочеталось с высокими показателями смертности (Tatura R. et al., 2015). Однако в литературе нет работ, касающихся половых различий изменений числа субпопуляций лимфоцитов при сепсисе или ССВО как у детей, так и у экспериментальных животных. Нами впервые показано, что у десятидневных самок крыс Вистар в ранние сроки развития СВО наблюдается снижение числа Т-хелперов, Т-цитотоксических и Т-регуляторных лимфоцитов, что, по-видимому, отражает различия выраженности процессов миграции, дифференцировки и гибели лимфоцитов периферической крови у самок по сравнению с самцами.

Таким образом, на ранних сроках у десятидневных самок крыс Вистар СВО характеризуется снижением содержания прогестерона и кортикостерона, стократным увеличением уровня эндотоксина, выраженными воспалительными и патологическими изменениями в легких и печени, повышением активности АлАТ в сыворотке крови, акцидентальной инволюцией II стадии, с опустошением коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны, выраженным апоптозом тимоцитов и CD3+ лимфоцитов тимуса, снижением уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО-α клетками селезенки и количества Т-хелперов, Т-цитотоксических, Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови, что отражает выраженную иммуносупрессию у самок с СВО в этот возрастной период. В эти сроки развития СВО у десятидневных самцов содержание кортикостерона, тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови повышалось, воспалительные и патологические изменения в органах-мишенях были более выражены, по сравнению с самками. В тимусе обнаруживалась

акцидентальная инволюция II стадии с сужением коркового вещества, наблюдался выраженный апоптоз тимоцитов, в том числе и CD3+ лимфоцитов тимуса, супрессия продукции ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО-α клетками селезенки и снижение числа Т-цитотоксических и В-лимфоцитов в периферической крови.

На 4-е сут после введения ЛПС у десятидневных крыс обоего пола наблюдалась выраженная эндотоксинемия. В эти сроки развития СВО у самцов содержание половых гормонов нормализовалось, а концентрация тестостерона снижалась, тогда как у самок наблюдалось снижение содержания половых стероидов на фоне повышения кортикостерона в сыворотке крови. Воспалительные и патологические изменения в органах-мишенях сохранялись, половых различий по этим показателям выявлено не было. В тимусе у самок обнаруживалась акцидентальная инволюция I, а у самцов - II стадии. Уровень продукции цитокинов у десятидневных животных обоего пола оставался сниженным по отношению к соответствующим контрольным группам, что свидетельствует о развитии выраженной иммуносупресии на 4-е сут после введения ЛПС самкам и самцам десятидневных крыс Вистар.

По данным оценки информативности значимо изменяющихся показателей при СВО показано, что в разные сроки после введения ЛПС у препубертатных крыс обоего пола максимальную патогенетическую значимость в развитии СВО играет эндотоксинемия, что сопровождается выраженной тяжестью течения воспаления. Среди иммунологических нарушений при СВО у самцов как в ранние, так и в поздние сроки, максимальную информативность имело снижение уровня продукции провоспалительного цитокина ФНО-α, а у самок уменьшение продукции ИФН-γ и ФНО-α приобретало значимость только в поздние сроки эксперимента.

Глава 5 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

5.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла

Согласно данным, полученным ранее, морфофункциональное состояние иммунной системы у самок циклически изменяется в зависимости от фазы эстрального цикла (Симонова Е.Ю., Косырева А.М., 2012). По сравнению с другими фазами эстрального цикла фаза проэструса, при которой наблюдается максимальный уровень эстрадиола в сыворотке крови, характеризуется наиболее выраженной реакцией иммунной системы на антигенные воздействия (Angele M.K. et al., 2006). Для оценки морфологических изменений и иммунологических нарушений при СВО у половозрелых самок крыс Вистар в зависимости от фазы эстрального цикла отбирали крыс с устойчивым 4-х дневным циклом. Фазу цикла определяли по влагалищным мазкам. В две фазы эстрального цикла: фазу проэструса и диэструса, которые отличаются между собой по содержанию эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови, крысам вводили ЛПС в дозе 1,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 1-е сут после введения ЛПС.

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

Через сутки после введения ЛПС содержание эстрадиола в сыворотке крови у самок в фазу проэструса и диэструса статистически значимо снижалось по сравнению с соответствующей контрольной группой (табл. 5.1.1). Концентрация прогестерона и общего тестостерона в сыворотке крови опытных групп после введения им ЛПС повышалась. Различия между самками в фазу проэструса и диэструса на 1-е сут после введения ЛПС были выявлены по уровню эстрадиола: его концентрация была выше в группе самок, которым вводили ЛПС в фазу проэструса.

Таблица 5.1.1
Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови у самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (Me; 25%-75%)

Фаза эстрального цикла	Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Проэструс	**Контрольная (n=10)**	37,19 (28,32-46,31)[1*]	9,50 (7,42-14,06)[1]	0,08 (0,06-0,11)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	18,0 (11,06-20,17)[2]	45 (40,5-48)[2]	1,34 (0,56-1,62)[2]
Диэструс	**Контрольная (n=8)**	23,68 (21,36-25,28)[3]	18,46 (18,18-21,00)[3]	0,12 (0,08-0,14)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=5)	6,19(1,50-7,31)[4]	46 (41-48)[4]	0,77 (0,52-1,07)[4]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}0062^{1\text{-}2}$ $0{,}0080^{3\text{-}4}$ $0{,}0034^{1\text{-}3}$ $0{,}0340^{2\text{-}4}$	$0{,}0027^{1\text{-}2}$ $0{,}0045^{3\text{-}4}$ $0{,}0027^{1\text{-}3}$ $0{,}8075^{2\text{-}4}$	$0{,}0027^{1\text{-}2}$ $0{,}0090^{3\text{-}4}$ $0{,}2730^{1\text{-}3}$ $0{,}2910^{2\text{-}4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения легких у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

При морфологическом исследовании в легких у самок контрольной группы в разные фазы эстрального цикла в респираторном отделе в слизистой оболочке бронхов, их мышечной и адвентициальной оболочках изменений не выявлено. В просветах бронхов выявлялись единичные десквамированные эпителиальные клетки. Слизистая оболочка бронхов была представлена кубическим реснитчатым эпителием, который располагался в 1-2 ряда. Межальвеолярные перегородки тонкие, при увеличении 400 в них выявлялись единичные нейтрофилы. Альвеолярные ходы воздушные.

Через сутки после введения ЛПС в воздухопроводящих путях патологических изменений не было выявлено. В респираторном отделе определялись неравномерно воздушные альвеолярные ходы, отмечался интраальвеолярный отек и острая эмфизема (рис. 5.1.1). Периваскулярные лимфатические сосуды расширены, по ходу соединительной ткани, окружающей сосуды, слабо выраженная диффузная нейтрофильная инфильтрация. В межальвеолярных перегородках легких крыс обеих групп наблюдалось увеличение числа нейтрофилов. В сосудах микроциркуляторного русла определялось полнокровие, стазы и сладжи.

Развитие СВО у самок крыс Вистар в фазы проэструса и диэструса характеризовалось увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких (табл. 5.1.2, рис 5.1.2). По сравнению с самками в фазу проэстурса в легких самок в фазу диэструса через сутки после введения ЛПС, вызывающего развитие системного воспалительного ответа, число нейтрофилов было статистически значимо выше.

Таким образом, воспалительные изменения в легких более выражены у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса.

Таблица 5.1.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (Me; 25%-75%)

Фаза эстрального цикла	**Группа наблюдения**	**Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (в поле зрения)**
Проэструс	**Контрольная (n=10)**	1,57 (1,43-2,00)[1]*
	ЛПС 1-е сут (n=7)	19,55 (15,6-25,1)[2]
Диэструс	**Контрольная (n=8)**	1,00 (0,71-1,86)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=5)	27,5 (26,5-35,3)[4]
Статистическая значимость различий (p)		0,0061[1-2] 0,0090[3-4] 0,2505[1-3] 0,0284[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

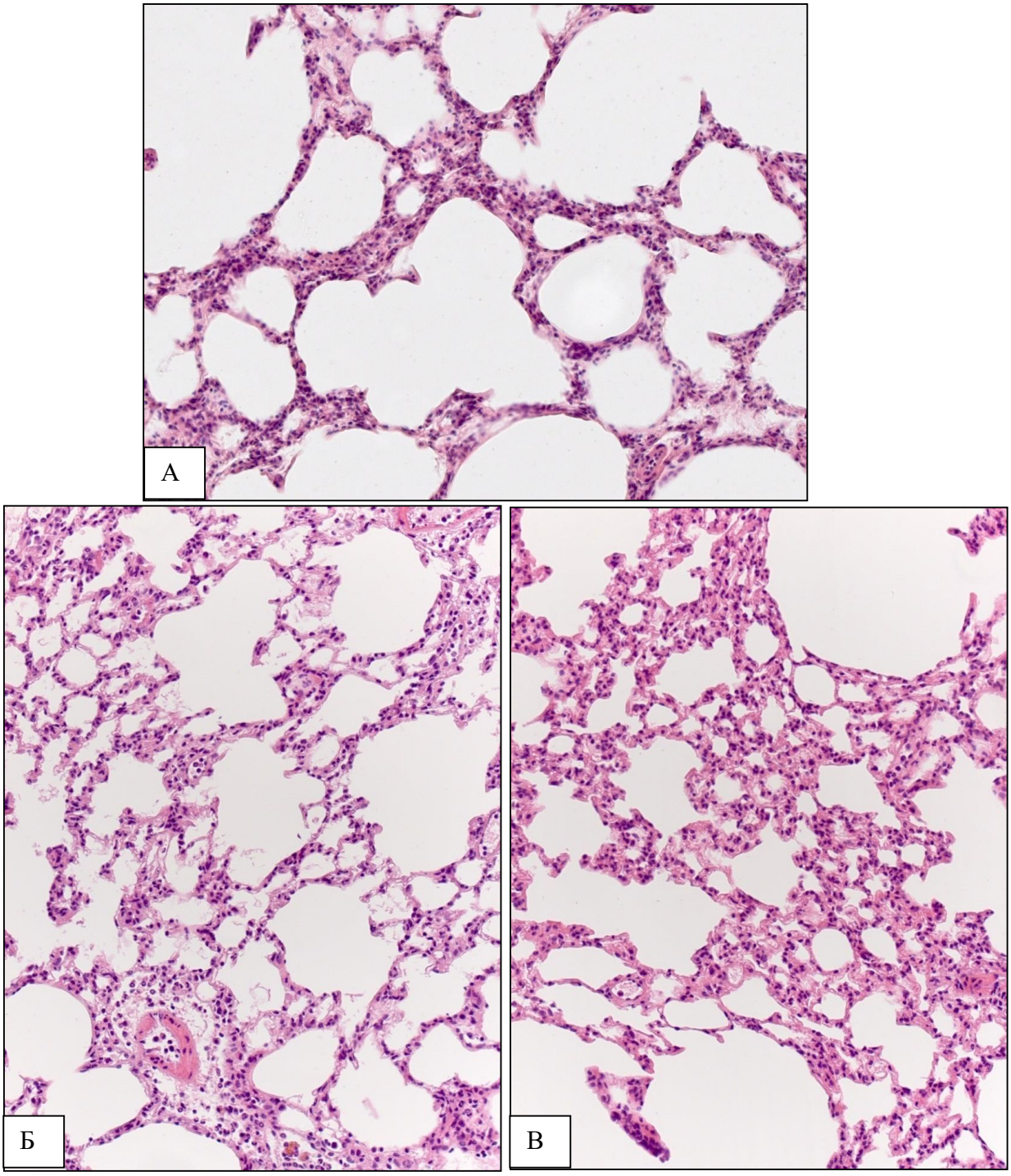


Рис. 5.1.1. Морфологическая характеристика легких самок крыс Вистар контрольной группы (А) и при СВО в разные фазы эстрального цикла (Б - проэструс, В - диэструс). Контрольная *группа* (А): тонкие межальвеолярные перегородки, просветы альвеолярных ходов воздушные. *На 1-е сут после введения ЛПС*: проэструс (Б) и диэструс (В) – в просветах бронхов зернистое эозинофильное содержимое, межальвеолярные перегородки очагово утолщены. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

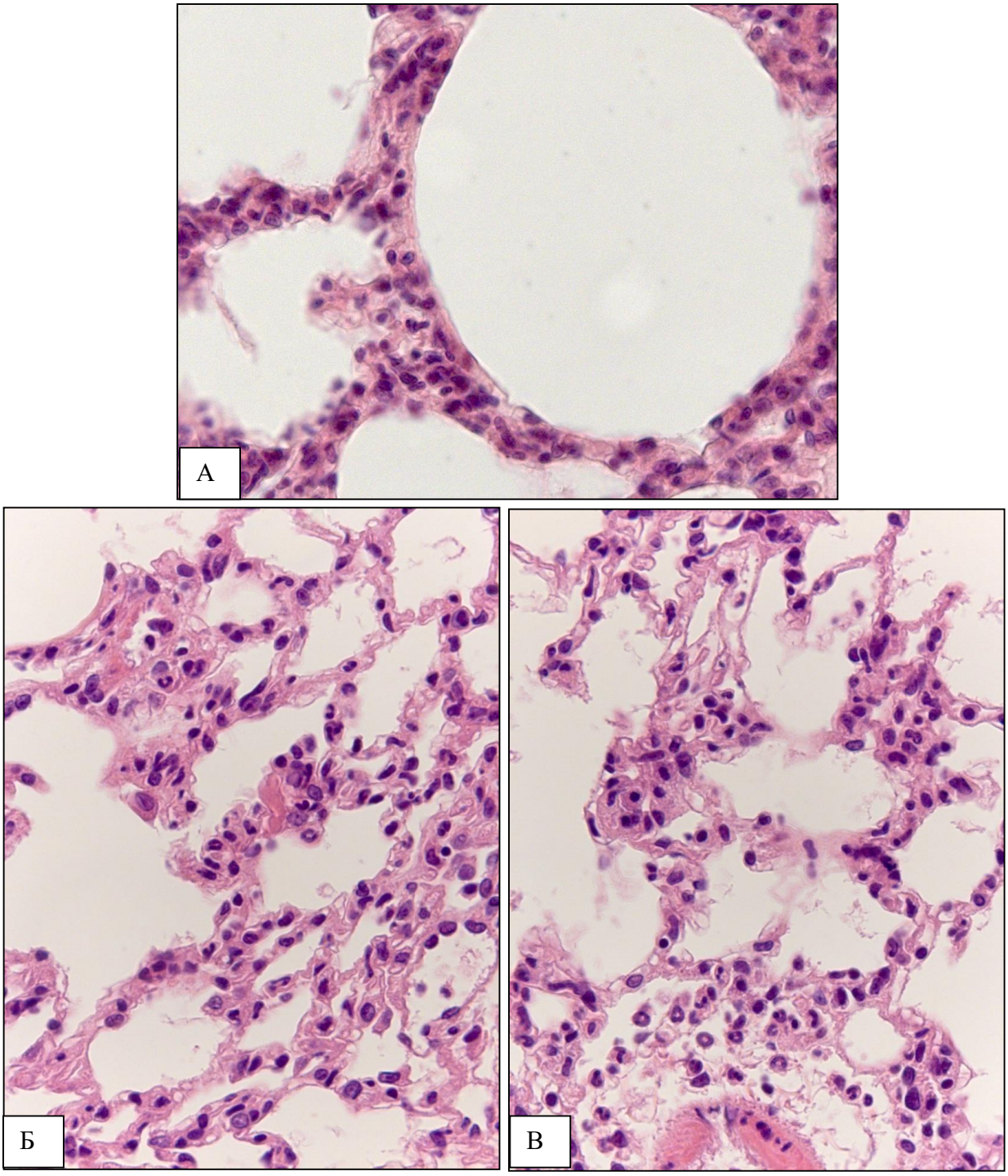


Рис. 5.1.2. Морфологическая характеристика легких самок крыс Вистар контрольной группы (А) и при СВО в разные фазы эстрального цикла (Б - проэструс, В - диэструс). Контрольная группа (А): тонкие межальвеолярные перегородки, единичные нейтрофилы в поле зрения. *На 1-е сут после введения ЛПС*: проэструс (Б) и диэструс (В) – межальвеолярные перегородки очагово утолщены, в них выявляются нейтрофилы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 640

Морфологические изменения печени у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

На 1-е сутки после введения ЛПС в печени у самок в разные фазы цикла выявлена распространенная вакуольная дистрофия гепатоцитов с тенденцией к большей выраженности патологического процесса в периферических отделах дольки. По ходу балок число неэпителиальных клеточных элементов было увеличено, среди них появлялись единичные нейтрофилы. По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация, неравномерное полнокровие, в просветах отдельных мелких вен нити фибрина не выявлены (рис. 5.1.3). Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, стазы и сладжи.

В фазу проэструса через сутки после введения самкам ЛПС в печени выявлены выраженные и умеренно выраженные дистрофические изменения гепатоцитов, у 1 крысы из 7 – единичные очаговые некрозы (рис. 5.1.3). В фазу диэструса обнаружена выраженная вакуольная дистрофия гепатоцитов и ландшафтообразные некрозы (у 4 крыс из 5) (рис. 5.1.3). При полуколичественной оценке патологических изменений в печени на 1-е сут после введения ЛПС дистрофические и некротические изменения гепатоцитов у самок крыс Вистар были более выражены в фазе диэструса (табл. 5.1.3).

Таким образом, в печени у самок крыс Вистар, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, дистрофия гепатоцитов выраженная и распространенная, некрозы ландшатообразные. В отличие от самок, которым моделировали СВО в фазу проэструса: альтеративные изменения в печени выражены минимально.

Таблица 5.1.3

Показатель выраженности альтеративных изменений в печени у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (Me; 25%-75%)

Фаза эстрального цикла	Группа наблюдения	Выраженность дистрофических и некротических изменений (баллы)
Проэструс	**Контрольная**	-
	ЛПС 1-е сут (n=7)	3,00 (2,00-3,00)
Диэструс	**Контрольная**	-
	ЛПС 1-е сут (n=5)	4,00 (3,75-4,50)
Статистическая значимость различий (p)		0,0196

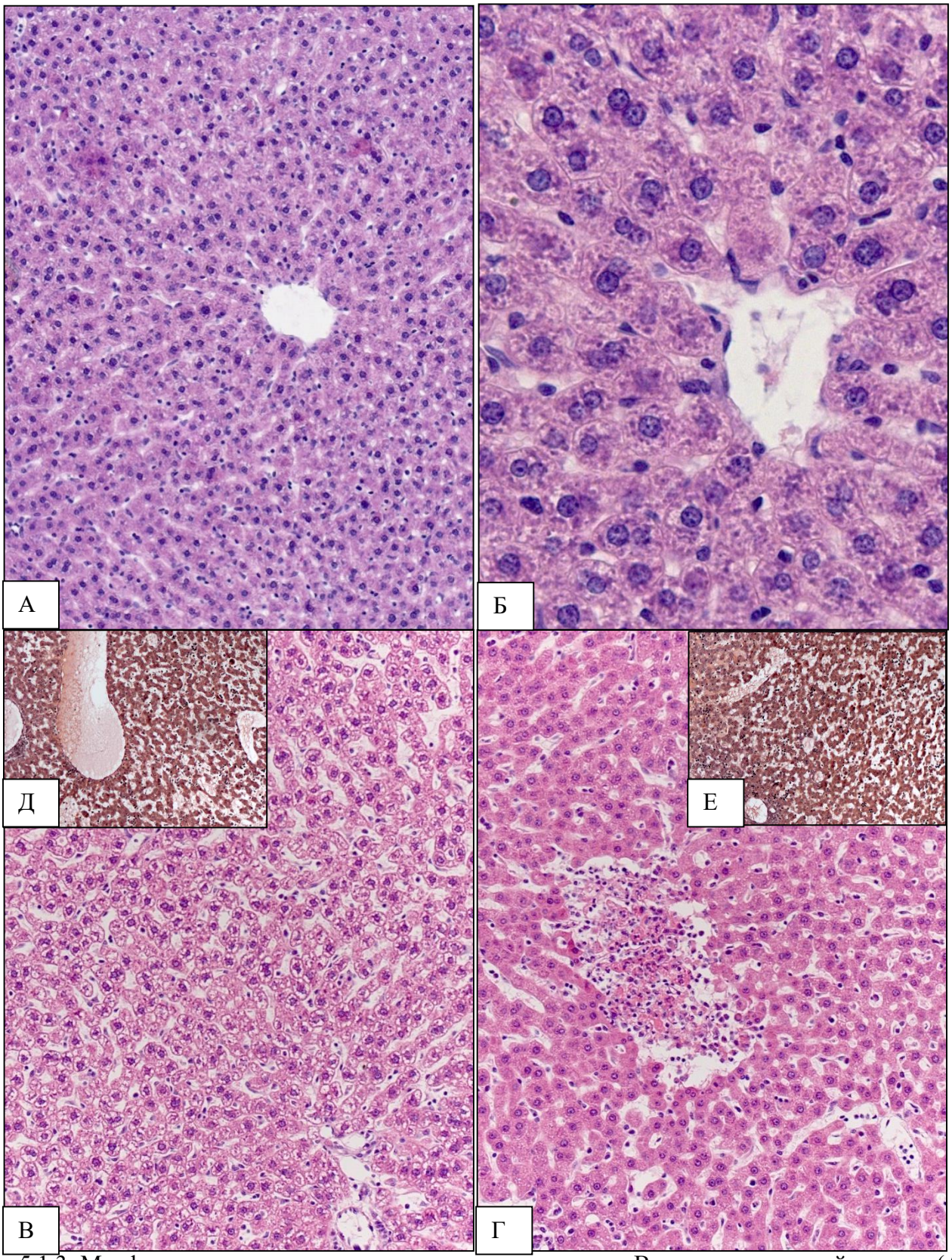


Рис. 5.1.3. Морфологические изменения в печени у самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и при СВО в разные фазы эстрального цикла (В - проэструс, Г - диэструс). *Контрольная группа (А, Б):* гепатоциты без дистрофических изменений. *Самки с СВО в фазу проэструса (В):* распространенная выраженная вакуольно-капельная дистрофия гепатоцитов, по ходу балок скудная гистиоцитарная инфильтрация. *Самки с СВО в фазу диэструса (Г)*: очаговый некроз. Д, Е – отложения фибрина не выявлено. Окраска гематоксилином и эозином (А-Г), окраска на фибрин (Д, Е). Ув. А, В, Г. 200; Д, Е 400; Б 640

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

Через сутки после введения ЛПС по сравнению с самками в фазу проэструса активность АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у крыс в фазу диэструса была статистически значимо выше (табл. 5.1.4).

Введение ЛПС крысам Вистар в фазу проэструса не вызывало изменений уровня эндотоксина в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой. Однако развитие СВО в фазу диэструса у крыс Вистар сопровождалось статистически значимым увеличением содержания эндотоксина в сыворотке крови (табл. 5.1.4).

Концентрация кортикостерона изменяется в соответствии с фазами эстрального цикла, и в фазу диэструса содержание кортикостерона в сыворотке крови выше, чем в фазу проэструса (табл. 5.1.4). При введении ЛПС в фазу диэструса концентрация кортикостерона снижалась, а в фазу проэструса – повышалась, что, возможно, связано с воздействием вводимого ЛПС, а также является следствием циклического синтеза стероидных гормонов у самок (табл. 5.1.1).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, выявлена выраженная эндотоксинемия, высокий уровень активности ферментов печени и снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови. У самок, которым моделировали ЛПС в фазу проэструса, эндотоксинемия не обнаружена, но у них наблюдается повышение содержания противовоспалительного гормона кортикостерона.

Таблица 5.1.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (Me; 25%-75%)

Фаза эстрального цикла	Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
		АлАТ	АсАТ		
Проэструс	Контрольная (n=10)	-	-	3,14 (2,85-3,19)[1]	64,47 (54,6-74,4)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	20 (16-31)[1*]	39 (39-68)[1]	3,48 (3,06-5,33)[2]	109,8 (107,3-140,3)[2]
Диэструс	Контрольная (n=8)	-	-	2,91 (2,11-4,16)[3]	378,4 (338-450)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=5)	161 (40-410)[2]	215 (42-593)[2]	8,01 (5,13-9,65)[4]	86,94 (74,7-94,9)[4]
Статистическая значимость различий (p)		0,02[1-2]	0,02[1-2]	0,340[1-2] 0,017[3-4] 0,679[1-3] 0,088[2-4]	0,008[1-2] 0,004[3-4] 0,045[1-3] 0,161[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения тимуса у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

В контрольной группе крыс Вистар в фазу диэструса при морфологическом исследовании в тимусе преобладало корковое вещество (табл. 5.1.5, рис. 5.1.4), а в фазу проэструса – мозговой (рис. 5.1.4). В субкапсулярной зоне тимуса крыс в фазу диэструса выявлялись лимфобласты, образующие 2-4 ряда клеток, а в фазу проэструса – 8-10. В поле зрения при ув. 400 выявлялись единичные митозы. В мозговом слое тимические тельца I-II фаза развития были образованы 4-5 эпителиальными клетками.

Развитие СВО у самок в фазу проэструса сопровождалось акцидентальной инволюцией тимуса I-II стадий, характеризующейся расширением коркового слоя тимуса (табл. 5.1.5). В фазу диэструса через сутки после введения ЛПС наблюдалась акцидентальная инволюция тимуса I-II стадий, в корковом веществе выявлена картина «звездного неба», фрагменты ядер, появление макрофагов, фагоцитирующих гибнущие клетки. Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткими. В мозговом веществе обеих групп определялись тимические тельца фаз развития, состоящие из 4-5 концентрически расположенных эпителиальных клеток с накоплением кератогиалина в центре.

По данным морфометрической оценки тимуса у крыс, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, показатель объемной доли коркового вещества не изменялся. На 1-е сут после введения ЛПС у крыс как в фазу проэструса, так и в фазу диэструса, было выявлено увеличение ширины субкапсулярной зоны тимуса (табл. 5.1.5). Однако по сравнению с самками в фазу диэструса, тимус в фазу проэструса характеризовался более широкой субкапсулярной зоной.

Таким образом, при введении ЛПС в фазу диэструса в тимусе развивается акцидентальная инволюция II стадии, наблюдается снижение объемной доли коркового вещества и расширение субкапсулярной зоны. У самок, которым моделировали СВО в фазу проэструса, в тимусе выявлена акцидентальная инволюция I стадии. По сравнению с контрольной группой корковое вещество и субкапсулярная зона расширяются.

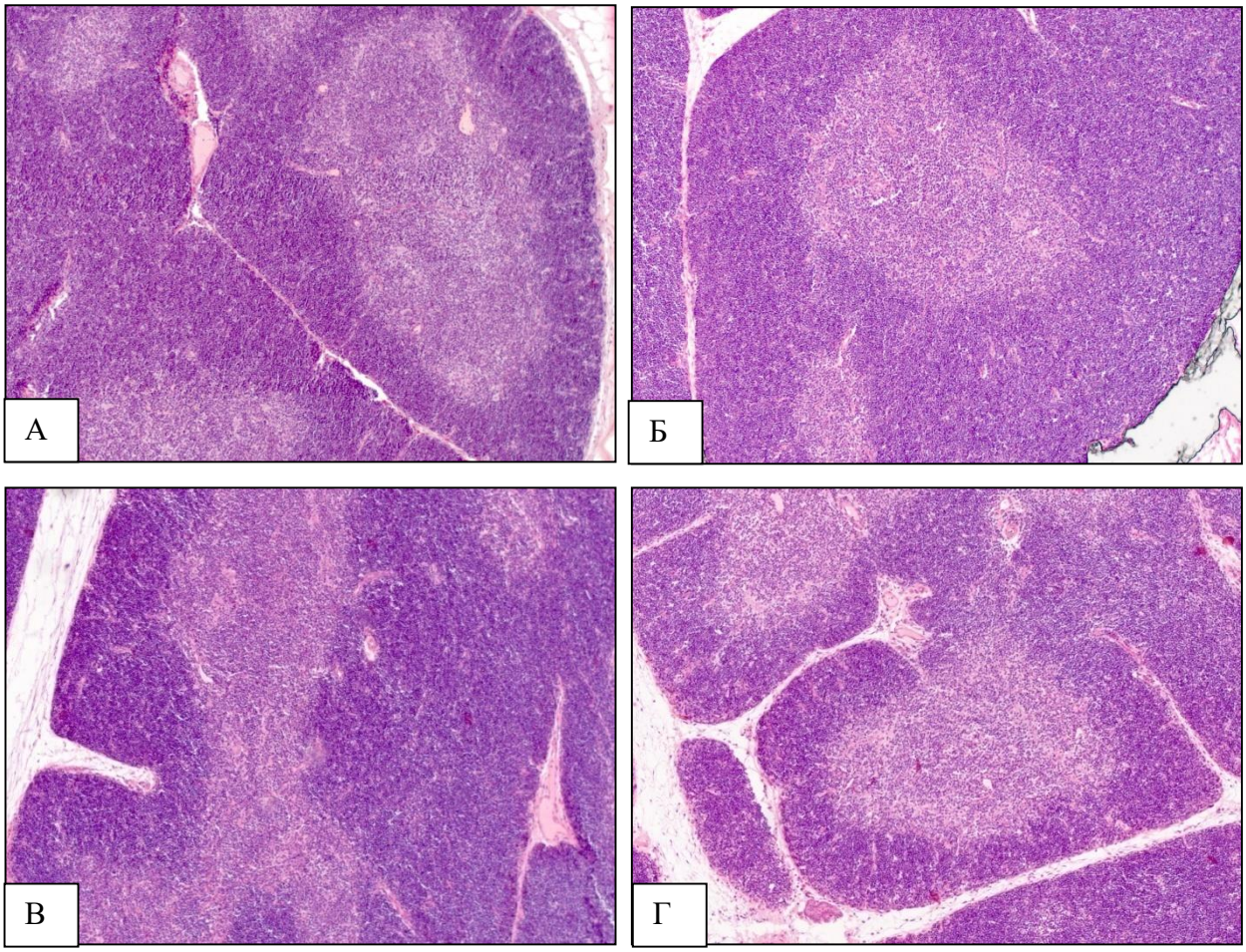


Рис. 5.1.4. Морфологические изменения в тимусе самок крыс Вистар в фазу проэструса (А, В) и диэструса (Б, Г) контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения ЛПС (В, Г). *Контрольная группа: А (*проэструс) – *к*орковое и мозговое вещество представлены в соотношении 1:1, границы между зонами четкие; Б (диэструс) – широкое корковое вещество тимуса, границы между мозговым и корковым веществом четкие. *На 1-е сут после введения ЛПС:* В (проэструс) – акцидентальная инволюция I стадии, расширение коркового вещества; Г (диэструс) – акцидентальная инволюция II стадии, сужение коркового вещества тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

Таблица 5.1.5

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (M±m)

Фаза эстрального цикла	Группа наблюдения	Корковое вещество, %	Мозговое вещество, %	Индекс отношения коркового вещества к мозговому	Субкапсулярная зона, мкм
Проэструс	**Контрольная (n=10)**	49,64±0,97[1*]	50,36±0,97[1]	0,99±0,05[1]	34,55±0,59[1]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	57,03±1,37[2]	42,97±1,37[2]	1,42±0,08[2]	44,99±1,60[2]
Диэструс	**Контрольная (n=8)**	64,96±1,57[3]	35,04±1,57[3]	1,91±0,15[3]	24,02±0,55[3]
	ЛПС 1-е сут (n=5)	59,19±2,96[4]	40,81±2,96[4]	1,67±0,21[4]	36,85±1,32[4]
Статистическая значимость различий (p)		0,0043[1-2] 0,1745[3-4] 0,0017[1-3] 0,4649[2-4]	0,0043[1-2] 0,1745[3-4] 0,0017[1-3] 0,4649[2-4]	0,0032[1-2] 0,6015[3-4] 0,0017[1-3] 0,2911[2-4]	0,0044[1-2] 0,0090[3-4] 0,0090[1-3] 0,0118[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения селезенки у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

В контрольной группе у половозрелых самок крыс Вистар белая пульпа представлена лимфоидными узелками с небольшими светлыми центрами и хорошо выраженной ПАЛМ-зоной (рис. 5.1.5). В селезенке у самок с СВО, который моделировали как в фазу проэструса, так и в фазу диэструса, наблюдалось «опустошение» белой пульпы, представленной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками. При морфометрическом исследовании функциональных зон селезенки было показано, что снижение показателей объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков было более выражено у самок, развитие СВО у которых было индуцировано в фазу диэструса (табл. 5.1.6). У крыс, которым вводили ЛПС в фазу проэструса, статистически значимо уменьшалась только Т-зависимая ПАЛМ-зона, а показатель объемной доли лимфоидных узелков не изменялся (табл. 5.1.6). При морфометрической оценке В-зоны селезенки, представленной лимфоидными узелками, было показано, что развитие СВО у самок в фазу проэструса и диэструса сопровождалось уменьшением маргинальной зоны и расширением герминативных центров лимфоидных узелков селезенки (табл. 5.1.6, рис. 5.1.5, 5.1.6). Однако эти изменения были более выражены у самок крыс Вистар, которым вводили ЛПС в фазу диэструса (табл. 5.1.6).

Таким образом, через сутки после введения ЛПС у самок крыс Вистар как в фазу проэструса, так и диэструса, в селезенке опустошалась ПАЛМ-зона, уменьшались размеры лимфоидных узелков и расширялись их герминативные центры. По сравнению с самками, которым ЛПС вводили в фазу проэструса, в фазу диэструса выявленные изменения Т- и В-зон были более выражены.

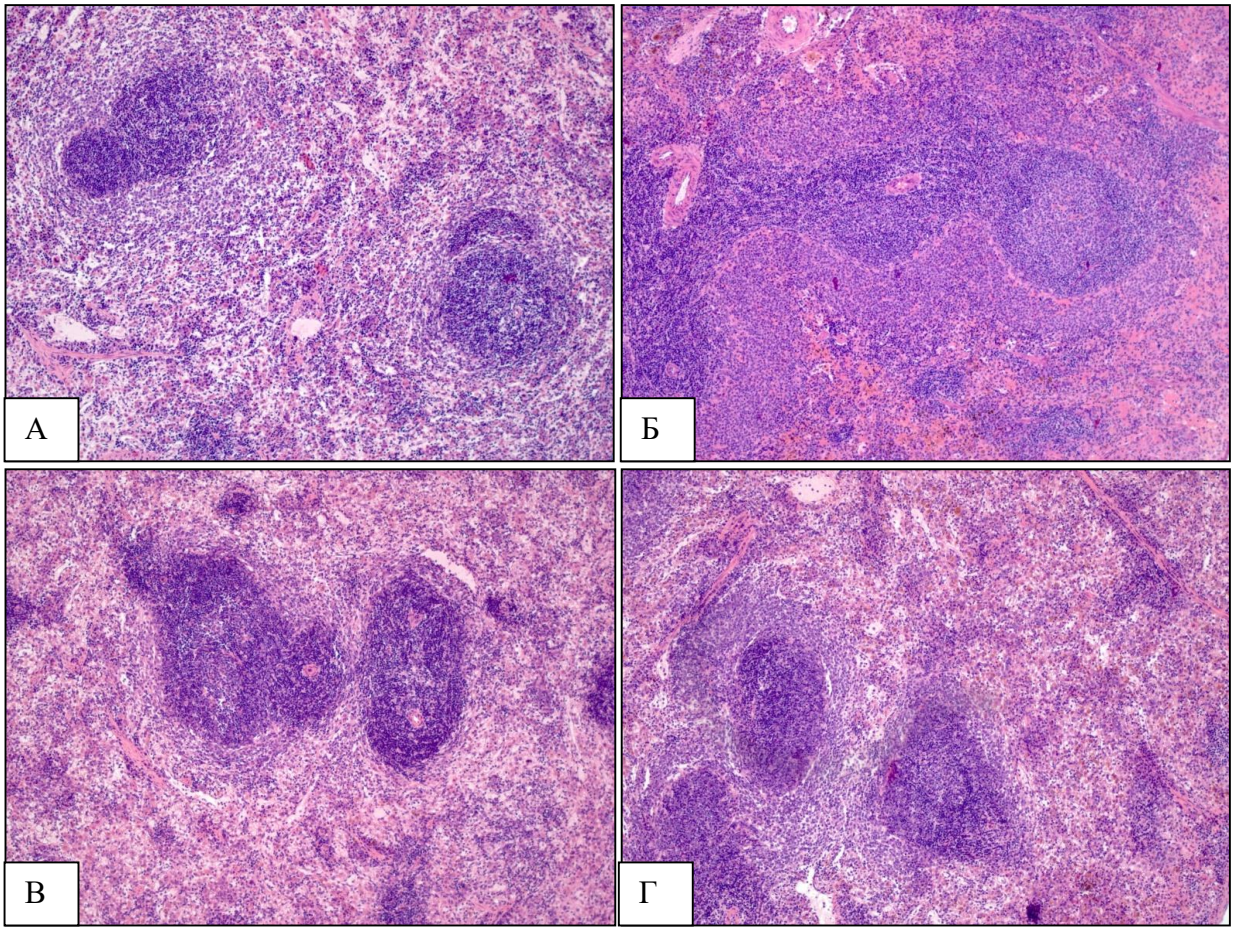


Рис. 5.1.5. Морфологические изменения в селезенке у самок крыс Вистар в фазу проэструса (А, В) и диэструса (Б, Г) контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения ЛПС (В, Г). К*онтрольная группа:* А (проэструс) – узкая ПАЛМ-зона, небольшие лимфоидные узелки с узкими светлыми центрами; Б (диэструс) – белая пульпа хорошо выражена, широкая ПАЛМ-зона, лимфоидные узелки с широкими светлыми центрами. *На 1-е сут после введения ЛПС:* В (проэструс) – опустошение белой пульпы, ПАЛМ-зона не выражена; (Г) – менее выраженная ПАЛМ-зона и небольшие лимфоидные узелки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

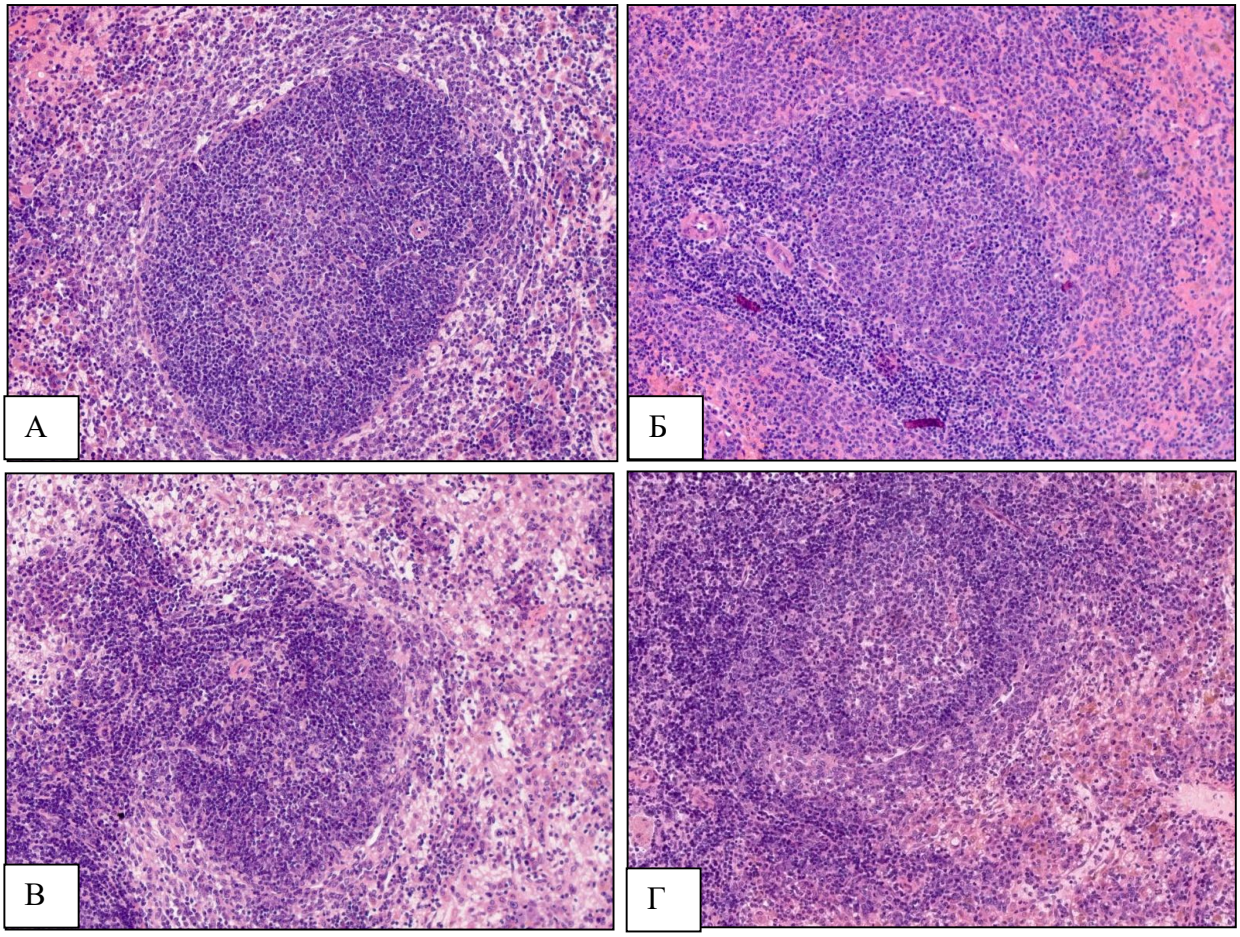


Рис. 5.1.6. Морфологические изменения селезенки у самок крыс Вистар в фазу проэструса (А, В) и диэструса (Б, Г) контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения ЛПС (В, Г). К*онтрольная группа:* А (проэструс) – лимфоидный узелок с широкой маргинальной зоной и небольшим светлым центром; Б (диэструс) – лимфоидный узелок с широкой маргинальной зоной и светлым центром. *На 1-е сут после введения ЛПС:* В (проэструс) – узкие маргинальная зона и небольшой светлый центр лимфоидного узелка по сравнению с контрольной группой (А); Г (диэструс) – узкая маргинальная зона и широкий светлый центр лимфоидного узелка по сравнению с контрольной группой (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

Таблица 5.1.6

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (M±m)

Фаза эстрального цикла	Группа наблюдения	ПАЛМ, %	ЛУз, %	БП, %	Индекс отношения БП к КП	МЗ, %	ГЦ, %
Проэструс	**Контрольная (n=10)**	28,24±0,69[1*]	15,45±0,43[1]	43,69±0,81[1]	0,77±0,81[1]	44,86±1,02[1]	22,40±0,84[1]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	20,94±1,71[2]	14,74±1,51[2]	35,71±3,12[2]	0,61±0,09[2]	31,91±2,78[2]	46,02±6,27[2]
Диэструс	**Контрольная (n=8)**	40,05±2,31[3]	29,20±2,53[3]	69,25±3,38[3]	3,51±0,71	31,40±1,71	20,74±1,42
	ЛПС 1-е сут (n=5)	16,28±0,98[4]	12,12±2,63[4]	28,40±3,07[4]	0,43±0,06[4]	22,15±3,86[4]	62,86±5,51[4]
Статистическая значимость различий (p)		0,0006[1-2] 0,0000[3-4] 0,0002[1-3] 0,0606[2-4]	0,6035[1-2] 0,0008[3-4] 0,0000[1-3] 0,3710[2-4]	0,0120[1-2] 0,0000[3-4] 0,0000[1-3] 0,1377[2-4]	0,0439[1-2] 0,0000[3-4] 0,0001[1-3] 0,1507[2-4]	0,0002[1-2] 0,0040[3-4] 0,0000[1-3] 0,0609[2-4]	0,0002[1-2] 0,0497[3-4] 0,1748[1-3] 0,3894[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения; ПАЛМ – периартериолярные лимфоидные муфты, ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса

В течение эстрального цикла уровень продукции цитокинов клетками селезенки варьировал. В фазу проэструса показатели продукции и секреции клетками селезенки ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО-α была выше, чем в фазу диэструса, а в сыворотке крови выявлено более высокое содержание TGF-β. По сравнению с фазой проэструса в фазу диэструса в сыворотке крови была выше концентрация неоптерина.

Через сутки после введения ЛПС как в фазу проэструса, так и в фазу диэструса, наблюдалось снижение уровня продукции ИФН-γ и содержания неоптерина (табл. 5.1.7). Однако, если после введения ЛПС в фазу проэструса уровень продукции ИЛ-2, ФНО-α и содержание TGF-β снижались, то развитие СВО в фазу диэструса сопровождалось повышением ИЛ-2, ИЛ-4 и концентрации TGF-β в сыворотке крови (табл. 5.1.7).

Заключение

Таким образом, через сутки после введения ЛПС в разные фазы эстрального цикла выраженность биохимических, иммунологических и морфологических проявлений СВО у самок крыс Вистар варьирует (табл. 5.1.8). Так у крыс, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, более выражены альтеративные изменения в печени, воспалительные – в легких, выше уровень активности АлАТ и АсАТ и эндотоксина в сыворотке крови. Содержание кортикостерона у крыс этой группы через сутки после введения ЛПС снижается, наблюдается выраженное «опустошение» белой пульпы селезенки, в тимусе – акцидентальная инволюция II стадии.

Введение ЛПС крысам в фазу проэструса вызывает развитие менее выраженных воспалительных изменений в печени и легких. В сыворотке крови у этих самок на фоне увеличения содержания кортикостерона показатели активности АлАТ и АсАТ, а также уровня эндотоксина не отличаются от контрольных значений. В органах иммунной системы реактивные изменения менее выражены по сравнению с группой крыс, которым ЛПС вводили в фазу диэструса.

Динамика изменений уровня продукции цитокинов клетками селезенки и содержание неоптерина и TGF-β в сыворотке крови у самок при введении ЛПС в разные фазы цикла отличалась, что, по-видимому, связано с фазой эстрального цикла.

Таблица 5.1.7

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС в фазу проэструса и диэструса (Me; 25%-75%)

Фаза эстрального цикла	Группа наблюдения	Сыворотка крови		Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл			
		Неоптерин, нмоль/л	TGF-β, пг/мл	ИЛ-2	ИЛ-4	ИФН-γ	ФНО-α
Проэструс	Контрольная (n=10)	5,94[1]* (5,93-6,14)	40,54[1] (33,78-42,65)	6677[1] (5318-7754)	200[1] (151-200)	889[1] (532-1147)	551,1[1] (472-633)
	ЛПС 1-е сут (n=7)	2,03[2] (1,88-2,74)	22,99[2] (13,04-25,74)	4352[2] (2594-5350)	165[2] (133-170)	0[2] (0-4,17)	166,3[2] (137-292)
Диэструс	Контрольная (n=8)	7,80[3] (7,30-9,09)	5,08[3] (4,23-7,05)	2184[3] (1599-2302)	63,21[3] (40,76-63,70)	99,45[3] (50,85-105,3)	214,7[3] (138 – 245,3)
	ЛПС 1-е сут (n=5)	2,36[4] (1,66-2,78)	14,99[4] (14,35-22,53)	2457[4] (2441-5285)	155[4] (131-173)	0[4] (0-41,73)	179[4] (145-199)
Статистическая значимость различий (p)		0,001[1-2] 0,004[3-4] 0,24[1-3] 0,8[2-4]	0,0004[1-2] 0,049[3-4] 0,001[1-3] 0,8[2-4]	0,004[1-2] 0,049[3-4] 0,001[1-3] 0,22[2-4]	0,28[1-2] 0,009[3-4] 0,001[1-3] 1,00[2-4]	0,0006[1-2] 0,0009[3-4] 0,0001[1-3] 0,51[2-4]	0,001[1-2] 0,17[3-4] 0,0099[1-3] 0,8[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таблица 5.1.8

Сравнение показателей*, характеризующих морфофункциональное состояние иммунной системы и уровень гормонов и эндотоксина у самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла через сутки после введения ЛПС

Параметры	Введение ЛПС в фазу проэструса	Введение ЛПС в фазу диэструса
Уровень гормонов и эндотоксина		
Эстрадиол	Снижается	Повышается
Прогестерон	Повышается	Повышается
Кортикостерон	Повышается	Снижается
Эндотоксин	Не изменяется	Повышается
АлАТи АсАТ	Не изменяется	Повышается
Морфофункциональное состояние органов-мишеней		
Показатель дистрофических и некротических изменений в печени	Повышается	Повышается
Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких	Повышается	Повышается
Морфофункциональное состояние тимуса		
Объемная доля коркового слоя	Повышается	Снижается
Ширина субкапсулярной зоны	Повышается	Повышается
Морфофункциональное состояние селезенки		
Объемная плотность белой пульпы	Снижается	Снижается
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков	Повышается	Повышается
Уровень продукции цитокинов		
ИЛ-2	Снижается	Повышается
ИЛ-4		Повышается
ИФН-γ	Снижается	Снижается
ФНО-α	Снижается	
TGF-β	Снижается	Повышается
Неоптерин	Снижается	Снижается

Условные обозначения: * - представлены статистически значимо различающиеся показатели

5.2 Обсуждение

По данным литературы, циклические изменения содержания половых гормонов в течение менструального/эстрального цикла у особей женского пола могут оказывать влияние на устойчивость и восприимчивость к инфекционно-воспалительным заболеваниям (Vishwanathan S.A. et al., 2011). В эксперименте показано, что показатели смертности от сепсиса ниже, а активация иммунных реакций на антигены выше у крыс в фазу проэструса, характеризующуюся высоким уровнем эстрогенов и низким - прогестерона, чем у животных в фазу диэструса, в которую наблюдается более низкий уровень эстрадиола и высокий – прогестерона (Angele M.K., et al., 2014). Более часто развитие воспалительного заболевания матки – пиометры у собак наблюдается в фазу диэструса (Sugiura K. et al., 2004). Инфицирование генитального тракта мышей вирусом герпеса 2 типа в фазу эструса сопровождается поляризацией иммунного ответа по Тх2-типу и снижением уровня продукции IgG антител, а в фазу диэструса, напротив, увеличивается содержание IgG на фоне снижения IgA (Gallichan W.S., Rosenthal K.L., 1996).

Нами показано, что через сутки после введения ЛПС в разные фазы эстрального цикла выраженность биохимических, иммунологических и морфологических проявлений СВО у самок крыс Вистар варьирует. На 1-е сут развития СВО у самок, которым вводили ЛПС как в фазу проэструса, так и в фазу диэструса, динамика изменения содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови была сходной: обнаружено снижение концентрации эстрадиола и повышение – прогестерона и общего тестостерона. Основной биосинтез женских половых стероидных гормонов осуществляется яичниками - в клетках теки фолликулов из холестерина образуется прогестерон, который превращается в андростендион и попадает в клетки гранулезной ткани, где в конечном итоге синтезируется эстрадиол (Magoffin D.A., 2005). В исследованиях *in vitro* показано, что ЛПС приводит к снижению синтеза эстрадиола клетками гранулезной ткани (Shimizu T. et al., 2012), что согласуется с нашими данными. Повышение содержания прогестерона в сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС в разные фазы цикла, может быть связано с ЛПС-индуцированным нарушением биосинтеза эстрадиола на стадии превращения прогестерона в андростендион. По данным литературы ЛПС также оказывает супрессивное действие на продукцию прогестерона клетками теки через 48 часов после добавления ЛПС в культуру клеток теки (Magata F. et al., 2014). Также показано, что в присутствии эстрадиола в культуре клеток яичников содержание прогестерона и андростендиона в ответ на добавление ЛПС в среду для культивирования не изменяется (Magata F. et al., 2014). В литературе отсутствуют данные об изменении концентрации тестостерона в сыворотке крови у самок при развитии СВО. Выявленное нами повышение содержания общего тестостерона как у самок, которым вводили ЛПС в фазу проэструса, так и в фазу диэструса, по-видимому, является компенсаторным и опосредовано нарушением синтеза эстрадиола яичниками.

Через сутки после введения ЛПС самкам в фазу проэструса в сыворотке крови было выявлено повышение концентрации кортикостерона, тогда как при развитии СВО в фазу диэструса, напротив, его содержание снижалось. По данным T.B. Kirsten и соавт. (2013) введение ЛПС беременным самкам крыс Вистар приводит к повышению концентрации кортикостерона в сыворотке крови, что было выявлено нами у половозрелых небеременных самок, которым вводили ЛПС в фазу проэструса. Однако в сыворотке крови у самок, которым моделировали СВО в фазу диэструса, концентрация кортикостерона снижалась, что может быть связано со снижением его изначально высокого уровня в контрольной группе.

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, была выявлена эндотоксинемия, тогда как у самок, у которых развития СВО моделировали в фазу проэструса, уровень эндотоксина не изменялся. На моделях экспериментального колита у мышей выявлено повышение проницаемости кишечного эпителия и последующее увеличение эндотоксина в сыворотке крови, что нивелируется при введении 17β-эстрадиола (Looijer-van Langen M. et al., 2011). Возможно, низкий уровень эстрогенов у крыс в фазу диэструса способствует повышению проницаемости эпителия для эндотоксина, что приводит к более выраженной эндотоксинемии.

Введение ЛПС самкам крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла, характеризующиеся различным уровнем половых стероидов в крови, приводит к развитию СВО разной степени тяжести. Так, по сравнению с фазой проэструса, введение ЛПС самкам в фазу диэструса, сопровождается более выраженными повреждениями органов-мишеней – печени и легких, о чем свидетельствуют высокое число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, более выраженные некротические и дистрофические изменения гепатоцитов, увеличение активности ферментов печени - АлАт и АсАТ, что, по-видимому, обусловлено более высоким содержанием эндотоксина в сыворотке крови в этой группе крыс. По данным литературы на модели острой постгеморрагической анемии, приводящей к повреждениям печени и легких, показано, что эстрогены инактивируют TLR4 и, тем самым, их сигнальный путь, снижая уровень продукции провоспалительных цитокинов в легких и печени (Frink M. et al., 2007). По-видимому, ингибирование эстрадиолом внутриклеточного каскада синтеза провоспалительных цитокинов в органах-мишенях приводит к менее выраженным воспалительным изменениям в печени и легких у крыс, которым вводили ЛПС в фазу проэструса на фоне более высокого уровня эстрадиола.

Полученные нами данные о более выраженных воспалительных и дистрофических изменениях в органах-мишенях у крыс Вистар, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, согласуются с данными литературы. По данным D. Jarrar и соавт. (2000) при воспалительных процессах, развивающихся в результате травм у самок в фазе проэструса, не выявлено изменений в минутном объеме сердечного выброса, скорости клиренса ICG (indocyanine green - клетками

печени), скорости изменения артериального давления, объеме циркулирующей крови, в то время как моделирование травмы у самок в фазе эструса приводило к снижению функциональной активности сердечно-сосудистой системы и печени.

В органах иммунной системы у самок крыс Вистар, которым вводили ЛПС в фазу диэстурса, через сутки наблюдались минимальные изменения ширины коркового вещества тимуса и выраженные изменения Т- и В-зон селезенки, характеризующиеся опустошением ПАЛМ-зоны, сужением лимфоидных узелков и расширением их герминативных центров. На 1-е сут после введения ЛПС самкам в фазу проэструса реактивные изменения в тимусе более выражены; наблюдается расширение коркового вещества и его субкапсулярной зоны, а также менее выраженное опустошение белой пульпы селезенки, затрагивающее только Т-зависимую ПАЛМ-зону, на фоне расширения герминативных центров лимфоидных узелков (В-зона). По данным литературы эстрогены активируют Т-клеточный ответ с преимущественной его поляризацией по Тх1-типу (Karpuzoglu E. et al., 2007), что характеризуется повышением активности Т-клеточной пролиферации и, соответственно, числа $CD4^+$ лимфоцитов, как в тимусе, так и в периферической крови. В селезенке у крыс, которым моделировали СВО в фазу диэструса, наблюдалась активация преимущественно В-зоны, представленной лимфоидными узелками, по сравнению с самками в фазу проэструса, характеризующимися расширением только Т-зависимой зоны селезенки. По-видимому, это связано с иммунорегуляторными свойствами прогестерона, уровень которого повышается в фазу диэструса. Показано, что высокое содержание прогестерона в сыворотке крови коррелирует с активацией В-клеточного иммунного ответа и увеличением продукции IgG (Gallichan W.S., Rosenthal K.L., 1996).

Через сутки после введения ЛПС как в фазу проэструса, так и диэструса, наблюдалось снижение уровня продукции ИФН-γ и содержания неоптерина. По данным литературы высокая концентрация неоптерина в сыворотке крови у больных сепсисом является одним из маркеров неблагоприятного прогноза (Ploder M. et al., 2010). Продукция неоптерина моноцитами периферической крови активируется ИФН-γ (Weiss G. et al., 1999), содержание которого в культуре клеток селезенки снижалось на 1-е сут развития СВО.

После введения ЛПС в фазу проэструса уровень продукции ИЛ-2, ФНО-α и содержание TGF-β снижались, тогда как развитие СВО в фазу диэструса сопровождалось повышением ИЛ-2, ИЛ-4 и концентрации TGF-β в сыворотке крови. Одной из функций TGF-β является подавление пролиферации, дифференцировки и миграции Т- и В-лимфоцитов (Chaudhry H. et al., 2013). Возможно менее выраженная реакция иммунной системы у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, связана с повышением концентрации TGF-β в крови. Снижение продукции провоспалительного цитокина ФНО-α у самок, которым вводили ЛПС в фазу проэструса, по-видимому, является одним из факторов, определяющим менее выраженные патологические и

воспалительные изменения в органах-мишенях, чем у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса.

Таким образом, введение ЛПС самкам крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла, характеризующиеся различным уровнем половых стероидов в крови, приводит к развитию СВО разной тяжести. Так, по сравнению с фазой проэструса, введение ЛПС самкам в фазу диэструса, характеризуется более выраженными повреждениями органов-мишеней – печени и легких, что, по-видимому, обусловлено более высоким содержанием эндотоксина в сыворотке крови в этой группе крыс. В органах иммунной системы у самок крыс Вистар, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, наблюдались минимальные изменения ширины коркового вещества в тимусе и выраженные изменения Т- и В-зоны селезенки, характеризующиеся опустошением ПАЛМ-зоны, сужением лимфоидных узелков и расширением их герминативных центров. В сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, наблюдалось снижение концентрации неоптерина и повышение – TGF-β, а в культуральной жидкости клеток селезенки было выявлено снижение продукции ИФН-γ и повышение – ИЛ-2, ИЛ-4.

Развитие СВО в фазу проэструса приводит к менее выраженным воспалительным изменениям в печени и легких, что, может быть связано с низким уровнем эндотоксина, не отличающимся от значений в контрольной группе. На 1-е сут после введения ЛПС в этой группе крыс наблюдается стереотипная реакция в тимусе – расширение коркового вещества и его субкапсулярной зоны, а также менее выраженное опустошение белой пульпы селезенки, затрагивающей только Т-зависимую ПАЛМ-зону, на фоне расширения герминативных центров лимфоидных узелков (В-зона). В сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС в фазу проэструса, выявлено снижение концентрации неоптерина и TGF-β, а также супрессия продукции клетками селезенки ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α.

5.3 Половые различия морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар

С целью моделирования СВО половозрелым крысам Вистар обоего пола внутрибрюшинно вводили ЛПС *E.coli* (O26:B6) в дозе 1,5 мг/кг, которая вызывает у половозрелых животных патологические изменения внутренних органов (Косырева А.М. и соавт., 2012). Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Выбор сроков забоя обосновывался тем, что через сутки после введения ЛПС у животных развиваются наиболее выраженные иммунологические нарушения и патологические изменения в печени и легких, характерные для СВО. На 7-е сут морфологические проявления острого воспалительного процесса во внутренних органах прогрессируют или подвергаются обратному развитию (Диатроптов М.Е. и соавт., 2011). В связи с тем, что морфофункциональное состояние иммунной

системы и как показано нами выраженность СВО у крыс коррелирует с фазой эстрального цикла, для исследования половых различий проявлений СВО были отобраны самки в фазу проэструса. Самкам вводили ЛПС в фазу проэструса, которая характеризуется высоким содержанием эстрадиола и низким – прогестерона в сыворотке крови.

5.3.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самок крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самок крыс Вистар наблюдалось увеличение содержания в сыворотке крови прогестерона и общего тестостерона, тогда как концентрация эстрадиола статистически значимо снижалась по сравнению с контрольной группой. На 7-е сут эксперимента содержание прогестерона и общего тестостерона снижалось и достигало контрольных значений. Показатели концентрации эстрадиола в сыворотке крови в эти сроки статистически значимо не отличались от значений контрольной группы и у животных на 1-е сут развития СВО (табл. 5.3.1.1).

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось снижение содержания эстрадиола и повышение прогестерона и тестостерона в сыворотке крови, что может быть связано с нарушением их синтеза и метаболизма вследствие реализации механизмов повреждения эндотоксина, в первую очередь, на клетки надпочечников и печени. На 7-е сут эксперимента концентрация половых стероидных гормонов нормализовалось.

Таблица 5.3.1.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=7)	134,5 (108,6-170,4)^{1*}	9,50 (7,42-14,06)^{1}	0,23 (0,19-0,30)^{1}
ЛПС 1-е сут (n=6)	84,06 (80,22-91,15)^{2}	45 (40,5-48)^{2}	1,34 (0,56-1,62)^{2}
ЛПС 7-е сут (n=7)	78,75 (76,97-140,1)^{3}	18,94 (10,77-40,65)^{3}	0,10 (0,06-0,12)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	$0{,}0105^{1\text{-}2}$ $0{,}2733^{1\text{-}3}$ $0{,}8064^{2\text{-}3}$	$0{,}0082^{1\text{-}2}$ $0{,}0410^{1\text{-}3}$ $0{,}0759^{2\text{-}3}$	$0{,}0006^{1\text{-}2}$ $0{,}0092^{1\text{-}3}$ $0{,}0005^{2\text{-}3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения легких у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При микроскопическом исследовании легких у самок крыс Вистар контрольной группы в просветах бронхов выявлялись единичные десквамированные эпителиальные клетки. Слизистая

оболочка бронхов была представлена кубическим реснитчатым эпителием, который располагался в 1-2 ряда. Просветы альвеол и альвеолярных ходов широкие, межальвеолярные перегородки тонкие, при увеличении 400 в них выявлялись единичные нейтрофилы (рис. 5.3.1.1А, Б).

На 1-е сут развития СВО в легких у самок в просветах бронхов определялись зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. Эпителий бронхов был очагово десквамирован. Межальвеолярные перегородки очагово утолщены, в них большое количество нейтрофилов (5-10 в поле зрения при ув. 400). Периваскулярные лимфатические щели некоторых легочных вен расширены. У 3 из 7 животных выявлялся интраальвеолярный отек: небольшая часть просветов альвеол и альвеолярных ходов была заполнена гомогенными эозинофильными массами с эритроцитами и единичными лейкоцитами (рис. 5.3.1.1В, Г). Таким образом, в легких крыс на 1-е сут после введения ЛПС развивалась воспалительная реакция, которая характеризовалась увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, у части животных она сочеталась с отеком.

При морфологическом исследовании легких на 7-е сут после введения ЛПС просветы некоторых бронхов были частично заполнены эозинофильным секретом, в котором выявлялся десквамированный эпителий. Межальвеолярные перегородки диффузно-очагово утолщены, в них умеренное число нейтрофилов. Небольшие зоны интраальвеолярного отека. Периваскулярные лимфатические щели были расширены (рис. 5.3.1.1Д, Е).

По данным морфометрического исследования на 1-е сут после введения ЛПС количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было достоверно выше по сравнению со значениями контрольной группой (табл. 5.3.1.2). На 7-е сут после введения ЛПС количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самок достоверно снижалось, однако исследуемые показатели оставались статистически значимо выше значений контрольной группы (табл. 5.3.1.2).

Таблица 5.3.1.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

(Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	**Число нейтрофилов на площади 25 тыс. мкм^2**
Контрольная (n=10)	1,64 (1,43-1,86)^{1*}
ЛПС 1-е сут (n=7)	5,71 (4,71-7,57)^{2}
ЛПС 7-е сут (n=6)	2,71 (2,29-4,00)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	0,00001$^{1-2}$ 0,00001$^{1-3}$ 0,0088$^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самок в легких наблюдался интраальвеолярный отек и увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса в них после введения ЛПС. На 7-е сут интраальвеолярный отек был менее выражен, однако число нейтрофилов оставалось более высоким, чем в контрольной группе, т.е. воспалительный процесс у самок крыс Вистар в эти сроки сохранялся.

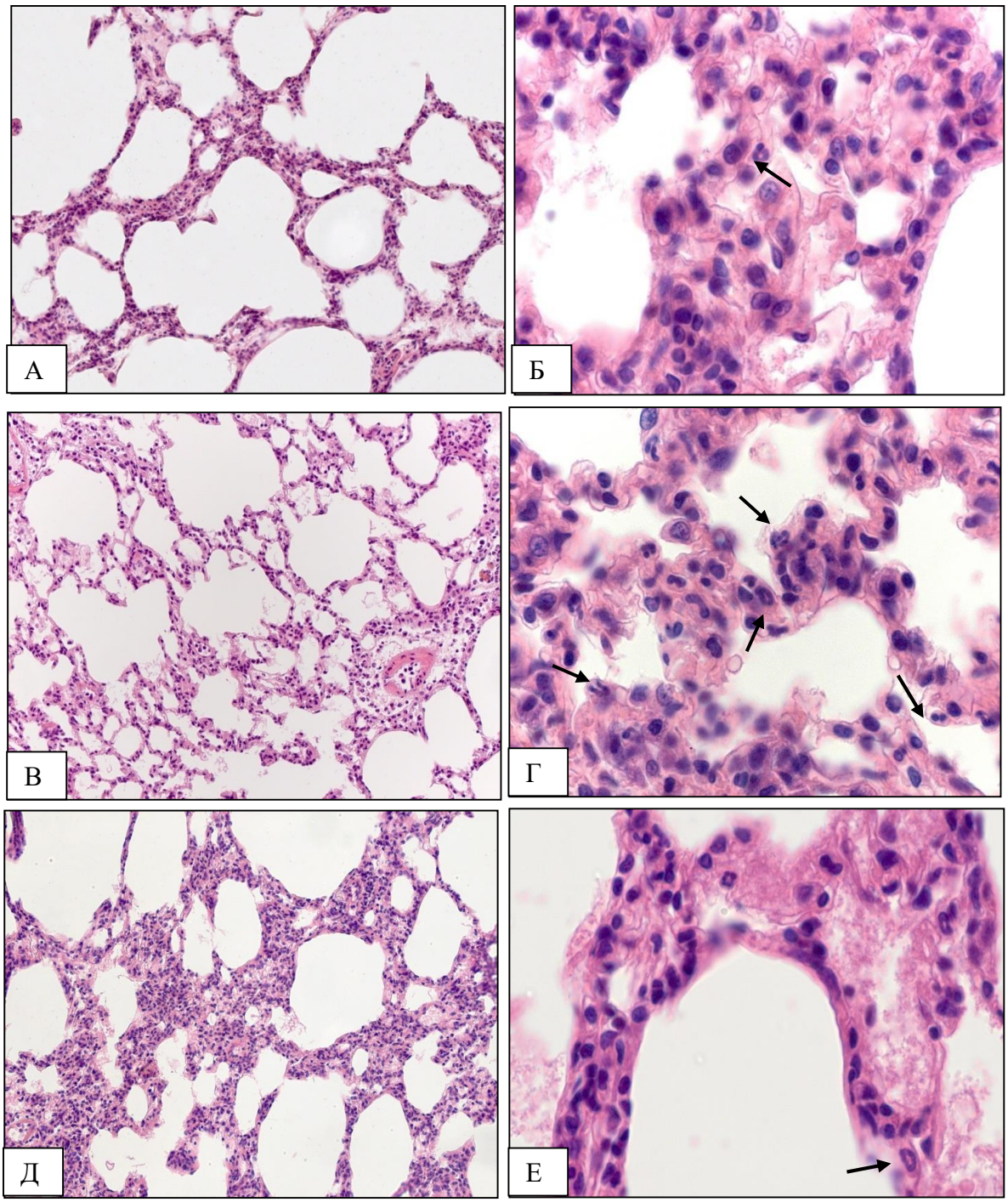


Рис. 5.3.1.1. Морфологическая характеристика легких у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные; Б – в межальвеолярных перегородках единичные нейтрофилы. *1-е сут после введения ЛПС*: В - зоны интраальвеолярного отека, просветы альвеол и альвеолярных ходов заполнены эритроцитами и эозинофильными массами; Г - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – единичные альвеолы и альвеолярные ходы заполнены гомогенными эозинофильными массами, очагово утолщенные межальвеолярные перегородки; Е – нейтрофилы в межальвеолярных перегородках, интраальвеолярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 200; Б, Г, Е 1000

Морфологические изменения печени у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании печени у самок контрольной группы балочное и дольковое строение было сохранено. По ходу балок выявлялись диффузно рассеянные неэпителиальные клеточные элементы, а в соединительной ткани по ходу триад определялись единичные лимфоциты и гистиоциты. Цитоплазма гепатоцитов с мелкой базофильной зернистостью, дистрофических изменений не выявлено (рис. 5.3.1.2А, Б). Стенки центральных вен тонкие, выстилающий их эндотелий плоский.

На 1-е сутки после введения ЛПС у самок в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов - выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов. У 1 крысы из 7 определялись очаги некрозов. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы (ув. 640). По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, в просвете отдельных из них определялись зернистые скопления, стазы и сладжи (рис. 5.3.1.2 В, Г).

На 7-е сутки наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры печени, выраженность дистрофических изменений снижалась (рис. 5.3.1.2 Д, Е). Вакуольная и гиалиново-капельная дистрофия была слабо выражена. Гепатоциты с дистрофическими изменениями локализовались преимущественно в периферических отделах долек.

По данным полуколичественной оценки наибольшая выраженность дистрофических и некротических изменений в печени была выявлена на 1-е сут после введения ЛПС. На 7-е сут после введения ЛПС у самок в печени показатель выраженности альтеративных изменений в печени не отличался от такового в контрольной группе (табл. 5.3.1.3).

Таким образом, в печени у самок на 1-е сут развития СВО выявляются выраженные дистрофические изменения. На 7-е сут после введения ЛПС их выраженность снижается, наблюдается нормализация морфологической структуры органа.

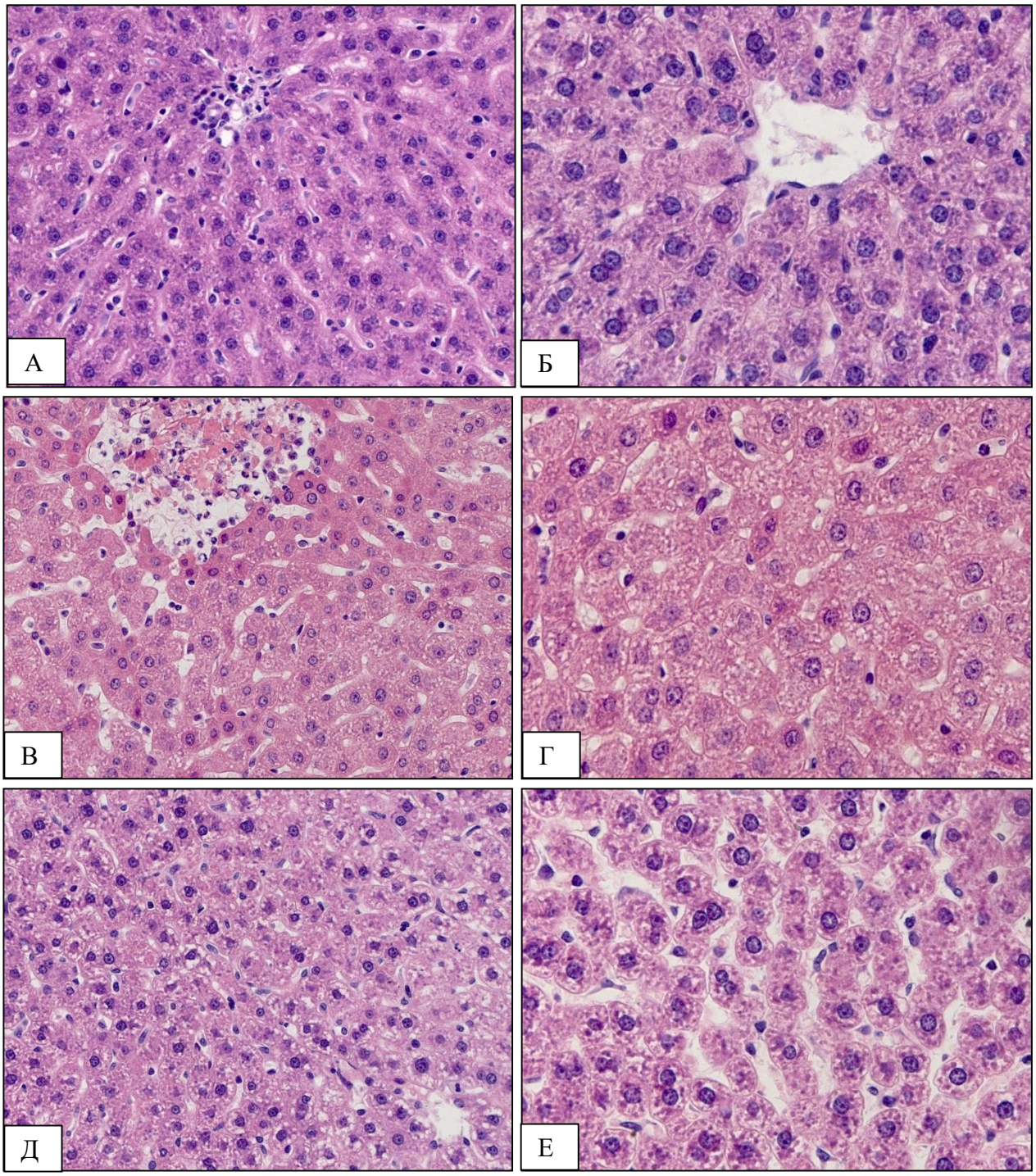


Рис. 5.3.1.2. Морфологическая характеристика печени у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – балочное строение печени сохранено, дистрофических изменений нет; Б – в цитоплазме гепатоцитов мелкая базофильная зернистость. *1-е сут после введения ЛПС*: В – небольшой очаг некроза, мелкокапельная дистрофия гепатоцитов; Г – гепатоциты с умеренной дистрофией. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – распространенная мелкоокапельная дистрофия гепатоцитов; Е – дистрофические изменения гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 400; Б, Г, Е 640

Таблица 5.3.1.3

Показатель выраженности альтеративных изменений в печени у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений (баллы)
Контрольная (n=10)	1,50 (1,00-2,50)[1*]
ЛПС 1-е сут (n=11)	3,00 (2,00-3,00)[2]
ЛПС 7-е сут (n=7)	2,00 (1,00-2,50)[3]
Статистическая значимость различий (p)	0,0032[1-2] 0,2757[1-3] 0,0376[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самок показатели уровня активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови были ниже, чем в контрольной группе. На 7-е сут развития СВО уровень активности АлАТ и АсАТ нормализовался и не отличался от контрольных значений (табл. 5.3.1.4).

Как на 1-е, так и на 7-е сут после введения ЛПС уровень эндотоксина в сыворотке крови у самок не отличался от значений контрольной группы (табл. 5.3.1.4).

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самок наблюдалось увеличение концентрации кортикостерона (табл. 5.3.1.4). На 7-е сут после введения ЛПС содержание кортикостерона у самок нормализовалось (табл. 5.3.1.4).

Таблица 5.3.1.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=10)	57 (54-92)[1*]	143 (142-180)[1]	3,14 (2,85-3,19)[1]	64,47 (54,6-74,4)[1]
ЛПС 1-е сут (n=11)	20 (16-31)[2]	39 (39-68)[2]	3,48 (3,06-5,33)[2]	109,8 (107,3-140,3)[2]
ЛПС 7-е сут (n=7)	47 (43-51)[3]	146 (136-151)[3]	2,33 (1,69-3,36)[3]	71,22 (65,88-76,86)[3]
Статистическая значимость различий (p)	0,0201[1-2] 0,1011[1-3] 0,0062[2-3]	0,0201[1-2] 0,8815[1-3] 0,0062[2-3]	0,3408[1-2] 0,1090[1-3] 0,0357[2-3]	0,0455[1-2] 0,3613[1-3] 0,0918[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самок наблюдаются снижение активности ферментов печени, повышение содержания кортикостерона на фоне стабильного уровня эндотоксина. На 7-е сут после введения ЛПС активность АлАТ и АсАТ, концентрация

кортикостерона нормализовались, а уровень эндотоксина не отличался от значений в контрольной группе.

Морфологические изменения тимуса и содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании у половозрелых самок контрольной группы в тимусе соотношение между корковым и мозговым веществом составляло примерно 1:1 (рис. 5.3.1.3А). Корковое вещество было представлено равномерно распределенными лимфоидными и эпителиальными ретикулярными клетками. Границы между корковым и мозговым веществом были четкие (рис. 5.3.1.3А). Субкапсулярная зона у самок была представлена 5-8 рядами лимфобластов. Среди лимфобластов субкапсулярной зоны выявлялись единичные в поле зрения при ув. 400 митозы. В мозговом веществе обнаруживались тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 эпителиальных клеток.

Через сутки после введения ЛПС у самок в тимусе выявлялись признаки акцидентальной инволюции I–II стадии. В корковом веществе обнаруживалась картина «звездного неба», фрагменты ядер погибших клеток и фагоцитирующие их макрофаги (рис. 5.3.1.3В, Г). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими. Наблюдалось расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны, которая была представлена 8–10 рядами лимфобластов (табл. 5.3.1.5). В мозговом веществе обнаруживались тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 концентрически расположенных эпителиальных клеток с накоплением кератогиалина в центре, а также единичные в препарате кистоподобные полости.

На 7-е сут развития СВО наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры органа (рис. 5.3.1.3Д, Е). При морфологическом исследовании в эти сроки у самок обнаруживалось увеличение объемной плотности коркового вещества. В этот срок эксперимента показатель объемной доли коркового вещества была статистически значимо выше такового в контрольной группе (табл. 5.3.1.5). На 7-е сут после введения ЛПС у самок ширина субкапсулярной зоны не отличалась от показателя опытной группы на 1-е сут после введения ЛПС.

Таблица 5.3.1.5

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина субкапсулярной зоны, мкм
	КВ	МВ		
Контрольная (n=11)	$49,64\pm0,97^{1*}$	$50,36\pm0,97^{1}$	$0,99\pm0,05^{1}$	$34,55\pm0,59^{1}$
ЛПС 1-е сут (n=15)	$57,03\pm1,37^{2}$	$42,97\pm1,37^{2}$	$1,42\pm0,08^{2}$	$44,99\pm1,60^{2}$
ЛПС 7-е сут (n=10)	$62,14\pm0,66^{3}$	$37,59\pm0,94^{3}$	$1,70\pm0,06^{3}$	$43,26\pm1,17^{3}$
Статистическая значимость различий (p)	$0,0043^{1-2}$ $0,0009^{1-3}$ $0,0101^{2-3}$	$0,0043^{1-2}$ $0,0009^{1-3}$ $0,0101^{2-3}$	$0,0032^{1-2}$ $0,0009^{1-3}$ $0,0223^{2-3}$	$0,0045^{1-2}$ $0,0045^{1-3}$ $0,4062^{2-3}$

Примечания. КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе повышалось по сравнению с контрольной группой, тогда как показатель апоптотической гибели $CD3^{+}$-лимфоцитов статистически значимо не изменялся (табл. 5.3.1.6).

Таблица 5.3.1.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^{+}$-лимфоцитов у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^{-}$)	$CD3^{+}$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	1,3 (1,1-1,3)	11,9 (9,4-15,2)
ЛПС 1-е сут (n=6)	4,2 (3,1-6,0)	7,6 (5,8-9,0)
ЛПС 7-е сут (n=6)	-	-
Статистическая значимость различий (p)	0,01	0,055

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самок крыс Вистар в тимусе выявлена акцидентальная инволюция I-II стадий, которая сопровождалась повышением апопотической гибели тимоцитов. На 7-е сут после введения ЛПС расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны свидетельствовало об акцидентальной инволюции I стадии.

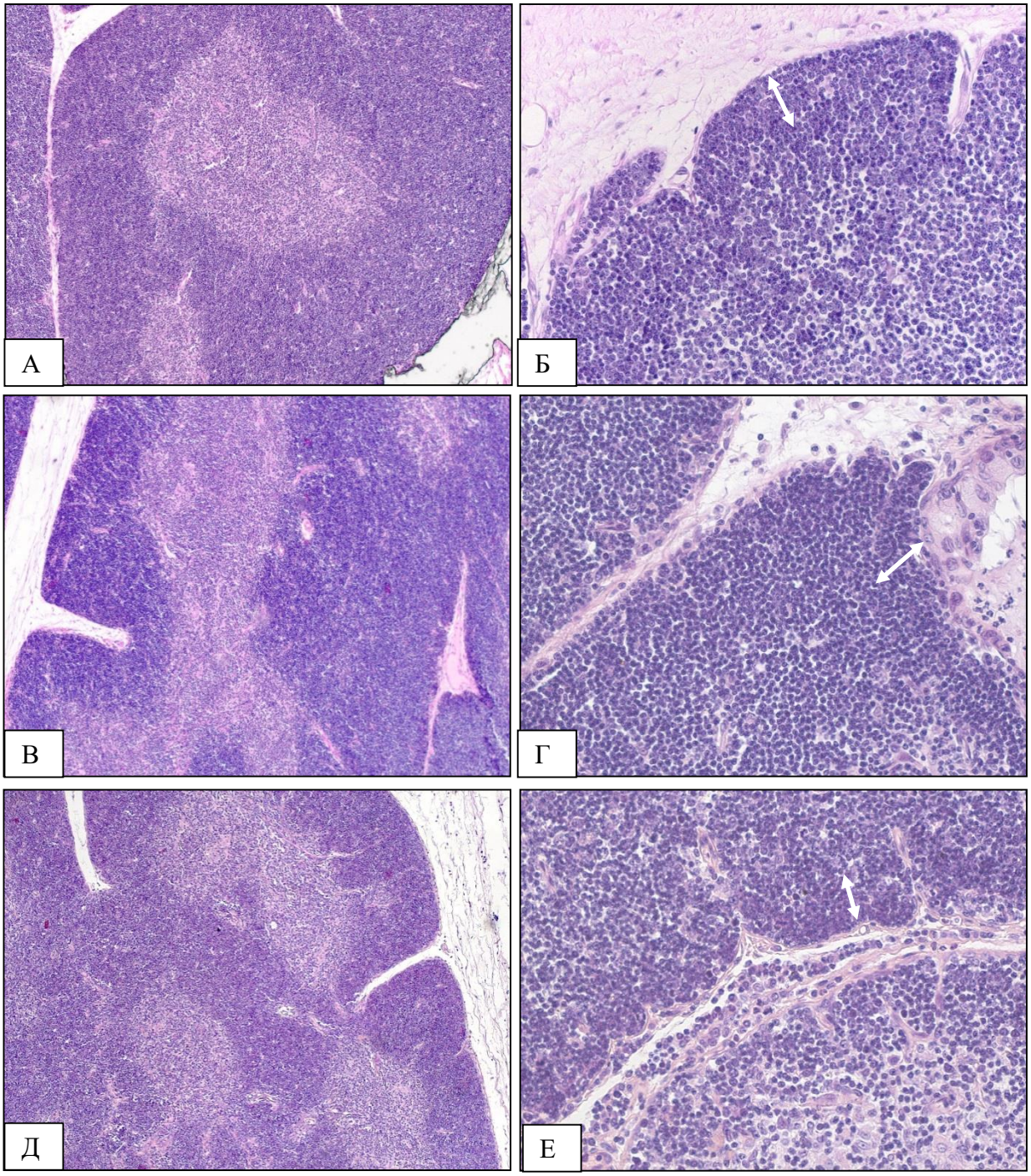


Рис. 5.3.1.3. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – границы между корковым и мозговым веществом четкие, соотношение между корковым и мозговым веществом примерно 1:1; Б – субкапсулярная зона широкая, состоит из 8 рядов лимфобластов. *1-е сут после введения ЛПС*: В – границы между корковым и мозговым веществом четкие, корковое вещество преобладает над мозговым; Г – субкапсулярная зона широкая, состоит из 10 рядов лимфобластов. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие; Е – широкая субкапсулярная зона, состоит из 5-8 рядов лимфобластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 400

Морфологические изменения селезенки у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании в селезенке у половозрелых самок белая пульпа была представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с узкими герминативными центрами (рис. 5.3.1.4А, Б). В герминативных центрах среди лимфобластов выявлялись многочисленные митотически делящиеся клетки. По периферии лимфоидных узелков была хорошо выражена маргинальная зона. В красной пульпе селезенки обнаруживались равномерно распределенные зрелые и незрелые клетки крови и макрофаги.

На 1-е сут развития СВО в селезенке у самок наблюдалось «опустошение» белой пульпы, представленной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками (рис. 5.3.1.4В, Г). В лимфоидных узелках выявлялись крупные герминативные центры, представленные митотически делящимися клетками, фрагментами ядер погибших лимфоцитов (рис. 5.3.1.4Г). Маргинальные зоны лимфоидных узелков были уже по сравнению с контрольной группой. По данным морфометрической оценки функциональных зон селезенки на 1-е сут после введения ЛПС у самок половозрелых крыс Вистар обнаруживалось уменьшение объемной доли белой пульпы за счет снижения ПАЛМ-зоны (табл. 5.3.1.7). Показатель объемной доли герминативных центров лимфоидных узелков селезенки у самок в эти сроки повышался, а маргинальной зоны – снижался.

На 7-е сут после введения ЛПС наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры органа. В эти сроки в селезенке у самок обнаруживалось расширение зоны белой пульпы и сужение герминативных центров лимфоидных узелков (рис. 5.3.1.4Д, Е). По сравнению с 1-ми сут развития СВО показатель объемной доли маргинальной зоны в эти сроки возрастал (табл. 5.3.1.6).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самок крыс Вистар в селезенки наблюдалось «опустошение» белой пульпы за счет снижения объемной доли Т-зависимой ПАЛМ-зоны. На 7-е сут после введения ЛПС в селезенке у половозрелых самок восстанавливалась нормальная морфологическая структура: площадь белой пульпы селезенки нормализовалась, герминативные центры суживались, а маргинальные зоны лимфоидных узелков расширялись.

Таблица 5.3.1.7

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения	Объемная доля функциональных зон селезенки, %			Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	Объемная доля функциональных зон ЛУз селезенки, %	
	ПАЛМ-зона	ЛУз	БП		МЗ	ГЦ
Контрольная (n=10)	$28,24±0,69^{1*}$	$15,45±0,43^{1}$	$43,69±0,81^{1}$	$0,75±0,03^{1}$	$44,86±1,02^{1}$	$22,40±0,84^{1}$
ЛПС 1-е сут (n=15)	$20,94±1,71^{2}$	$14,74±1,51^{2}$	$35,71±3,12^{2}$	$0,61±0,09^{2}$	$31,91±2,78^{2}$	$46,02±6,27^{2}$
ЛПС 7-е сут (n=9)	$30,13±0,28^{3}$	$18,83±0,36^{3}$	$48,95±0,45^{3}$	$0,98±0,01^{3}$	$42,70±0,59^{3}$	$16,70±0,61^{3}$
Статистическая значимость различий (p)	$0,0078^{1-2}$ $0,8^{1-3}$ $0,0002^{2-3}$	$0,7^{1-2}$ $0,0491^{1-3}$ $0,035^{2-3}$	$0,2243^{1-2}$ $0,0001^{1-3}$ $0,0003^{2-3}$	$0,3545^{1-2}$ $0,0001^{1-3}$ $0,0003^{2-3}$	$0,0026^{1-2}$ $0,0528^{1-3}$ $0,0004^{2-3}$	$0,0206^{1-2}$ $0,0003^{1-3}$ $0,0017^{2-3}$

Примечания. ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

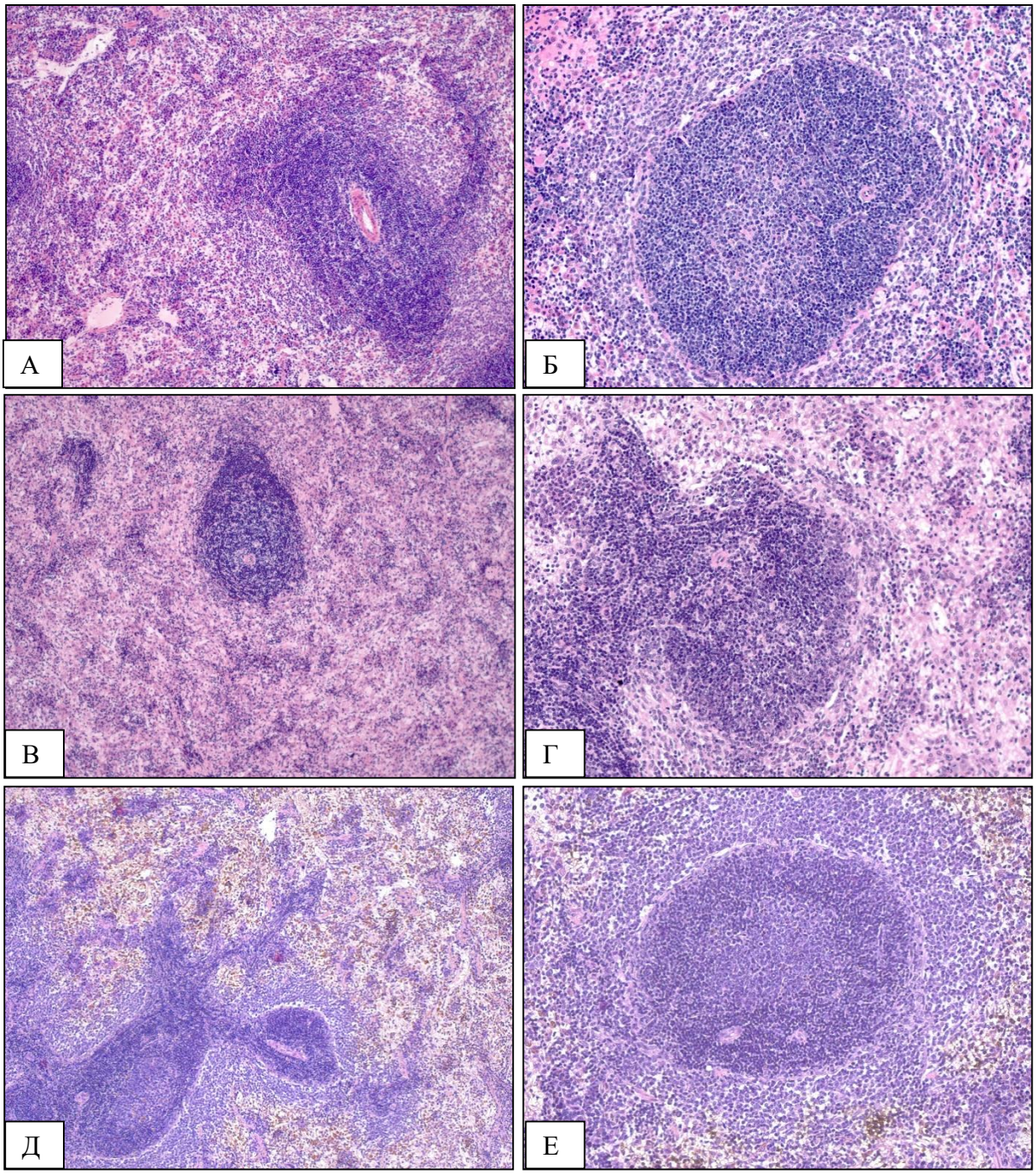


Рис. 5.3.1.4. Морфологическая характеристика селезенки у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – белая пульпа представлена узкой ПАЛМ-зоной, небольшой лимфоидный узелок без светлого центра; Б – лимфоидный узелок с крупным светлым центром и маргинальной зоной. *1-е сут после введения ЛПС*: В – ПАЛМ-зона не выражена; Г – лимфоидный узелок с небольшим светлым центром и узкой маргинальной зоной. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – ПАЛМ-зона выражена, широкий лимфоидный узелок с крупным светлым центром; Е – лимфоидный узелок с крупным светлым центром и широкой маргинальной зоной. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 200

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО у самок содержание в сыворотке крови противовоспалительного TGF-β и маркера активации клеточного типа иммунного ответа – неоптерина было ниже значений контрольной группы (табл. 5.3.1.8).

На 1-е сут после введения ЛПС у половозрелых самок крыс Вистар наблюдалось снижение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-6, ФНО-α и ИФН-γ клетками селезенки (табл. 5.3.1.8). Показатель секреции и продукции ИЛ-4 статистически значимо не изменялся по сравнению с контрольной группой.

На 7-е сут после введения ЛПС содержание неоптерина в сыворотке крови у самок было статистически значимо ниже значений контрольной группы. В эти сроки продукция ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12 клетками селезенки не отличалась от значений в контрольной группе. Показатели содержания ИЛ-6 в культуральной жидкости нормализовались (табл. 5.3.1.8). В эти сроки развития СВО у половозрелых самок уровень продукции ИФН-γ и ФНО-α клетками селезенки не отличался от 1-х сут развития СВО и оставался на низком уровне (табл. 5.3.1.8).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самок наблюдается супрессия продукции ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-6, ФНО-α и ИФН-γ. На 7-е сут после введения ЛПС уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12 и ИЛ-6 не отличался от значений в контрольной группе, а показатели ФНО-α и ИФН-γ оставались сниженными.

Таблица 5.3.1.8

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, и концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Биологическая среда	Цитокины	Контрольная (n=8)	ЛПС 1-е сут (n=8)	ЛПС 7-е сут (n=7)	Статистическая значимость различий (p)
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	ИЛ-2	144,45[1*] (89,4-152,9)	47,26[2] (27,57-97,27)	74,83[3] (31,5-102,4)	0,0881[1-2] 0,1441[1-3] 0,6242[2-3]
	ИЛ-4	15,50[1] (11,9-28,6)	9,07[2] (6,11-25,12)	8,74[3] (3,44-9,78)	0,2864[1-2] 0,0152[1-3] 0,8501[2-3]
	ИЛ-6	7500[1] (5500-8100)	2758[2] (2239-3445)	7450[3] (7250-8950)	0,0275[1-2] 0,6847[1-3] 0,0140[2-3]
	ИЛ-12	62,60[1] (16,5-93,2)	0,00[2] (0-5,50)	0,00[3] (0-36,0)	0,0298[1-2] 0,0409[1-3] 0,7768[2-3]
	ИФН-γ	894[1] (532-1134)	8,95[2] (0-51,9)	26,80[3] (8,94-35,8)	0,0015[1-2] 0,0057[1-3] 0,4497[2-3]
	ФНО-α	314,4[1] (145,6-452,3)	79,28[2] (75,13-92,28)	18,40[3] (0-47,53)	0,0167[1-2] 0,0229[1-3] 0,0167[2-3]
Сыворотка крови	TGF-β (нг/мл)	40,54[1] (33,78-42,65)	22,99[2] (13,04-25,74)	-	0,0005[1-2]
	Неоптерин (нмоль/л)	6,04[1] (5,71-7,41)	3,10[2] (1,66-3,34)	2,56[3] (1,98-3,26)	0,0143[1-2] 0,0007[1-3] 0,6831[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО у половозрелых самок крыс Вистар в периферической крови наблюдалось повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение – Т-цитотоксических лимфоцитов. Относительное число Т-хелперов в периферической крови в эти сроки повышалось, тогда как абсолютное содержание $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов статистически значимо не изменялось (табл. 5.3.1.9).

Таблица 5.3.1.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25%-75%)

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляция	Относительное число, %		Абсолютное число, млн/мл	
	Контрольная (n=10)	**ЛПС (n=9)**	**Контрольная (n=10)**	**ЛПС (n=9)**
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$47,8^{1*}$ (42,3-56,4)	$42,5^{2}$ (29,7-47,5)	$4,9^{1}$ (3,4-7,4)	$3,5^{2}$ (2,9-4,7)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$47,1^{3}$ (29,0-54,9)	**$56,2^{4}$** (47,9-59,1)	$1,8^{3}$ (1,6-2,7)	$1,7^{4}$ (1,5-2,5)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$52,0^{5}$ (44,0-70,8)	**$40,8^{6}$** (38,5-51,3)	$2,4^{5}$ (1,5-5,6)	**$1,7^{6}$** (1,1-1,9)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$15,3^{7}$ (12,5-19,3)	$16,8^{8}$ (12,5-23,3)	$1,6^{7}$ (1,1-2,1)	$1,4^{8}$ (1,2-3,1)
NK-клетки ($CD314^+$)	$4,9^{9}$ (3,0-6,1)	**$22,4^{10}$** (18,9-27,5)	$0,5^{9}$ (0,2-0,9)	**$2,0^{10}$** (1,6-2,9)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$7,8^{11}$ (5,0-11,2)	$6,4^{12}$ (6,0-9,4)	$0,01^{11}$ (0,006-0,018)	$0,01^{12}$ (0,006-0,02)
Регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$3,8^{13}$ (3,4-4,6)	$4,2^{14}$ (2,3-4,3)	$0,006^{13}$ (0,004-0,008)	$0,006^{14}$ (0,003-0,009)
Статистически значимые различия, значения	$0,074^{1-2}$ $0,036^{3-4}$ $0,025^{5-6}$ $0,595^{7-8}$	$0,0002^{9-10}$ $0,79^{11-12}$ $0,51^{13-14}$	$0,21^{1-2}$ $0,67^{3-4}$ $0,02^{5-6}$ $0,93^{7-8}$	$0,001^{9-10}$ $0,67^{11-12}$ $0,79^{13-14}$

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у половозрелых самок крыс Вистар наблюдалась активация врожденного иммунитета, что сопровождалось повышением числа NK-клеток. Количество Т-цитотоксических лимфоцитов в этот срок статистически значимо снижалось.

Заключение

Таким образом, введение самкам крыс Вистар в фазу проэструса ЛПС в дозе 1,5 мг/кг не приводило к изменению уровня эндотоксина в сыворотке крови как на 1-е, так и на 7-е сут развития СВО. В ранние сроки после введения ЛПС наблюдалось повышение содержания кортикостерона, прогестерона и общего тестостерона в сыворотке крови, концентрация которых нормализовалась к 7-м сут эксперимента. Тогда как содержание эстрадиола, напротив, снижалось на 1-е сут после введения ЛПС, и нормализовалось к 7-м сут.

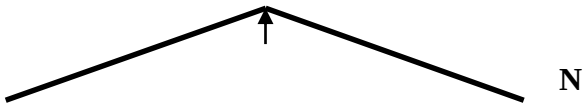
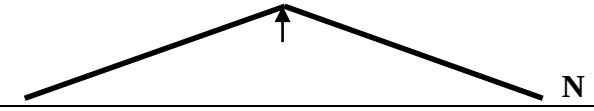
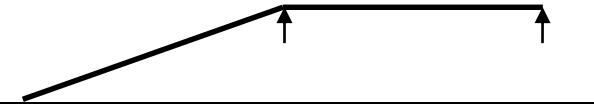
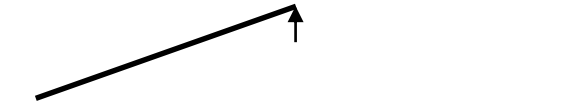
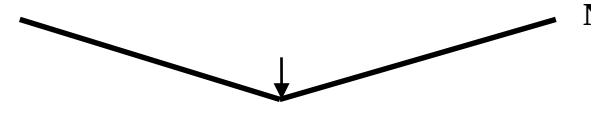
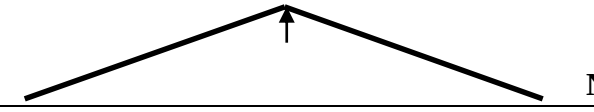
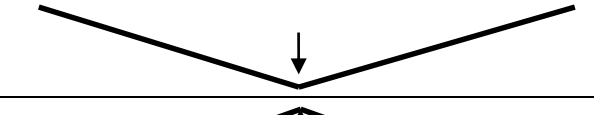
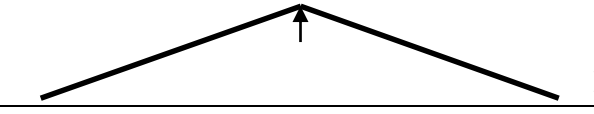
На 1-е сут развития СВО в легких у самок крыс Вистар развивался интраальвеолярный отек и воспалительная реакция, которая характеризовалась увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. В печени у самок в эти сроки эксперимента выявлялись выраженные дистрофические изменения гепатоцитов на фоне снижения уровня активности ферментов печени – АлАТ и АсАТ в сыворотке крови. К 7-м сут после введения ЛПС выраженность воспалительных изменений в легких и альтеративных в печени снижались, а уровень активности ферментов печени нормализовался.

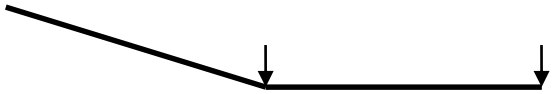
В ранние сроки развития СВО в тимусе у самок развивается акцидентальная инволюция I стадии, которая характеризуется повышением объемной доли коркового вещества, расширением его субкапсулярной зоны и увеличением числа апоптотически гибнущих тимоцитов. В эти сроки в селезенке снижается объемная доля ПАЛМ-зоны и маргинальной зоны лимфоидных узелков, а размеры герминативных центров – увеличиваются, что свидетельствует об активации процессов миграции и пролиферации лимфоцитов. На 7-е сут эксперимента в тимусе морфологические изменения, характерные для ранних сроков развития СВО, сохраняются, а в селезенке наблюдается нормализация структуры органа.

На 1-е сут после введения ЛПС в периферической крови выявлено снижение количества цитотоксических Т-лимфоцитов и повышение числа NK-клеток. В эти сроки уровень продукции ИЛ-12, ИЛ-6 клетками селезенки и содержание TGF-β сыворотке крови снижается, а показатель продукции ФНО-α повышается. На 7-е сут развития СВО уровень продукции ИЛ-12 и содержание неоптерина в сыворотке крови остаются низкими на фоне нормализации уровня продукции ФНО-α и ИЛ-6. Выявленные изменения являются реактивными в ответ на антигенное воздействие ЛПС.

Таблица 5.3.1.10

Схема динамики изменений содержания стероидных гормонов, показателей выраженности СВО у самок крыс Вистар после введения ЛПС. Приведены статистически значимые данные по сравнению с контрольной группой

Параметры	Контрольная группа 1-е сут ЛПС 7-е сут ЛПС
Уровень стероидных половых гормонов и эндотоксина	
Эстрадиол	
Прогестерон Тестостерон Кортикостерон	
Эндотоксин	
Морфофункциональное состояние органов-мишеней и активность ферментов печени	
Показатель дистрофических и некротических изменений в печени Число НФ в м/а перегородках легких	
АлАТи АсАТ	
Морфофункциональное состояние тимуса	
Объемная доля коркового вещества	
Ширина субкапсулярной зоны	
Апоптоз тимоцитов	
Морфофункциональное состояние селезенки	
Объемная доля ПАЛМ Маргинальная зона лимфоидных узелков	
Объемная доля герминат. центров лимфоидных узелков	
Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки и в сыворотке крови	
ИЛ-4 ИЛ-6	
ФНО-α	

ИЛ-12 Неоптерин в сыворотке крови	

5.3.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самцов крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самцов крыс Вистар наблюдалось снижение содержания в сыворотке крови общего тестостерона, тогда как концентрация эстрадиола и прогестерона статистически значимо не отличалась от показателей контрольной группы. На 7-е сут эксперимента в опытной группе по сравнению с контрольной содержание общего тестостерона оставалось низким, а концентрация эстрадиола была статистически значимо выше. Показатели содержания прогестерона в сыворотке крови в этот срок не отличались от значений контрольной группы и у животных на 1-е сут развития СВО (табл. 5.3.2.1).

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось снижение содержания тестостерона в сыворотке крови. На 7-е сут эксперимента в опытной группе концентрация эстрадиола повышалась, а тестостерона – оставалась низкой.

Таблица 5.3.2.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=8)	67,38 (59,08-76,59)^{1*}	4,11 (3,50-4,94)^{1}	3,39 (2,65-4,13)^{1}
ЛПС 1-е сут (n=8)	77,88 (72,72-78,25)^{2}	6,12 (5,29-9,06)^{2}	0,06 (0,04-0,09)^{2}
ЛПС 7-е сут (n=6)	86,91 (82,68-92,44)^{3}	7,94 (3,16-15,29)^{3}	0,51 (0,20-0,80)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	$0{,}3912^{1\text{-}2}$ $0{,}0209^{1\text{-}3}$ $0{,}1416^{2\text{-}3}$	$0{,}0882^{1\text{-}2}$ $0{,}4649^{1\text{-}3}$ $0{,}9168^{2\text{-}3}$	$0{,}0003^{1\text{-}2}$ $0{,}0043^{1\text{-}3}$ $0{,}0002^{2\text{-}3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения легких у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При микроскопическом исследовании легких у самцов крыс Вистар контрольной группы просветы бронхов были воздушными, иногда в них выявлялись единичные десквамированные эпителиальные клетки. Слизистая оболочка бронхов представлена кубическим реснитчатым эпителием, расположенным в 1-2 ряда. Просветы альвеол и альвеолярных ходов воздушные, межальвеолярные перегородки тонкие, при увеличении 400 в них выявлялись единичные нейтрофилы (рис. 5.3.2.1А, Б).

На 1-е сут развития СВО в легких у самцов в просветах бронхов определялись гомогенные и зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. В очагово утолщенных межальвеолярных перегородках было большое количество нейтрофилов (8-13 в поле зрения при ув. 400). Периваскулярные лимфатические щели некоторых легочных вен расширены. У 7 из 8 животных выявлен интраальвеолярный отек: небольшая часть просветов альвеол и альвеолярных ходов была заполнена гомогенными эозинофильными массами с эритроцитами и единичными лейкоцитами (рис. 5.3.2.1В, Г). Таким образом, в легких крыс на 1-е сут после введения ЛПС развивалась воспалительная реакция, которая характеризовалась увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, у большинства животных она сочеталась с отеком.

При морфологическом исследовании легких на 7-е сут после введения ЛПС просветы некоторых бронхов были частично заполнены эозинофильным секретом, в котором выявлялся десквамированный эпителий. Межальвеолярные перегородки диффузно-очагово утолщены, в них умеренное число нейтрофилов. Небольшие зоны интраальвеолярного отека были обнаружены у 7 из 9 животных. Периваскулярные лимфатические щели были расширены (рис. 5.3.2.1Д, Е).

По данным морфометрического исследования на 1-е сут после введения ЛПС количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было достоверно выше по сравнению со значениями контрольной группой (табл. 5.3.2.2). На 7-е сут после введения ЛПС число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов достоверно снижалось, однако исследуемые показатели оставались статистически значимо выше значений в контрольной группе (табл. 5.3.2.2).

Таблица 5.3.2.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

(Me; 25-75%)

Группа наблюдения	**Число нейтрофилов на площади 25 тыс. мкм^2**
Контрольная (n=10)	1,43 (1,43-2,00)^{1*}
ЛПС 1-е сут (n=8)	10,29 (8,14-13,86)^{2}
ЛПС 7-е сут (n=9)	3,43 (3,14-4,29)^{3}
Статистическая значимость различий (p)	0,0027$^{1-2}$ 0,0027$^{1-3}$ 0,0003$^{2-3}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самцов в легких наблюдался интраальвеолярный отек и увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса в них после введения ЛПС. На 7-е сут интраальвеолярный отек был менее выражен, однако число нейтрофилов оставалось более высоким, чем в контрольной группе, т.е. воспалительный процесс у самцов крыс Вистар в эти сроки сохранялся.

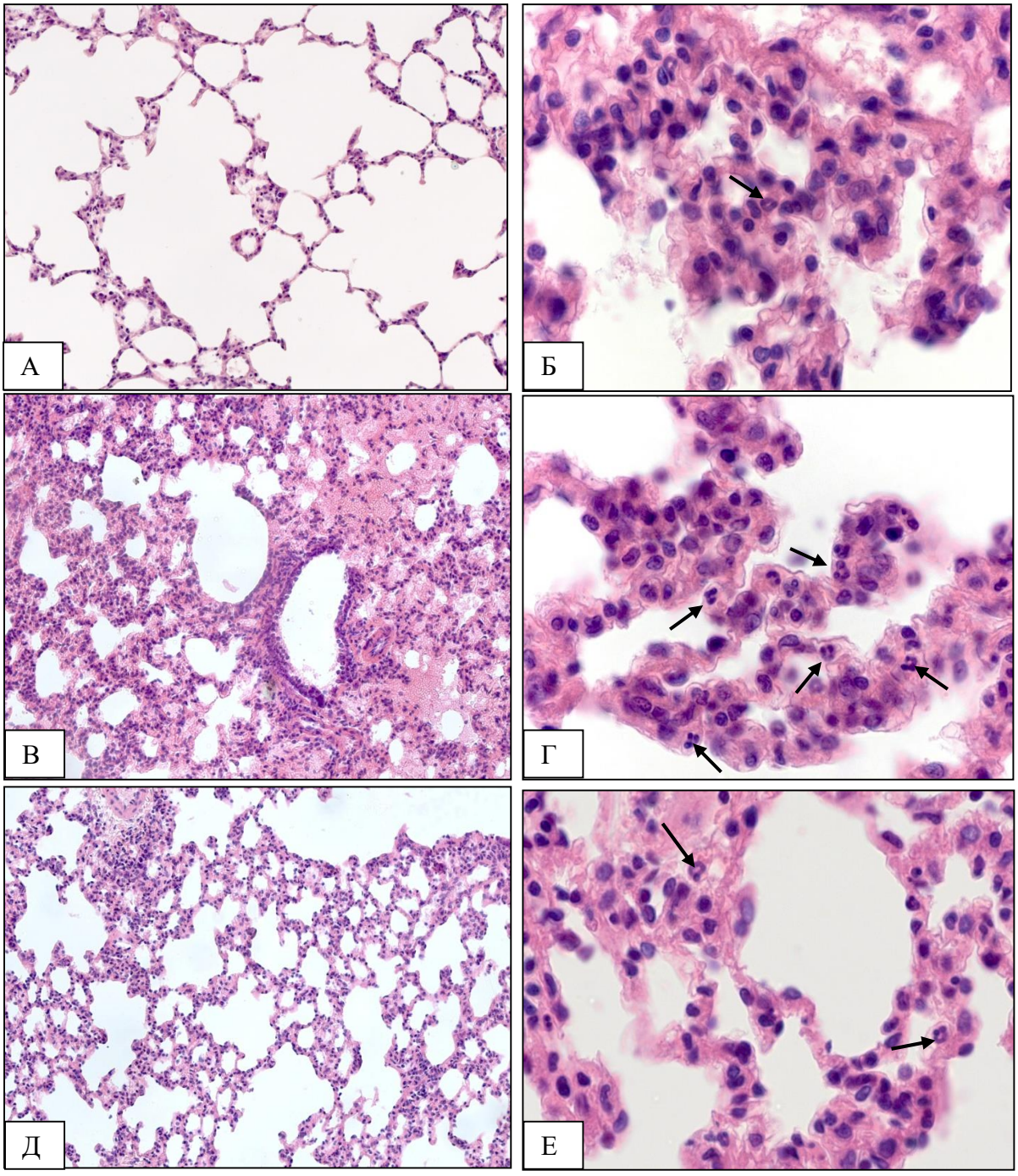


Рис. 5.3.2.1. Морфологическая характеристика легких у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные, межальвеолярные перегородки тонкие; Б – в межальвеолярных перегородках единичные нейтрофилы. *1-е сут после введения ЛПС*: В – обширные зоны интраальвеолярного отека, просветы альвеол и альвеолярных ходов заполнены эритроцитами и эозинофильными массами; Г - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – единичные альвеолы и альвеолярные ходы частично заполнены гомогенными эозинофильными массами, очагово утолщенные межальвеолярные перегородки; Е – нейтрофилы в межальвеолярных перегородках, интраальвеолярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 200; Б, Г, Е 1000

Морфологические изменения печени у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании печени у самцов контрольной группы балочное и дольковое строение было сохранено. По ходу балок выявлялись диффузно рассеянные неэпителиальные клеточные элементы, а в соединительной ткани по ходу триад определялись единичные лимфоциты и гистиоциты. Цитоплазма гепатоцитов с мелкой базофильной зернистостью, дистрофических изменений не обнаружено (рис. 5.3.2.2А, Б). Стенки центральных вен тонкие, выстилающий их эндотелий плоский.

На 1-е сутки после введения ЛПС у самцов в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов - выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы (ув. 640). По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, стазы и сладжи (рис. 5.3.2.2В, Г).

На 7-е сутки наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры печени, выраженность дистрофических изменений снижалась (рис. 5.3.2.2Д, Е). Вакуольная и гиалиново-капельная дистрофия была слабо выражена. Гепатоциты с дистрофическими изменениями локализовались преимущественно в периферических отделах долек.

По данным полуколичественной оценки наибольшая выраженность дистрофических и некротических изменений в печени была выявлена на 1-е сут после введения ЛПС. На 7-е сут после введения ЛПС у самцов в печени показатель выраженности альтеративных изменений не отличался от такового в контрольной группе (табл. 5.3.2.3).

Таким образом, в печени у самцов на 1-е сут развития СВО выявлены дистрофические изменения. На 7-е сут после введения ЛПС их выраженность снижается.

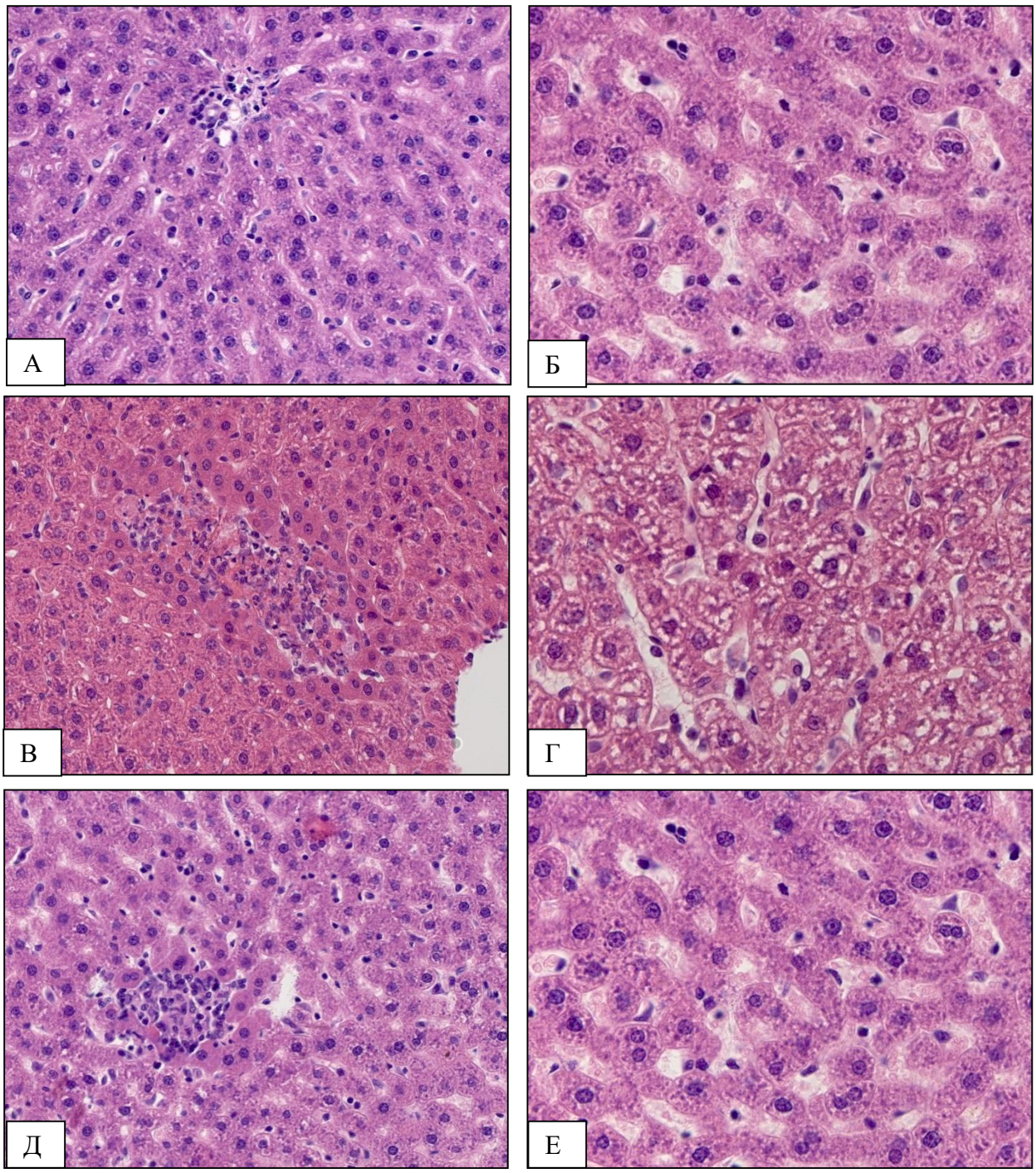


Рис. 5.3.2.2. Морфологическая характеристика печени у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – балочное строение печени сохранено, дистрофических изменений нет; Б – в цитоплазме гепатоцитов мелкая базофильная зернистость. *1-е сут после введения ЛПС*: В – небольшой очаг некроза, мелкокапельная дистрофия гепатоцитов; Г – гепатоциты с умеренной дистрофией. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – небольшой очаг некроза; Е – гепатоциты без дистрофических изменений. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 400; Б, Г, Е 640

Таблица 5.3.2.3

Показатель выраженности альтеративных изменений в печени у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений (баллы)
Контрольная (n=8)	1,00 (0,50-1,50)[1*]
ЛПС 1-е сут (n=7)	2,00 (2,00-2,20)[2]
ЛПС 7-е сут (n=7)	1,75 (0,00-2,50)[3]
Статистическая значимость различий (p)	0,0048[1-2] 0,6272[1-3] 0,0619[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самцов показатели активности АлАТ и АсАТ повышались по сравнению с контрольной группой. На 7-е сут развития СВО у самцов активность ферментов печени была статистически значимо выше, чем в контрольной и опытной группе на 1-е сут после введения ЛПС (табл. 5.3.2.4).

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самцов наблюдалось статистически значимое увеличение содержания эндотоксина, показатель которого снижался на 7-е сут после введения ЛПС и был ниже контрольного значения (табл. 5.3.2.4).

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самцов наблюдалось снижение концентрации кортикостерона (табл. 5.3.2.4). На 7-е сут после введения ЛПС содержание кортикостерона у животных нормализовалось (табл. 5.3.2.4).

Таблица 5.3.2.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=9)	38 (30-41)[1]	72 (61-76)[1]	3,25 (2,95-3,81)[1*]	37,88 (34,80-41,00)[1]
ЛПС 1-е сут (n=11)	53 (46-69)[2]	93 (77-116)[2]	9,41 (7,94-10,80)[2]	25,95 (20,44-30,04)[2]
ЛПС 7-е сут (n=7)	93 (88-94)[3]	147 (146-159)[3]	0,77 (0,65-1,00)[3]	35,24 (17,20-41,00)[3]
Статистическая значимость различий (p)	0,0758[1-2] 0,0090[1-3] 0,0090[2-3]	0,0283[1-2] 0,0090[1-3] 0,0090[2-3]	0,0081[1-2] 0,0095[1-3] 0,0047[2-3]	0,004[1-2] 0,295[1-3] 0,177[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самцов выявлено повышение активности ферментов печени и уровня эндотоксина в сыворотке крови на фоне снижения

содержания кортикостерона. На 7-е сут после введения ЛПС активность АлАТ и АсАТ оставалась высокой, а показатели концентрации кортикостерона и уровень эндотоксина нормализовались.

Морфологические изменения тимуса и содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании у половозрелых самцов контрольной группы в тимусе соотношение между корковым и мозговым веществом составляло примерно 1:1 (рис. 5.3.2.3А). Корковое вещество представлено равномерно распределенными лимфоидными и эпителиальными ретикулярными клетками. Границы между корковым и мозговым веществом четкие (рис. 5.3.2.3А). Субкапсулярная зона у самцов узкая и представлена 3-4 рядами лимфобластов. В мозговом веществе обнаруживались тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 эпителиальных клеток.

Через сутки после введения ЛПС у самцов в тимусе выявлялись признаки акцидентальной инволюции II стадии. В корковом веществе обнаруживалась картина «звездного неба», фрагменты ядер погибших клеток и фагоцитирующие их макрофаги (рис. 5.3.2.3В, Г). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими. Наблюдалось расширение субкапсулярной зоны, которая была представлена 8–10 рядами лимфобластов (табл. 5.3.2.5). В мозговом веществе обнаруживались тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 концентрически расположенных эпителиальных клеток с накоплением кератогиалина в центре, а также единичные в препарате кистоподобные полости.

На 7-е сут развития СВО наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры органа (рис. 5.3.2.3Д, Е). При морфологическом исследовании в эти сроки у самцов обнаруживалось увеличение объемной доли коркового вещества. В этот срок эксперимента показатель объемной доли коркового вещества была статистически значимо выше такового в контрольной группе (табл. 5.3.2.5). На 7-е сут после введения ЛПС у самцов субкапсулярная зона была широкой, и ее показатели были статистически значимо выше, чем в контрольной и опытной группах.

Таблица 5.3.2.5

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина субкапсулярной зоны, мкм
	КВ	МВ		
Контрольная (n=11)	$54,98\pm1,20^{1*}$	$45,02\pm1,20^{1}$	$1,27\pm0,06^{1}$	$25,28\pm1,32^{1}$
ЛПС 1-е сут (n=15)	$55,06\pm0,65^{2}$	$44,94\pm0,65^{2}$	$1,23\pm0,03^{2}$	$39,74\pm0,72^{2}$
ЛПС 7-е сут (n=10)	$70,33\pm2,47^{3}$	$29,67\pm2,47^{3}$	$2,48\pm0,28^{3}$	$53,86\pm3,62^{3}$
Статистическая значимость различий (p)	$0,7913^{1-2}$ $0,0027^{1-3}$ $0,0045^{2-3}$	$0,7913^{1-2}$ $0,0027^{1-3}$ $0,0045^{2-3}$	$0,4914^{1-2}$ $0,0027^{1-3}$ $0,0045^{2-3}$	$0,0112^{1-2}$ $0,0145^{1-3}$ $0,0025^{2-3}$

Примечания. КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе повышалось по сравнению с контрольной группой, тогда как показатель апоптотической гибели $CD3^{+}$-лимфоцитов статистически значимо не изменялся (табл. 5.3.2.6).

Таблица 5.3.2.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^{+}$-лимфоцитов у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^{-}$)	$CD3^{+}$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	0,4 (0,1-1,0)	11,8 (4,4-13,4)
ЛПС 1-е сут (n=6)	3,55 (3,2-4,1)	7,25 (6,5-10,4)
ЛПС 7-е сут (n=6)	-	-
Статистическая значимость различий (p)	0,003	0,55

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самцов крыс Вистар в тимусе выявлена акцидентальная инволюция I-II стадии, которая сопровождалась повышением апоптотической гибели тимоцитов. На 7-е сут после введения ЛПС корковое вещество тимуса и его субкапсулярной зоны расширялись, что свидетельствовало об акцидентальной инволюции I стадии.

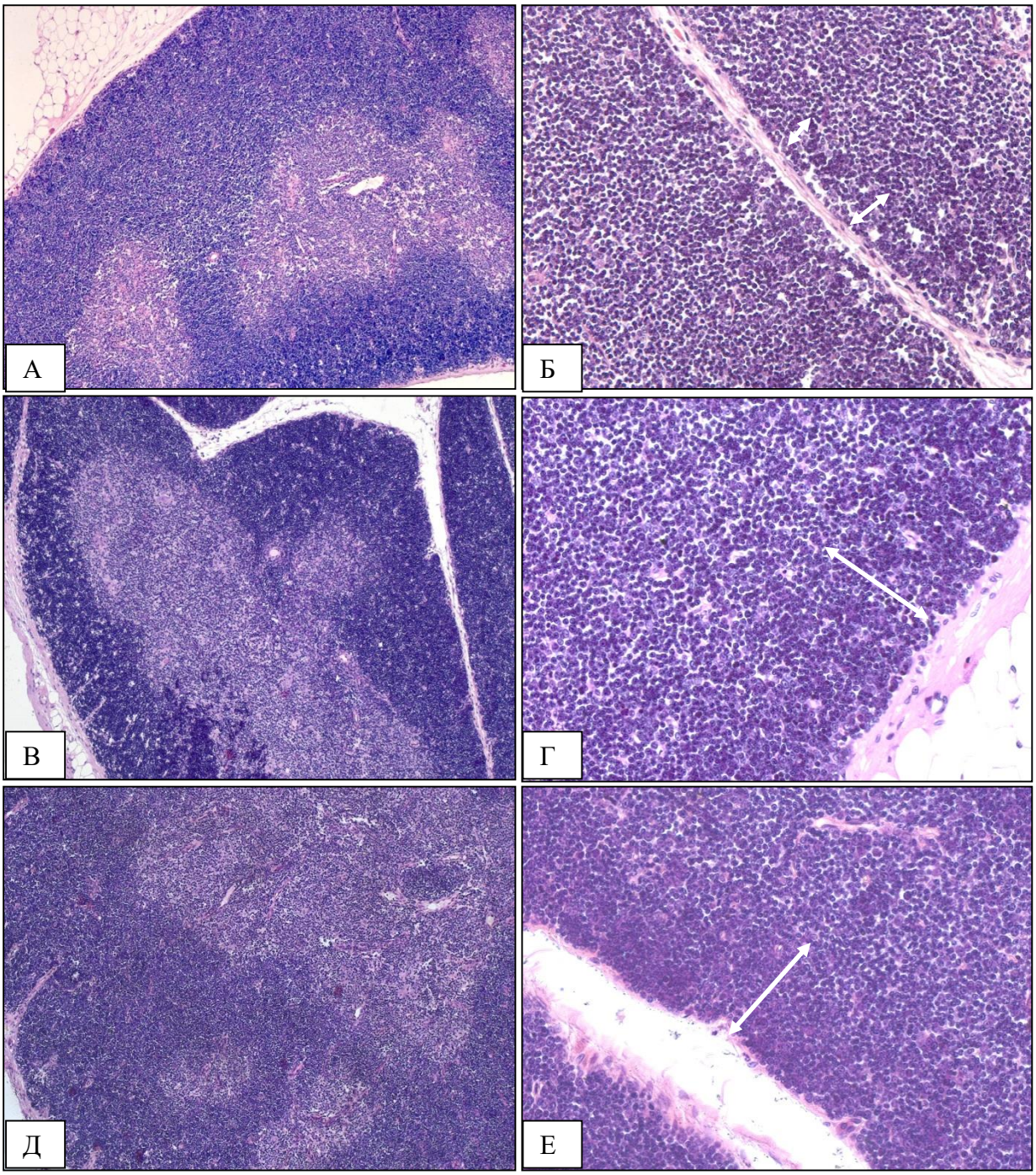


Рис. 5.3.2.3 Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – границы между корковым и мозговым веществом четкие, соотношение между корковым и мозговым веществом примерно 1:1; Б – субкапсулярная зона узкая, состоит из 3-4 рядов лимфобластов. *1-е сут после введения ЛПС*: В – в корковом веществе картина «звездного неба», границы между корковым и мозговым веществом четкие; Г – субкапсулярная зона широкая, состоит из 10-12 рядов лимфобластов. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие; Е – широкая субкапсулярная зона, состоит из 12-14 рядов лимфобластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 400

Морфологические изменения селезенки у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании в селезенке у половозрелых самцов белая пульпа была представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с герминативными центрами и хорошо выраженными маргинальными зонами. (рис. 5.3.2.4А, Б). В герминативных центрах среди лимфобластов выявлялись многочисленные митотически делящиеся клетки. В красной пульпе селезенки обнаруживались равномерно распределенные зрелые клетки крови и макрофаги.

На 1-е сут развития СВО в селезенке у самцов наблюдалось «опустошение» белой пульпы, представленной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками (рис. 5.3.2.4В, Г). В лимфоидных узелках выявлялись крупные герминативные центры, представленные митотически делящимися клетками, фрагментами ядер погибших лимфоцитов (рис. 5.3.2.4Г). Маргинальные зоны лимфоидных узелков были уже по сравнению с контрольной группой. По данным морфометрической оценки функциональных зон селезенки на 1-е сут после введения ЛПС у самцов половозрелых крыс Вистар обнаруживалось уменьшение объемной доли белой пульпы за счет снижения ПАЛМ-зоны (табл. 5.3.2.7). Показатель объемной доли герминативных центров лимфоидных узелков селезенки у самцов в эти сроки повышался, а маргинальной зоны – снижался.

На 7-е сут после введения ЛПС наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры органа. В эти сроки в селезенке у самцов обнаружено расширение зоны белой пульпы и сужение герминативных центров лимфоидных узелков (рис. 5.3.2.4Д, Е). По сравнению с 1-ми сут развития СВО показатель объемной доли маргинальной зоны в эти сроки возрастал (табл. 5.3.2.7).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у половозрелых самцов крыс Вистар в селезенки наблюдалось «опустошение» белой пульпы за счет снижения объемной доли Т-зависимой ПАЛМ-зоны. На 7-е сут после введения ЛПС в селезенке у половозрелых самцов восстанавливались функциональные зоны: площадь белой пульпы селезенки нормализовалась, герминативные центры суживались, а маргинальные зоны лимфоидных узелков расширялись.

Таблица 5.3.2.7

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения	Объемная доля функциональных зон селезенки, %			Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	Объемная доля функциональных зон ЛУз селезенки, %	
	ПАЛМ-зона	ЛУз	БП		МЗ	ГЦ
Контрольная (n=10)	$27,42±1,65^{1*}$	$14,82±1,62^{1}$	$42,24±1,83^{1}$	$0,78±0,03^{1}$	$44,70±1,92^{1}$	$22,18±1,93^{1}$
ЛПС 1-е сут (n=15)	$24,08±0,35^{2}$	$16,99±0,33^{2}$	$40,06±0,55^{2}$	$0,71±0,03^{2}$	$37,68±0,55^{2}$	$30,72±0,32^{2}$
ЛПС 7-е сут (n=9)	$30,28±0,53^{3}$	$20,20±0,47^{3}$	$50,48±0,74^{3}$	$1,03±0,02^{3}$	$38,88±1,24^{3}$	$19,54±0,80^{3}$
Статистическая значимость различий (p)	$0,0008^{-2}$ $0,0077^{1-3}$ $0,0038^{2-3}$	$0,233^{1-2}$ $0,0041^{1-3}$ $0,0058^{2-3}$	$0,037^{1-2}$ $0,0027^{1-3}$ $0,0045^{2-3}$	$0,045^{1-2}$ $0,0027^{1-3}$ $0,0046^{2-3}$	$0,0002^{1-2}$ $0,0388^{1-3}$ $0,4064^{2-3}$	$0,0001^{1-2}$ $0,2571^{1-3}$ $0,001^{2-3}$

Примечания. ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

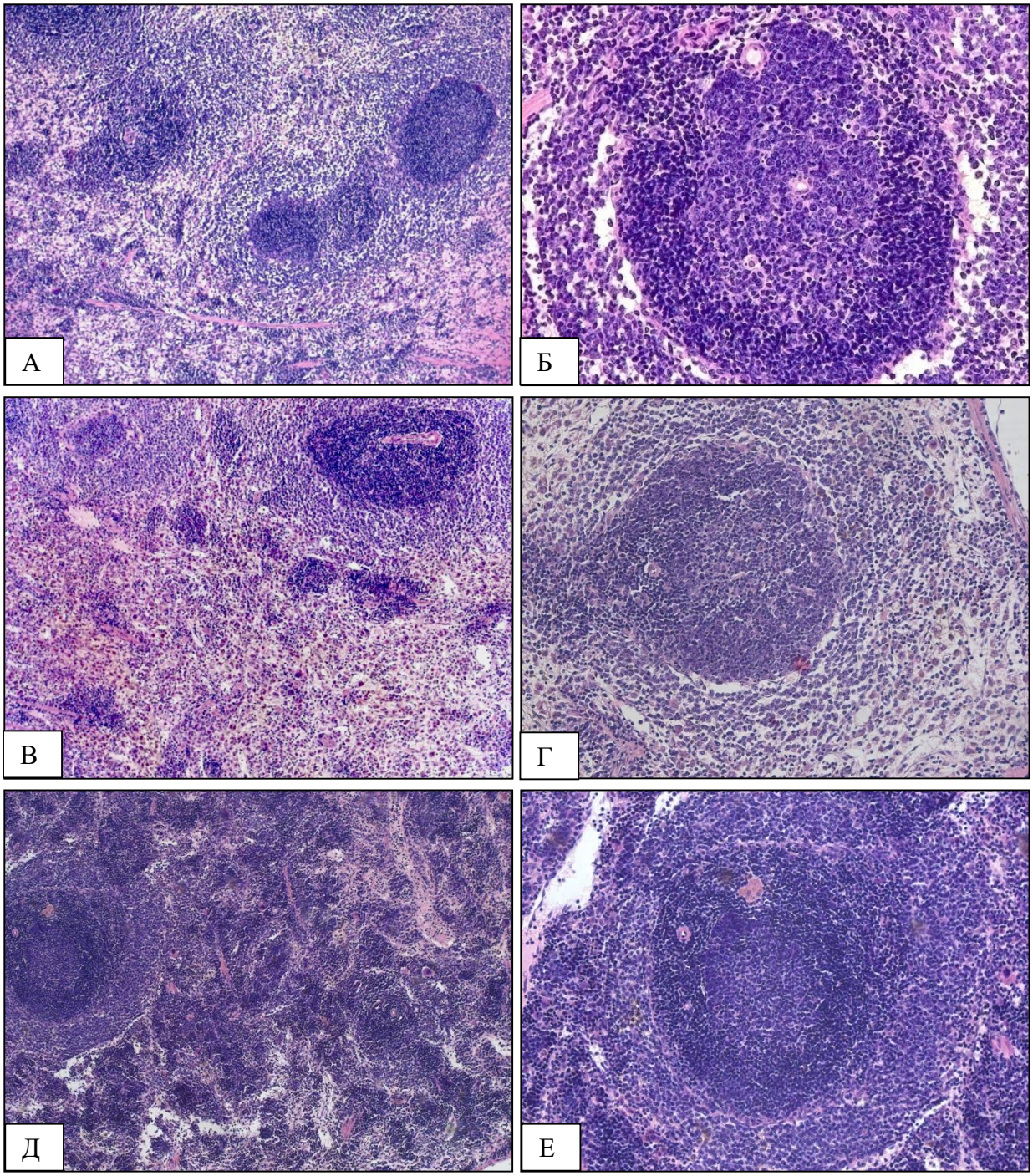


Рис. 5.3.2.4. Морфологическая характеристика селезенки у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сут (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А – белая пульпа представлена узкой ПАЛМ-зоной, небольшой лимфоидный узелок без светлого центра; Б – лимфоидный узелок с крупным светлым центром и маргинальной зоной. *1-е сут после введения ЛПС*: В – ПАЛМ-зона не выражена; Г – лимфоидный узелок с небольшим светлым центром и узкой маргинальной зоной. *7-е сут после введения ЛПС:* Д – ПАЛМ-зона выражена, широкий лимфоидный узелок с крупным светлым центром; Е – лимфоидный узелок с крупным светлым центром и широкой маргинальной зоной. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 200

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у половозрелых самцов крыс Вистар наблюдалось увеличение содержания неоптерина и снижение концентрации TGF-β в сыворотке крови.

В культуре клеток селезенки в этот срок у самцов на фоне активации продукции Тх1-цитокина ИЛ-2 было выявлено снижение ИЛ-4 и ИЛ-12. Показатели остальных исследуемых цитокинов – ИЛ-6, ФНО-α, ИФН-γ, в ответ на введение ЛПС не отличались от таковых в контрольной группе (табл. 5.3.2.8).

На 7-е сут после введения ЛПС у самцов в сыворотке крови была выявлена нормализация содержания неопетрина. В культуре клеток селезенки у них продукция ИЛ-2 оставалась на высоком уровне, а ИЛ-4 – на низком, и эти показатели не отличалась от значений в опытной группе на 1-е сут развития СВО. В эти сроки эксперимента уровень продукции ИЛ-6 повышался, а ФНО-α и ИФН-γ – снижался на фоне нормализации показателя продукции ИЛ-12 (табл. 5.3.2.8).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самцов наблюдалось повышение маркера активации Тх1-типа иммунного ответа – неоптерина, концентрация которого снижалась до значений контрольной группы к 7-м сут развития СВО, а также – снижение содержания цитокина, продуцируемого Т-регуляторными лимфоцитами, – TGF-β. На 1-е сут после введения ЛПС выявлена супрессия продукции Тх2-цитокина – ИЛ-4 и иммунорегуляторного – ИЛ-12 на фоне активации продукции Тх1-цитокина – ИЛ-2. На 7-е сут после введения ЛПС уровень продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и Тх1-цитокина – ИЛ-2 не отличались от более раннего срока развития СВО, уровень продукции ИЛ-12 нормализовался, что сочеталось с повышением продукции ИЛ-6 и снижением – ФНО-α и ИФН-γ.

Таблица 5.3.2.8

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Биологическая среда	Цитокины	Контрольная (n=8)	ЛПС 1-е сут (n=8)	ЛПС 7-е сут (n=8)	Статистическая значимость различий (p)
Сыворотка крови	TGF-β (нг/мл)	38,43[1*] (35,47-46,03)	20,47[2] (13,04-41,80)	-	0,0451[1-2]
	Неоптерин (нмоль/л)	0,84[1] (0,17-1,14)	1,53[2] (1,39-1,94)	1,03[3] (0,78-1,49)	0,0424[1-2] 0,3717[1-3] 0,0639[2-3]
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	ИЛ-2	152,03[1] (103,8-167,3)	209,80[2] (194,2-548,8)	360,20[3] (239,4-430,1)	0,011[1-2] 0,0071[1-3] 0,982[2-3]
	ИЛ-4	29,90[1] (23,4-39,1)	5,36[2] (4,57-9,02)	3,32[3] (2,10-3,62)	0,0045[1-2] 0,0092[1-3] 0,0185[2-3]
	ИЛ-6	547[1] (438-798)	326[2] (244-649)	1000[3] (976-1112)	0,0760[1-2] 0,0090[1-3] 0,0034[2-3]
	ИЛ-12	38,40[1] (22,9-55,4)	0,00[2] (0-0)	29,70[3] (12,8-33,6)	0,0208[1-2] 0,3865[1-3] 0,0455[2-3]
	ИФН-γ	44,70[1] (40,2-58,1)	31,30[2] (26,8-45,0)	26,80[3] (13,7-44,7)	0,0750[1-2] 0,0424[1-3] 0,3379[2-3]
	ФНО-α	37,65[1] (33,35-43,03)	24,53[2] (12,27-55,2)	12,27[3] (0-26,07)	0,0881[1-2] 0,0002[1-3] 0,167[2-3]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО у половозрелых самцов крыс Вистар в периферической крови наблюдалось повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток, что сочеталось со снижением абсолютного числа Т-лимфоцитов: хелперов, цитотоксических и регуляторных лимфоцитов (табл. 5.3.2.9).

Таблица 5.3.2.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляция	Относительное число, %		Абсолютное число, млн/мл	
	Контрольная (n=10)	**ЛПС (n=6)**	**Контрольная (n=10)**	**ЛПС (n=6)**
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$53,00^{1*}$ (45,5-63,0)	$43,7^{2}$ (38,1-53,2)	$9,7^{1}$ (6,9-11,3)	**$5,6^{2}$** (2,8-6,9)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$40,65^{3}$ (33,7-45,0)	$44,65^{4}$ (34,6-49,5)	$3,9^{3}$ (3,1-4,2)	**$2,2^{4}$** (1,2-2,4)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$59,9^{5}$ (51,8-71,4)	**$47,7^{6}$** (46,5-63,6)	$6,3^{5}$ (4,4-8,2)	**$2,7^{6}$** (1,3-4,4)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$19,5^{7}$ (15,5-21,7)	$25,75^{8}$ (19,1-29,1)	$3,7^{7}$ (2,6-4,3)	$3,7^{8}$ (1,4-4,3)
NK-клетки ($CD314^+$)	$5,55^{9}$ (2,9-9,6)	**$30,8^{10}$** (20,9-40,8)	$0,8^{9}$ (0,5-2,2)	**$2,9^{10}$** (2,4-4,5)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$3,3^{11}$ (2,4-4,7)	$3,45^{12}$ (2,0-4,6)	$0,02^{11}$ (0,01-0,03)	$0,01^{12}$ (0,006-0,01)
Регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$3,7^{13}$ (3,6-4,8)	$4,2^{14}$ (3,3-5,2)	$0,03^{13}$ (0,017-0,04)	**$0,014^{14}$** (0,006-0,02)
Статистически значимые различия, значения	$0,12^{1-2}$ $0,51^{3-4}$ $0,025^{5-6}$ $0,38^{7-8}$	$0,001^{9-10}$ $0,7^{11-12}$ $0,91^{13-14}$	$0,03^{1-2}$ $0,009^{3-4}$ $0,03^{5-6}$ $0,74^{7-8}$	$0,007^{9-10}$ $0,01^{11-12}$ $0,02^{13-14}$

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у половозрелых самцов крыс Вистар наблюдалась активация одного из компонентов врожденного иммунитета – повышение числа NK-клеток. Абсолютное количество Т-лимфоцитов, включая Т-хелперы, Т-цитотоксические и регуляторные лимфоциты, в этот срок статистически значимо снижалось.

Заключение

Таким образом, введение самцам крыс Вистар ЛПС в дозе 1,5 мг/кг приводит к повышению уровня эндотоксина в сыворотке крови на 1-е сут развития СВО, показатели которого нормализуются на 7-е сут эксперимента. В ранние сроки после введения ЛПС наблюдается снижение содержания кортикостерона и общего тестостерона в сыворотке крови, их концентрация, также как и эндотоксина, нормализуется на 7-е сут. Содержание эстрадиола на 1-е сут после введения ЛПС не отличается от значений контрольной группы и повышается на 7-е сут развития СВО.

В легких у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС выявляется интраальвеолярный отек и воспалительная реакция, которая характеризуется увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. В печени самцов в эти сроки выражены

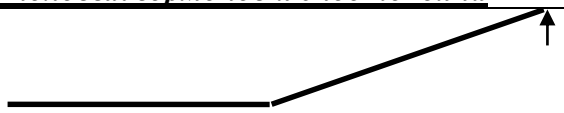
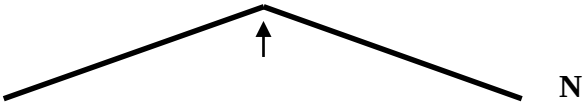
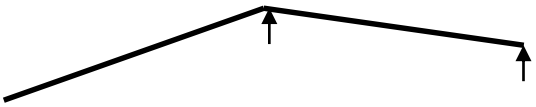
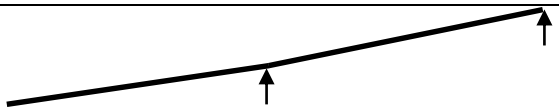
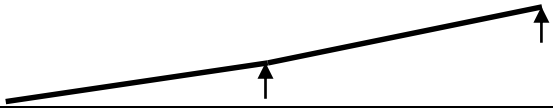
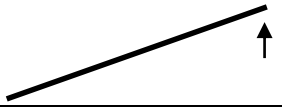
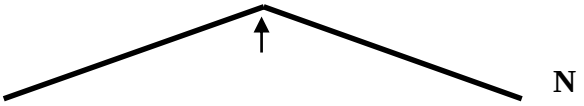
дистрофические изменения гепатоцитов и повышен уровень активности ферментов – АлАТ и АсАТ в сыворотке крови. На 7-е сут развития СВО выраженность воспалительных изменений в легких у самцов снижается, а альтеративных в печени – не изменяется, что сочетается с высоким уровнем активности ферментов печени по сравнению с 1-ми сут эксперимента и контрольной группой.

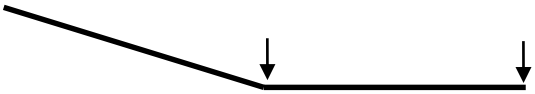
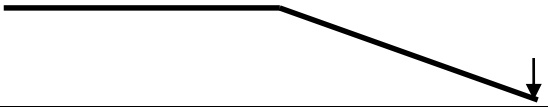
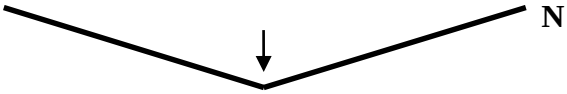
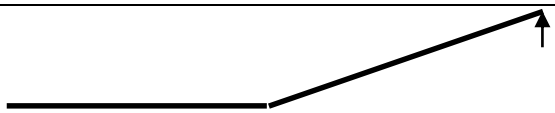
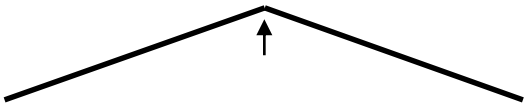
В тимусе у самцов в ранние сроки СВО развивается акцидентальная инволюция II стадии – в корковом веществе наблюдается картина «звездного неба», расширение субкапсулярной зоны и увеличение числа апоптотически гибнущих тимоцитов. На 7-е сут эксперимента в тимусе выявляется акцидентальная инволюция I стадии, которая характеризуется расширением коркового вещества и его субкапсулярной зоны. В селезенке на 1-е сут СВО снижается объемная доля ПАЛМ-зоны и маргинальной зоны лимфоидных узелков, а размеры герминативных центров – увеличиваются, что свидетельствует об активации процессов миграции и пролиферации лимфоцитов. На 7-е сут наблюдается нормализация структуры селезенки.

На 1-е сут после введения ЛПС в периферической крови у половозрелых самцов снижается абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-регуляторных лимфоцитов, а NK-клеток – повышается. В эти сроки уровень продукции ИЛ-2 клетками селезенки и содержание неоптерина в сыворотке крови статистически значимо повышается, а продукция ИЛ-4, ИЛ-12 и концентрация TGF-β – снижаются, что свидетельствует о поляризации иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу. На 7-е сут СВО уровень продукции ИЛ-2 повышается по сравнению с ранними сроками эксперимента, а содержание неоптерина в сыворотке крови, как и продукция ИЛ-12 клетками селезенки нормализуются. В эти сроки наблюдается снижение уровня продукции ИФН-γ и ФНО-α на фоне повышения ИЛ-6. Показатели продукции ИЛ-4 клетками селезенки на 7-е сут развития СВО остаются ниже значений контрольной группы.

Таблица 5.3.2.10

Схема динамики изменений содержания стероидных гормонов, показателей выраженности СВО у самцов крыс Вистар после введения ЛПС. Приведены статистически значимые данные по сравнению с контрольной группой

Параметры	Контрольная группа 1-е сут ЛПС 7-е сут ЛПС
Уровень стероидных половых гормонов и эндотоксина	
Эстрадиол	
Прогестерон	
Тестостерон Кортикостерон	
Эндотоксин	
Морфофункциональное состояние органов-мишеней и активность ферментов печени	
Показатель дистрофических и некротических изменений в печени Число НФ в м/а перегородках легких	
АлАТи АсАТ	
Морфофункциональное состояние тимуса	
Объемная доля коркового вещества	
Ширина субкапсулярной зоны	
Апоптоз тимоцитов	
Морфофункциональное состояниеселезенки	
Объемная доля ПАЛМ МЗ ЛУз	
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков	
Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки и в сыворотке крови	
ИЛ-2	

ИЛ-4	
ИФН-γ **ФНО-α**	
ИЛ-12 **TGF-β в сыворотке крови**	
ИЛ-6	
Неоптерин в сыворотке крови	

5.3.3 Половые различия иммунологических нарушений и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у половозрелых крыс Вистар

Сравнительная характеристика содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самок крыс Вистар наблюдалось увеличение содержания в сыворотке крови прогестерона и общего тестостерона, тогда как концентрация эстрадиола статистически значимо снижалась по сравнению с контрольной группой. На 7-е сут эксперимента уровень прогестерона и общего тестостерона снижался и достигал контрольных значений, а показатели количества эстрадиола в сыворотке крови в эти сроки колебался, что, по-видимому, связано с фазой эстрального цикла в этот период (табл. 5.3.3.1, рис. 5.3.3.1).

На 1-е сут развития СВО у самцов снижалось количество только общего тестостерона, остальные показатели не изменялись (табл. 5.3.3.1, рис. 5.3.3.1). На 7-е сут после введения ЛПС у самцов повышалось содержание эстрадиола. Концентрация общего тестостерона в эти сроки возрастала, но не достигала контрольных значений (табл. 5.3.3.1).

Таблица 5.3.3.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдений		Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=7)**	134,5 (108,6-170,4)[1*]	9,50 (7,42-14,06)[1]	0,23 (0,19-0,30)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=6)	84,06 (80,22-91,15)[2]	45 (40,5-48)[2]	1,34 (0,56-1,62)[2]
	ЛПС 7-е сут (n=7)	78,75 (76,97-140,1)[3]	18,94 (10,77-40,65)[3]	0,10 (0,06-0,12)[3]
Самцы	**Контрольная (n=8)**	67,38 (59,08-76,59)[4]	4,11 (3,50-4,94)[4]	3,39 (2,65-4,13)[4]
	ЛПС 1-е сут (n=8)	77,88 (72,72-78,25)[5]	6,12 (5,29-9,06)[5]	0,06 (0,04-0,09)[5]
	ЛПС 7-е сут (n=6)	86,91 (82,68-92,44)[6]	7,94 (3,16-15,29)[6]	0,51 (0,20-0,80)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,0105^{1-2}$ $0,2733^{1-3}$ $0,8064^{2-3}$ $0,3912^{4-5}$ $0,0209^{4-6}$ $0,1416^{5-6}$ $0,0105^{1-4}$ $0,2207^{2-5}$ $0,6242^{3-6}$	$0,0082^{1-2}$ $0,0410^{1-3}$ $0,0759^{2-3}$ $0,0882^{4-5}$ $0,4649^{4-6}$ $0,9168^{5-6}$ $0,0027^{1-4}$ $0,0045^{2-5}$ $0,0917^{3-6}$	$0,0006^{1-2}$ $0,0092^{1-3}$ $0,0005^{2-3}$ $0,0003^{4-5}$ $0,0043^{4-6}$ $0,0002^{5-6}$ $0,0011^{1-4}$ $0,0009^{2-5}$ $0,0001^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таким образом, при развитии СВО у половозрелых самок и самцов были выявлены различия в динамике изменений содержания половых гормонов. На 1-е сут после введения ЛПС у самцов снижалась концентрация общего тестостерона, в отличие от самок, у которых наблюдалось уменьшение содержания эстрадиола на фоне повышения концентрации прогестерона и тестостерона. На 7-е сут развития СВО у самок содержание половых стероидов нормализовалось, тогда как у самцов концентрация общего тестостерона оставалась низкой по сравнению с контрольной группой и наблюдалось повышение содержания эстрадиола.

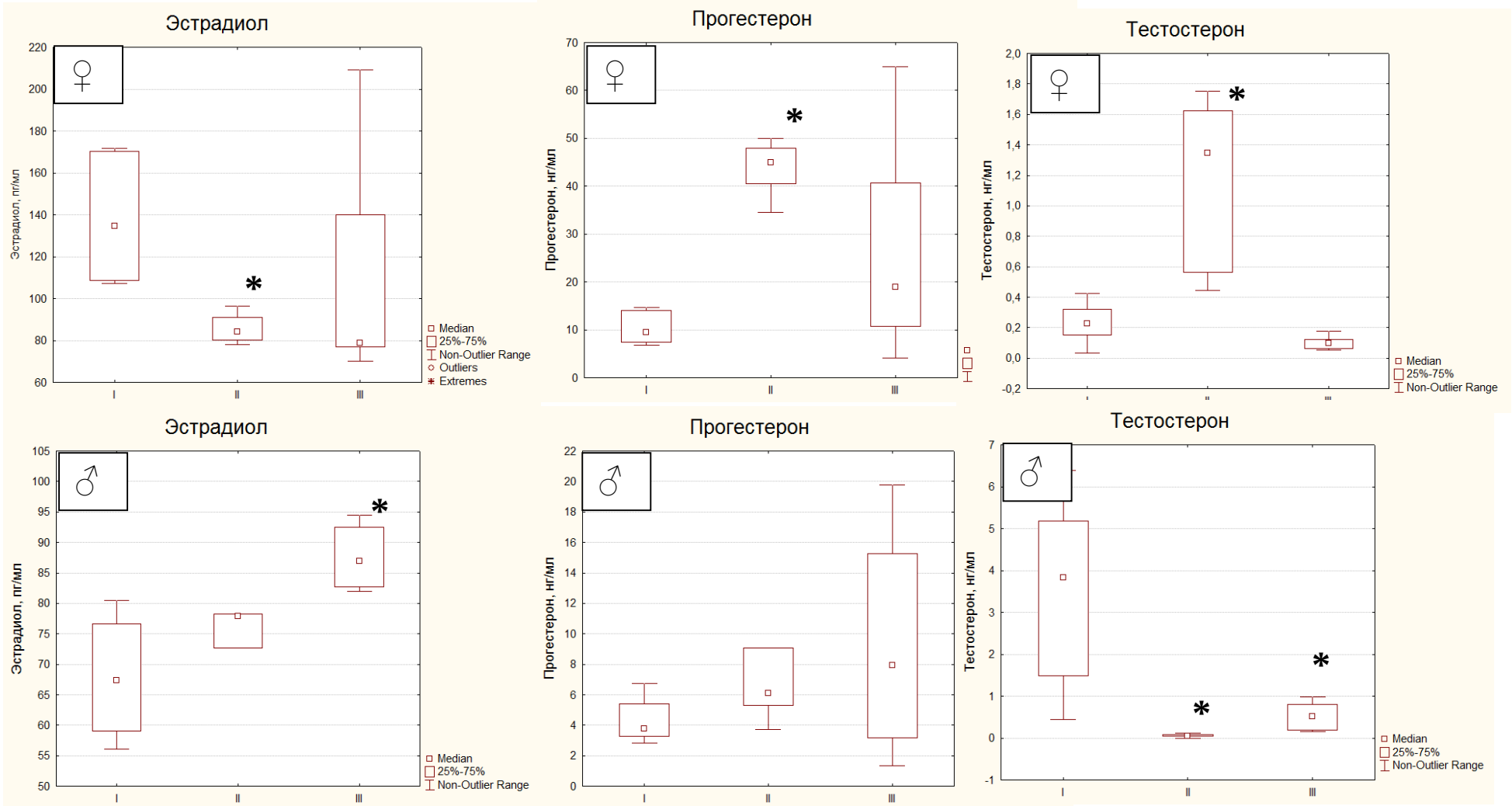


Рис. 5.3.3.1. Изменение содержания эстрадиола, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови у половозрелых самок (верхний ряд) и самцов (нижний ряд) крыс Вистар. Условные обозначения: I – контрольная группа; II – через сутки после введения ЛПС; III – на 7-е сут после введения ЛПС; ♀ - самки, ♂ - самцы

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут СВО в легких у самцов и самок в просветах бронхов выявлялись зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. Эпителий был очагово десквамирован. Межальвеолярные перегородки очагово утолщены, в них большое количество нейтрофилов (5-13 в поле зрения при ув. 400). Периваскулярные лимфатические щели расширены. У 3 из 7 самок, и у 7 из 8 самцов небольшая часть просветов альвеол и альвеолярных ходов была заполнена гомогенными эозинофильными массами с эритроцитами и единичными лейкоцитами (интраальвеолярный отек).

При морфологическом исследовании легких на 7-е сут после введения ЛПС просветы бронхов были полностью или частично заполнены эозинофильным секретом, в котором выявлялся десквамированный эпителий и нейтрофилы. Межальвеолярные перегородки диффузно-очагово утолщены, в них умеренное число нейтрофилов. Периваскулярные лимфатические щели были расширены.

По данным морфометрического исследования количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов и самок крыс контрольной группы достоверно не различалось. На 1-е сут после введения ЛПС количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у крыс Вистар обоего пола было достоверно выше по сравнению со значениями контрольной группы (табл. 5.3.3.2, рис. 5.3.3.2). Однако у самцов в эти сроки развивалась более выраженная воспалительная реакция в легких, о чем свидетельствовало более высокое число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких по сравнению с самками (табл. 5.3.3.2, рис. 5.3.3.2). На 7-е сут после введения ЛПС количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов и самок достоверно снижалось, однако исследуемые показатели оставались статистически значимо выше значений контрольных групп (табл. 5.3.3.2, рис. 5.3.3.2). Половых различий числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в эти сроки выявлено не было.

Таблица 5.3.3.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (25 тыс. мкм^2)		
Самки	**Контрольная (n=10)**	1,64 (1,43-1,86)^{1*}		
	ЛПС1-е сут (n=7)	5,71 (4,71-7,57)^{2}		
	ЛПС 7-е сут (n=6)	2,71 (2,29-4,00)^{3}		
Самцы	**Контрольная (n=10)**	1,43 (1,43-2,00)^{4}		
	ЛПС1-е сут (n=8)	10,29 (8,14-13,86)^{5}		
	ЛПС 7-е сут (n=9)	3,43 (3,14-4,29)^{6}		
Статистическая значимость различий (p)		0,00001$^{1-2}$ 0,00001$^{1-3}$ 0,0088$^{2-3}$	0,0027$^{4-5}$ 0,0027$^{4-6}$ 0,0003$^{5-6}$	0,631$^{1-4}$ 0,0022$^{2-5}$ 0,1611$^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

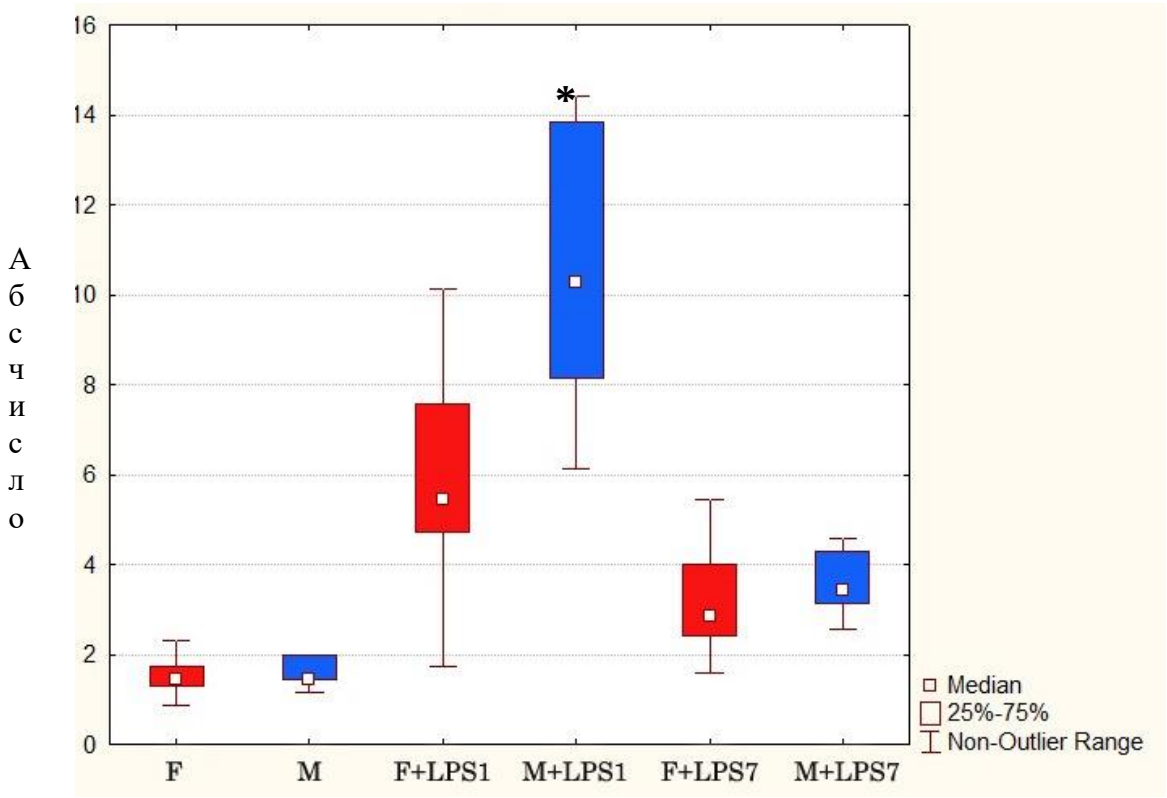


Рис. 5.3.3.2. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M), на 1-е (F+LPS1, M+LPS1) и 7-е (F+LPS7, M+LPS7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы: * - по сравнению с самками на 1-е сут после введения ЛПС

Таким образом, на 1-е сут развития СВО число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было более высоким у самцов по сравнению с самками. На 7-е сут после введения ЛПС половых различий морфологических изменений в легких не выявлено.

Сравнительная характеристика морфологических изменений печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сутки после введения ЛПС у самок в фазу проэструса и у самцов в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов - выраженная и распространенная дистрофия клеток печени, особенно на периферии дольки. У 1 самки и 1 самца из 7 в группе определялись очаги некрозов. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы. По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, в просвете отдельных из них определялись зернистые скопления, стазы и сладжи.

По данным морфометрической оценки выраженности дистрофических и некротических изменений в печени на 1-е сут после эксперимента половых различий выявлено не было. На 1-е сут после введения ЛПС определялись очаговые некрозы у 1 животного из 7 (14%) в каждой группе. Показатели дистрофических и некротических изменений печени у самцов и самок на 1-е сут статистически значимо не отличались (табл. 5.3.3.3, рис. 5.3.3.3).

На 7-е сутки наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры печени, выраженность дистрофических изменений снижалась. Вакуольная дистрофия была слабо выражена. Гепатоциты с дистрофическими изменениями локализовались преимущественно в периферических отделах долек. При полуколичественной оценке альтеративных изменений в печени между самками и самцами статистически значимых различий выявлено не было (табл. 5.3.3.3).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО морфологические изменения в печени у самцов и самок были сходными (табл. 5.3.3.3, рис. 5.3.3.3). На 7-е сут половых различий морфологических изменений в печени не обнаружено.

Таблица 5.3.3.3

Полуколичественные показатели патологических изменений в печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)		
Самки	**Контрольная (n=10)**	1,50 (1,00-2,50)[1*]		
	ЛПС1-е сут (n=11)	3,00 (2,00-3,00)[2]		
	ЛПС 7-е сут (n=7)	2,00 (1,00-2,50)[3]		
Самцы	**Контрольная (n=8)**	1,00 (0,50-1,50)[4]		
	ЛПС1-е сут (n=7)	2,00 (2,00-2,20)[5]		
	ЛПС 7-е сут (n=7)	1,75 (0,00-2,50)[6]		
Статистическая значимость различий (p)		0,0032[1-2] 0,2757[1-3] 0,0376[2-3]	0,0048[4-5] 0,6272[4-6] 0,0619[5-6]	0,4474[1-4] 0,2556[2-5] 0,4560[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

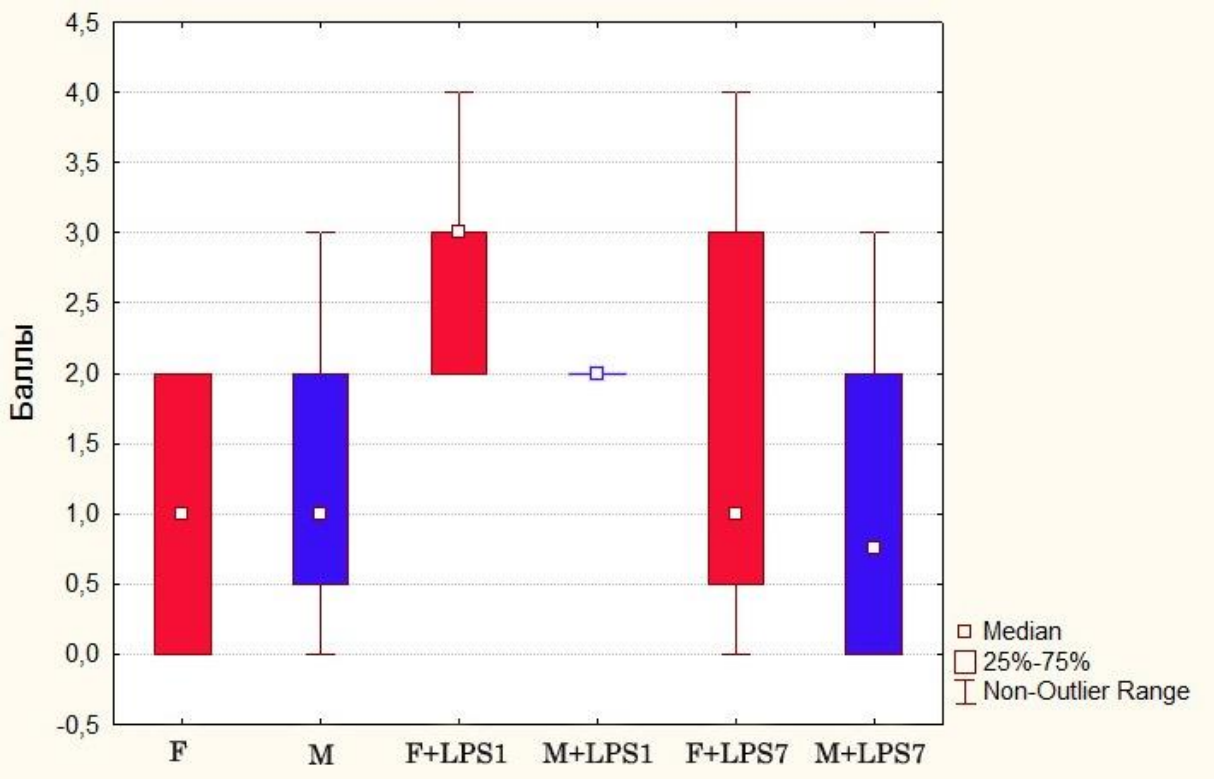


Рис. 5.3.3.3. Показатели патологических изменений в печени у половозрелых самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M), на 1-е (F+LPS1, M+LPS1) и 7-е (F+LPS7, M+LPS7) сутки после введения ЛПС

Сравнительная характеристика активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

В контрольных группах самок и самцов были выявлены половые различия активности индикаторных ферментов печени. Так у самок их показатели были достоверно выше, чем у самцов (табл. 5.3.3.4). На 1-е сут после введения ЛПС у самцов показатели активности АлАТ и АсАТ повышались по сравнению с контрольной группой, а у самок, наоборот, - снижались. На 7-е сут развития СВО у самок активность ферментов печени нормализовалась. У самцов в эти сроки показатели активности АлАТ и АсАТ повышались по сравнению как с контрольной, так и с группой на 1-е сут после введения ЛПС (табл. 5.3.3.4, рис. 5.3.3.4).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО по сравнению с половозрелыми самками, в сыворотке крови которых активность ферментов печени снижалась, у самцов было выявлено увеличение уровня активности АлАТ и АсАТ. На 7-е сут у самок наблюдалась нормализация уровня активности ферментов печени, а у самцов показатели активности АлАТ и АсАТ статистически значимо повышались.

Таблица 5.3.3.4

Активность ферментов печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л	
		АлАТ	АсАТ
Самки	Контрольная (n=10)	57 (54-92)[1]	143 (142-180)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=10)	20 (16-31)[2]	39 (39-68)[2]
	ЛПС 7-е сут (n=9)	47 (43-51)[3]	146 (136-151)[3]
Самцы	Контрольная (n=9)	38 (30-41)[4]	72 (61-76)[4]
	ЛПС 1-е сут (n=11)	53 (46-69)[5]	93 (77-116)[5]
	ЛПС 7-е сут (n=7)	93 (88-94)[6]	147 (146-159)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,02^{1-2}$ $0,07^{4-5}$ $0,02^{1-4}$ $0,11^{1-3}$ $0,009^{4-6}$ $0,006^{2-5}$ $0,006^{2-3}$ $0,009^{5-6}$ $0,009^{3-6}$	$0,02^{1-2}$ $0,03^{4-5}$ $0,02^{1-4}$ $0,8^{1-3}$ $0,009^{4-6}$ $0,006^{2-5}$ $0,006^{2-3}$ $0,009^{5-6}$ $0,67^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

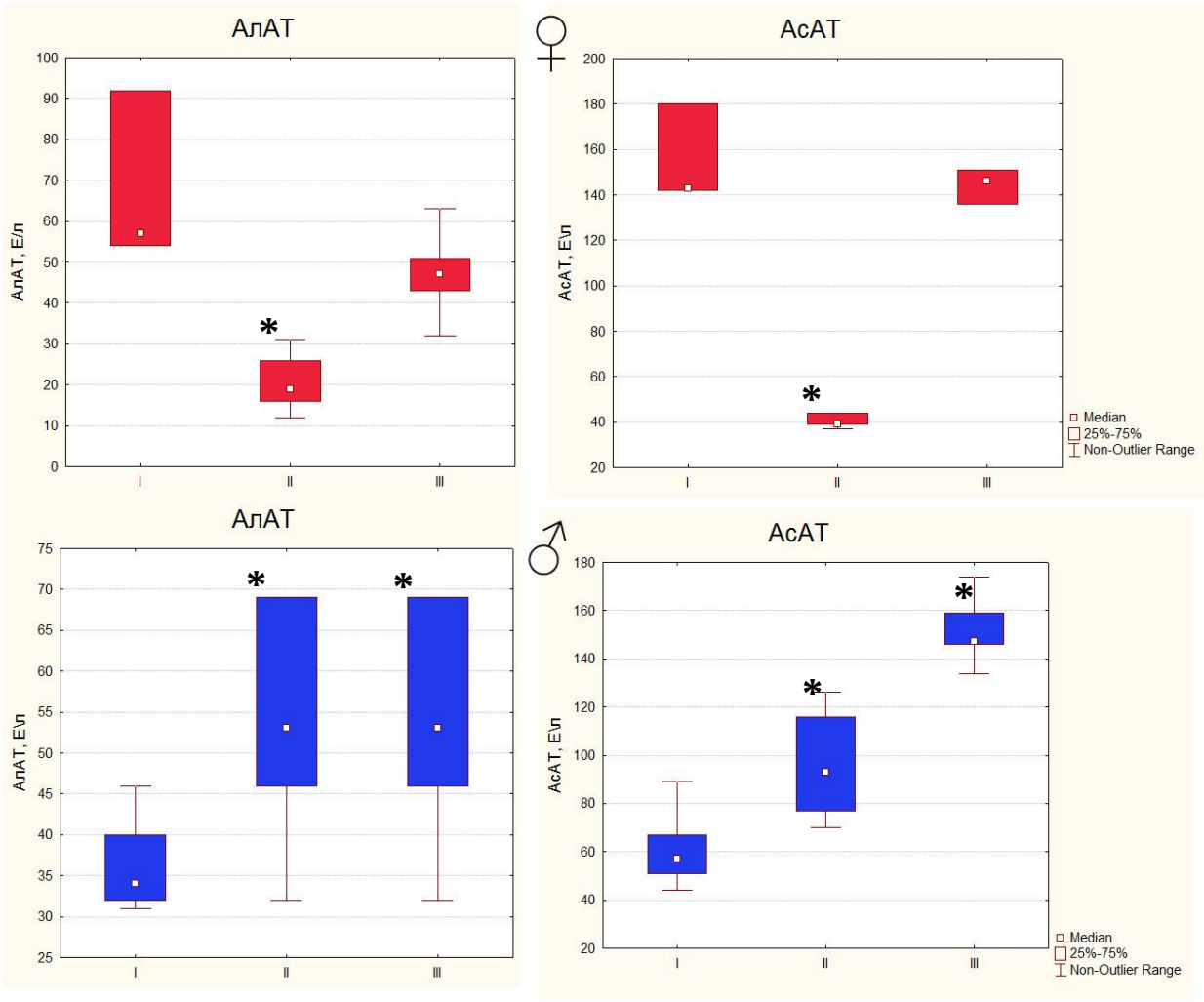


Рис. 5.3.3.4. Динамика показателей активности АлАТ и АсАТ у половозрелых самок (верхний ряд) и самцов (нижний ряд) крыс Вистар контрольной группы (I), на 1-е (II) и 7-е (III) сут после введения ЛПС. * - различия статистически значимы по сравнению с соответствующей контрольной группой. ♀ - самки, ♂ - самцы

Сравнительная характеристика уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самцов наблюдалось статистически значимое увеличение содержания эндотоксина, показатели которого нормализовались на 7-е сут эксперимента. Напротив, у самок введение ЛПС в фазу проэструса не привело к изменениям уровня эндотоксина, и его показатели не отличались от значений в контрольной группе как на 1-е, так и на 7-е сут после введения ЛПС (табл. 5.3.3.5, рис. 5.3.3.5).

В контрольной группе у самок содержание кортикостерона в сыворотке крови было статистически значимо выше, чем у самцов (табл. 5.3.3.5, рис. 5.3.3.5). На 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось увеличение уровня кортикостерона в сыворотке крови только у самок, показатели которого у них нормализовались к 7-м сут эксперимента (табл. 5.3.3.5, рис. 5.3.3.5). В сыворотке крови самцов как на 1-е, так и на 7-е сут после введения ЛПС содержание

кортикостерона статистически значимо не изменялось (табл. 5.3.3.5, рис. 5.3.3.5). В оба срока развития СВО концентрация кортикостерона в сыворотке крови у самок было статистически значимо выше, чем у самцов.

Таким образом, на 1-е сут развития СВО по сравнению с самками у самцов наблюдалось увеличение уровня эндотоксина, показатели которого на 7-е сут у самцов нормализовались. Через сутки после введения ЛПС у самок в сыворотке крови повышалась концентрация кортикостерона, содержание которого нормализовалось на 7-е сут эксперимента. Показатели содержания кортикостерона в сыворотке крови во всех исследуемых группах были выше у самок.

Таблица 5.3.3.5

Показатели уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=10)**	3,14 (2,85-3,19)[1*]	64,47 (54,6-74,4)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=10)	3,48 (3,06-5,33)[2]	109,8 (107,3-140,3)[2]
	ЛПС 7-е сут (n=9)	2,33 (1,69-3,36)[3]	71,22 (65,88-76,86)[3]
Самцы	**Контрольная (n=9)**	3,25 (2,95-3,81)[4]	37,88 (34,80-41,00)[4]
	ЛПС 1-е сут (n=11)	9,41 (7,94-10,80)[5]	25,95 (20,44-30,04)[5]
	ЛПС 7-е сут (n=7)	0,77 (0,65-1,00)[6]	35,24 (17,20-41,00)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}3408^{1\text{-}2}$ $0{,}1090^{1\text{-}3}$ $0{,}0357^{2\text{-}3}$ $0{,}0081^{4\text{-}5}$ $0{,}0095^{4\text{-}6}$ $0{,}0047^{5\text{-}6}$ $0{,}5604^{1\text{-}4}$ $0{,}0051^{2\text{-}5}$ $0{,}0030^{3\text{-}6}$	$0{,}0455^{1\text{-}2}$ $0{,}3613^{1\text{-}3}$ $0{,}0918^{2\text{-}3}$ $0{,}004^{4\text{-}5}$ $0{,}295^{4\text{-}6}$ $0{,}177^{5\text{-}6}$ $0{,}0404^{1\text{-}4}$ $0{,}0002^{2\text{-}5}$ $0{,}0012^{3\text{-}6}$

Условные обозначения * - номер группы наблюдения

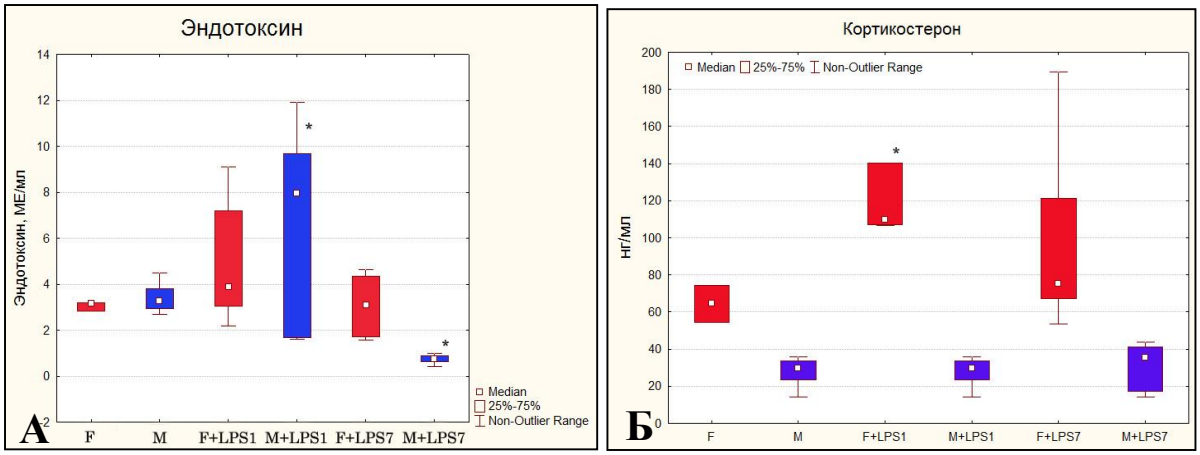


Рис. 5.3.3.5. Динамика уровня эндотоксина (А) и содержания кортикостерона (Б) в сыворотке крови у половозрелых самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F; M), на 1-е (F+LPS1; M+LPS1) и 7-е (F+LPS7; M+LPS7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - контрольной группой самок

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

При морфологическом исследовании в тимусе у самцов и самок опытной группы через сутки после введения ЛПС выявлялись признаки акцидентальной инволюции I–II стадий. В корковом веществе обнаружена картина «звездного неба», фрагменты ядер и макрофаги, фагоцитирующие гибнущие клетки. Границы между корковым и мозговым веществом были четкими. При морфометрической оценке изменений в тимусе у самок на 1-е сут развития СВО было обнаружено расширение коркового вещества, а у самцов статистически значимых различий объемной доли коркового вещества по сравнению с контрольной группой выявлено не было (табл. 5.3.3.6, рис. 5.3.3.6). У крыс обоего пола в этот срок наблюдалось расширение субкапсулярной зоны тимуса, которая была представлена 8–10 рядами лимфобластов.

На 7-е сут после введения ЛПС в тимусе у самцов и самок наблюдалось увеличение объемной доли коркового вещества, что характерно для акцидентальной инволюции I стадии (табл. 5.3.3.6, рис. 5.3.3.6). В этот срок у самцов наблюдалось расширение субкапсулярной зоны тимуса по сравнению с 1-ми сут эксперимента, а у самок – этот показатель не отличался от опытной группы на 1-е сут после введения ЛПС.

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у самцов по сравнению с самками выявлена акцидентальная инволюция более поздней стадии – II. На 7-е сут развития СВО у крыс обоего пола в тимусе обнаружена акцидентальная инволюция I стадии.

Таблица 5.3.3.6

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Пол	Группа наблюдения	Объемная доля, %	Ширина, мкм
		КВ	СКЗ
Самки	Контрольная (n=10)	49,64±0,97[1*]	34,55±0,59[1]
	ЛПС 1-е сут (n=15)	57,03±1,37[2]	44,99±1,60[2]
	ЛПС 7-е сут (n=10)	62,14±0,66[3]	43,26±1,17[3]
Самцы	Контрольная (n=11)	54,98±1,20[4]	25,28±1,32[4]
	ЛПС 1-е сут (n=15)	55,06±0,65[5]	39,74±0,72[5]
	ЛПС 7-е сут (n=10)	70,33±2,47[6]	53,86±3,62[6]
Статистическая значимость различий (p)		0,0043[1-2] 0,0009[1-3] 0,0101[2-3] 0,7913[4-5] 0,0027[4-6] 0,0045[5-6] 0,0109[1-4] 0,1102[2-5] 0,0446[3-6]	0,0045[1-2] 0,0045[1-3] 0,4062[2-3] 0,0112[4-5] 0,0143[4-6] 0,0025[5-6] 0,0447[1-4] 0,0192[2-5] 0,0491[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения; КВ – корковое вещество; СКЗ – субкапсулярная зона

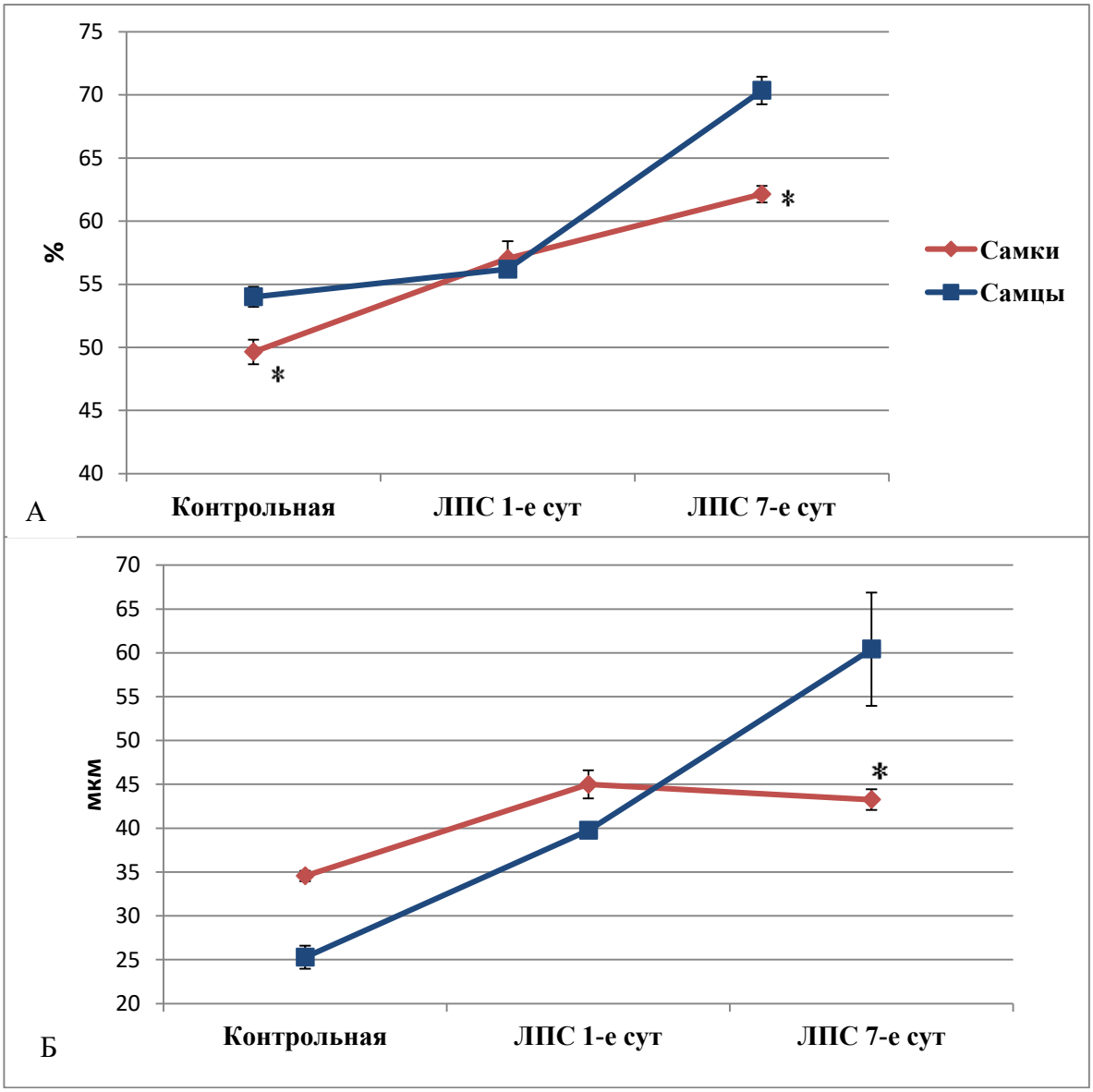


Рис. 5.3.3.6. Изменение объемной доли коркового вещества (А) и ширины субкапсулярной зоны (Б) тимуса у половозрелых самцов и самок контрольной группы, на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Значения представлены в виде m±M. * - различия статистически значимы между самками и самцами

Показатели относительного содержания апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе у половозрелых самок и самцов крыс Вистар увеличивалось по сравнению с соответствующими контрольными группами. Половых различий числа апоптотически гибнущих тимоцитов на 1-е сут развития СВО обнаружено не было (табл. 5.3.3.7).

Таблица 5.3.3.7

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^+$-лимфоцитов у половозрелых самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Все клетки тимуса	$CD3^+$-лимфоциты
Самки	**Контрольная группа (n=6)**	$1,3^{1*}$ (1,1-1,3)	$11,9^{1}$ (9,4-15,2)
	ЛПС 1-е сут (n=6)	$4,2^{2}$ (3,1-6,0)	$7,6^{2}$ (5,8-9,0)
Самцы	**Контрольная группа (n=6)**	$0,4^{3}$ (0,1-1,0)	$11,8^{3}$ (4,4-13,4)
	ЛПС 1-е сут (n=6)	$3,55^{4}$ (3,2-4,1)	$7,25^{4}$ (6,5-10,4)
Статистическая значимость различий (p)		$0,004^{1-2}$ $0,003^{3-4}$ $0,05^{1-3}$ $0,61^{2-4}$	$0,055^{1-2}$ $0,055^{3-4}$ $0,48^{1-3}$ $0,72^{2-4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика морфологических изменений в селезенке у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО в селезенке самок и самцов наблюдалось «опустошение» белой пульпы, представленной ПАЛМ и лимфоидными узелками. В лимфоидных узелках выявлялись крупные герминативные центры, представленные лимфобластами и единичными митотически делящимися клетками, фрагментами ядер. Маргинальные зоны лимфоидных узелков были уже по сравнению с контрольной группой. По данным морфометрической оценки функциональных зон селезенки на 1-е сут после введения ЛПС у крыс Вистар обоего пола обнаруживалось уменьшение объемной плотности белой пульпы за счет снижения доли ПАЛМ-зоны (табл. 5.3.3.8). Показатель объемной доли герминативных центров лимфоидных узелков селезенки у самцов и самок на 1-е сут после введения ЛПС повышался, а маргинальной зоны – снижался (табл. 5.3.3.8).

В селезенке у самцов и самок на 7-е сут после введения ЛПС наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры органа. У самцов и самок на 7-е сут после введения ЛПС обнаружено увеличение объемной доли белой пульпы селезенки за счет гиперплазии ПАЛМ-

зоны и лимфоидных узелков, а также сужение герминативных центров лимфоидных узелков. Показатели маргинальной зоны у самок в эти сроки возрастали, а у самцов – не достигали контрольных значений и не отличались от 1-х сут после введения ЛПС (табл. 5.3.3.8).

Динамика изменения всех исследуемых морфометрических показателей селезенки у половозрелых самцов и самок на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС была сходной (рис. 5.3.3.7). Однако в селезенке самок на 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось более выраженное «опустошение» белой пульпы, сужение маргинальной зоны и расширение светлых центров лимфоидных узелков.

Таким образом, у самцов и самок при введении ЛПС наблюдаются сходные изменения функциональных зон селезенки. На 1-е сут развития СВО у особей обоего пола выявлено «опустошение» белой пульпы селезенки за счет снижения объемной доли ПАЛМ-зоны, расширение светлых центров лимфоидных узелков и сужение их маргинальной зоны. На 7-е сут после введения ЛПС у самцов и самок наблюдается гиперплазия белой пульпы селезенки с увеличением объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков по сравнению с 1-ми сутками эксперимента. Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков селезенки у самцов и самок нормализуется. В эти сроки показатели объемной доли маргинальной зоны у самок не отличаются от контрольных значений, а у самцов не изменяются по сравнению с 1-ми сутками после введения ЛПС.

Таблица 5.3.3.8

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения		Объемная доля функциональных зон селезенки, %			Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	Объемная доля функциональных зон ЛУз селезенки, %	
		ПАЛМ-зона	ЛУз	БП		МЗ	ГЦ
Самки	Контрольная (n=10)	$28,24±0,69^{1*}$	$15,45±0,43^{1}$	$43,69±0,81^{1}$	$0,75±0,03^{1}$	$44,86±1,02^{1}$	$22,40±0,84^{1}$
	ЛПС 1-е сут (n=15)	$20,94±1,71^{2}$	$14,74±1,51^{2}$	$35,71±3,12^{2}$	$0,61±0,09^{2}$	$31,91±2,78^{2}$	$46,02±6,27^{2}$
	ЛПС 7-е сут (n=9)	$30,13±0,28^{3}$	$18,83±0,36^{3}$	$48,95±0,45^{3}$	$0,98±0,01^{3}$	$42,70±0,59^{3}$	$16,70±0,61^{3}$
Самцы	Контрольная (n=10)	$27,42±1,65^{4}$	$14,82±1,62^{4}$	$42,24±1,83^{4}$	$0,78±0,03^{4}$	$44,70±1,92^{4}$	$22,18±1,93^{4}$
	ЛПС 1-е сут (n=15)	$24,08±0,35^{5}$	$16,99±0,33^{5}$	$40,06±0,55^{5}$	$0,71±0,03^{5}$	$37,68±0,55^{5}$	$30,72±0,32^{5}$
	ЛПС 7-е сут (n=9)	$30,28±0,53^{6}$	$20,20±0,47^{6}$	$50,48±0,74^{6}$	$1,03±0,02^{6}$	$38,88±1,24^{6}$	$19,54±0,80^{6}$
Статистическая значимость различий (p)		$0,0078^{1-2}$ $0,0008^{1-3}$ $0,0002^{2-3}$ $0,0008^{4-5}$ $0,0077^{4-6}$ $0,0038^{5-6}$ $0,8852^{1-4}$ $0,3067^{2-5}$ $0,7590^{3-6}$	$0,7723^{1-2}$ $0,0001^{1-3}$ $0,0165^{2-3}$ $0,2330^{4-5}$ $0,0041^{4-6}$ $0,0058^{5-6}$ $0,2291^{1-4}$ $0,1693^{2-5}$ $0,0724^{3-6}$	$0,2243^{1-2}$ $0,0001^{1-3}$ $0,0003^{2-3}$ $0,0369^{4-5}$ $0,0027^{4-6}$ $0,0045^{5-6}$ $0,3864^{1-4}$ $0,3067^{2-5}$ $0,0799^{3-6}$	$0,3545^{1-2}$ $0,0001^{1-3}$ $0,0003^{2-3}$ $0,0457^{4-5}$ $0,0027^{4-6}$ $0,0046^{5-6}$ $0,4414^{1-4}$ $0,3413^{2-5}$ $0,1064^{3-6}$	$0,0026^{1-2}$ $0,0528^{1-3}$ $0,0004^{2-3}$ $0,0002^{4-5}$ $0,0388^{4-6}$ $0,4064^{5-6}$ $0,9233^{1-4}$ $0,1127^{2-5}$ $0,2210^{3-6}$	$0,0206^{1-2}$ $0,0003^{1-3}$ $0,0017^{2-3}$ $0,0001^{4-5}$ $0,2571^{4-6}$ $0,0010^{5-6}$ $0,9233^{1-4}$ $0,0101^{2-5}$ $0,0289^{3-6}$

Примечания. ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

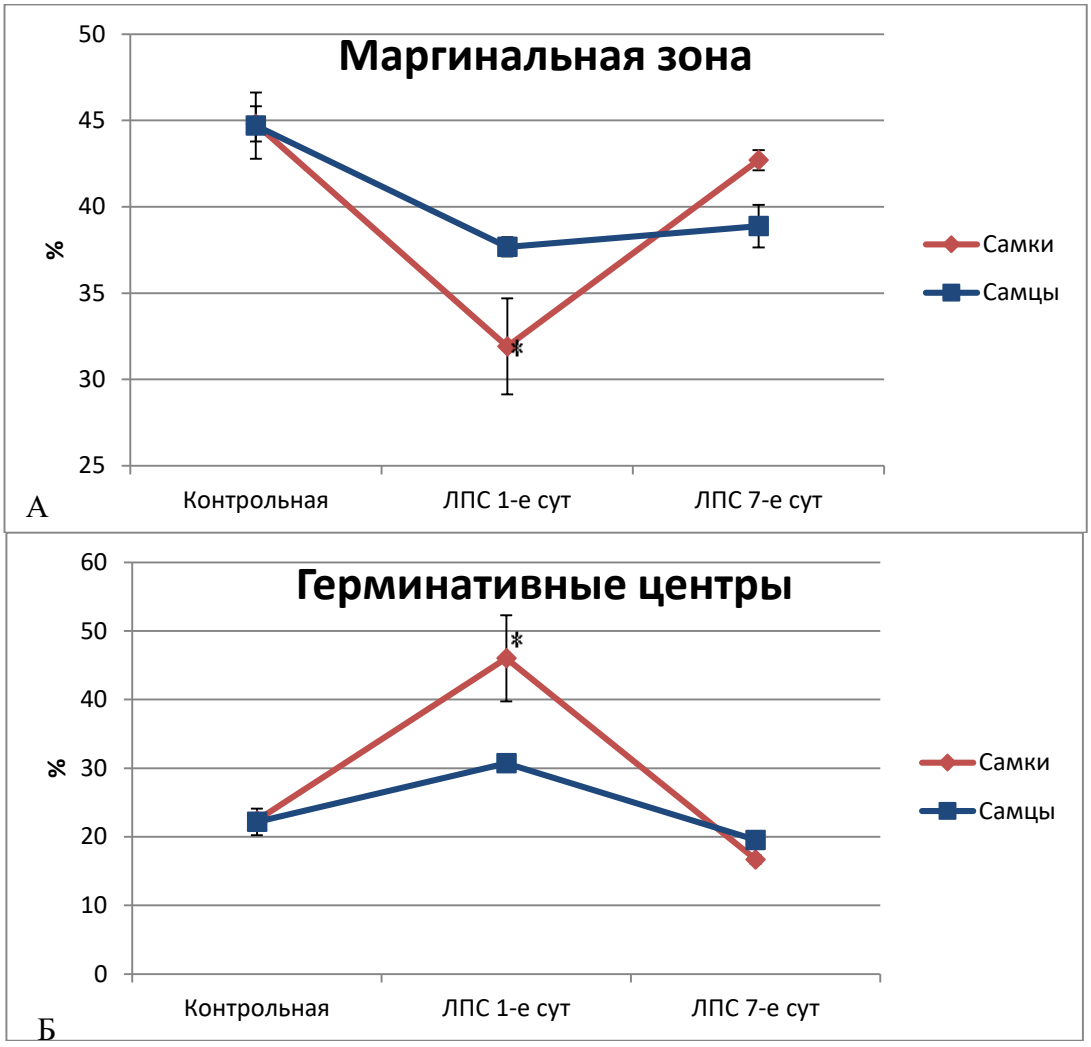


Рис. 5.3.3.7. Изменение объемной доли маргинальной зоны (А) и светлых центров (Б) лимфоидных узелков селезенки у самцов и самок контрольной группы, на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Значения представлены в виде M ±m. * - различия статистически значимы между самками самцами

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО содержание маркера активации клеточного типа иммунного ответа – неоптерина, в сыворотке крови у самцов повышалось, а у самок, наоборот, снижалось. В этот срок в сыворотке крови у половозрелых крыс Вистар обоего пола наблюдалось снижение концентрации TGF-β (табл. 5.3.3.9).

На 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов наблюдалось разнонаправленное изменение уровня секреции клетками селезенки Тх1-цитокина ИЛ-2: у самцов уровень продукции ИЛ-2 повышался, а у самок, снижался (табл. 5.3.3.9). У самцов выявлено статистически значимое снижение уровня секреции клетками селезенки Тх2-цитокина ИЛ-4 и регуляторного ИЛ-12 (табл. 5.3.3.9). У самок в эти сроки продукция ИЛ-12 также, как и у самцов, уменьшалась, а уровень продукции ИЛ-4 не отличался от контрольных значений. Однако в ранние сроки развития СВО у самок снижалась секреция ИЛ-6 и ФНО-α, тогда как у самцов изменений показателей продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО-α выявлено не было (табл. 5.3.3.9).

На 7-е сут после введения ЛПС содержание неоптерина в сыворотке крови у самцов нормализовалось, а у самок – оставалось ниже значений в контрольной группе (табл. 5.3.3.9).

На 7-е сут развития СВО у самцов уровень продукции иммунорегуляторного ИЛ-12 нормализовался, показатель продукции ИЛ-2 был выше, чем в контрольной группе, а ИЛ-4 – ниже. Уровень продукции провоспалительного ИЛ-6 повышался по сравнению с контрольной группой и на 1-е сут после введения ЛПС, а ФНО-α и ИФН-γ – снижался (табл. 5.3.3.9). У самок в эти сроки продукция ИЛ-2, ИЛ-12 и ИЛ-4 не отличалась от контрольных значений (табл. 5.3.3.9). Показатели уровня продукции ИФН-γ и ФНО-α были статистически значимо ниже значений в контрольной группе и на 1-е сут после введения ЛПС (табл. 5.3.3.9).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самцов активируется клеточный тип иммунного ответа, о чем свидетельствует повышение уровня продукции ИЛ-2 и содержания неоптерина в сыворотке крови, что сопровождается снижением продукции ИЛ-4 и ИЛ-12. У самок в эти сроки, наоборот, в сыворотке крови наблюдается снижение концентрации неоптерина и уровня продукции Тх1-цитокина – ИЛ-2 и провоспалительных ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-6 клетками селезенки.

Таблица 5.3.3.9

Концентрация TGF-β и неоптерина в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол		Содержание в сыворотке крови		Содержание в культуральной жидкости клеток селезенки, пг/мл					
		TGF-β (нг/мл)	Неоптерин (нмоль/л)	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-12	ИФН-γ	ФНО-α
Самки	Контрольная (n=8)	40,54[1] (33,78-42,65)	6,04[1] (5,71-7,41)	144,45[1] (89,4-152,9)	15,50[1] (11,9-28,6)	7500[1] (5500-8100)	62,60[1] (16,5-93,2)	894[1] (532-1340)	314,4[1] (145,6-452,3)
	ЛПС 1-е сут (n=8)	22,99[2] (13,04-25,74)	3,10[2] (1,66-3,34)	47,26[2] (27,57-97,27)	9,07[2] (6,11-25,12)	2758[2] (2239-3445)	0,00[2] (0-5,50)	8,95[2] (0-51,9)	79,28[2] (75,13-92,28)
	ЛПС 7-е сут (n=7)	-	2,56[3] (1,98-3,26)	74,83[3] (31,5-102,4)	8,74[3] (3,44-9,78)	7450[3] (7250-8950)	0,00[3] (0-36,0)	26,80[3] (8,94-35,8)	18,40[3] (0-47,53)
Самцы	Контрольная (n=8)	38,43[3] (35,47-46,03)	0,84[4] (0,17-1,14)	152,03[4] (103,8-167,3)	29,9[4] (23,4-39,1)	547[4] (438-798)	38,40[4] (22,9-55,4)	44,70[4] (40,2-58,1)	37,65[4] (33,35-43,03)
	ЛПС 1-е сут (n=8)	20,47[4] (13,04-41,80)	1,53[5] (1,39-1,94)	209,80[5] (194,2-548,8)	5,36[5] (4,57-9,02)	326[5] (244-649)	0,00[5] (0-0)	31,30[5] (26,8-45)	24,53[5] (12,27-55,2)
	ЛПС 7-е сут (n=8)	-	1,03[6] (0,78-1,49)	360,20[6] (239,4-430,1)	3,32[6] (2,10-3,62)	1000[6] (976-1112)	29,70[6] (12,8-33,6)	26,80[6] (13,7-44,7)	12,27[6] (0-26,07)
Статистическая значимость различий (p)		0,0005[1-2]	0,0143[1-2] 0,0007[1-3] 0,6831[2-3]	0,0581[1-2] 0,1441[1-3] 0,6242[2-3]	0,2864[1-2] 0,0152[1-3] 0,8501[2-3]	0,0275[1-2] 0,6847[1-3] 0,0140[2-3]	0,0298[1-2] 0,0409[1-3] 0,7768[2-3]	0,0015[1-2] 0,0057[1-3] 0,4497[2-3]	0,0167[1-2] 0,0229[1-3] 0,0167[2-3]
		0,0451[3-4]	0,0424[4-5] 0,3717[4-6] 0,0639[5-6]	0,0011[4-5] 0,0771[4-6] 1,000[5-6]	0,0045[4-5] 0,0090[4-6] 0,0185[5-6]	0,0760[4-5] 0,0090[4-6] 0,0034[5-6]	0,0209[4-5] 0,3865[4-6] 0,0455[5-6]	0,0740[4-5] 0,0424[4-6] 0,3379[5-6]	0,0881[4-5] 0,0002[4-6] 0,1797[5-6]
		0,3822[1-3] 0,4215[2-4]	0,0034[1-4] 0,2100[2-5] 0,0026[5-6]	0,3017[1-4] 0,0143[2-5] 0,0143[3-6]	0,3613[1-4] 0,2986[2-5] 0,0283[3-6]	0,0013[1-4] 0,0055[2-5] 0,0012[3-6]	0,5708[1-4] 0,5637[2-5] 0,5083[3-6]	0,0230[1-4] 0,2568[2-5] 0,6547[3-6]	0,0224[1-4] 0,0253[2-5] 0,7983[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 7-е сут после введения ЛПС у самок и самцов динамика изменений продукции цитокинов различалась: у самок уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12 и ИЛ-6 не отличался от значений в контрольной группе, а показатели ФНО-α и ИФН-γ оставались сниженными. Тогда как у самцов уровень ИЛ-2 и ИЛ-4 не отличается от более раннего срока эксперимента, продукция ИФН-γ и ФНО-α снижается, а ИЛ-6, наоборот, – повышается.

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в периферической крови наблюдалось повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 5.3.3.10). У самцов в эти сроки после введения ЛПС выявлено снижение абсолютного числа Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов, тогда как у самок данные показатели не отличались от значений в контрольной группе (табл. 5.3.3.10).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО в периферической крови у самцов по сравнению с самками наблюдается снижение абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов, что отражает более выраженные процессы миграции и гибели лимфоцитов у них.

Таблица 5.3.3.10

Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Относительное количество, %	Самки		Самцы		p
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=6)	
Т-лимфоциты (CD3+)	47,8[1*] (42,3-56,4)	42,5[2] (29,7-47,5)	53,00[1*] (45,5-63,0)	43,7[2] (38,1-53,2)	
Т-хелперы (CD3+CD4+)	47,1[3] (29,0-54,9)	**56,2[4]** (47,9-59,1)	40,65[3] (33,7-45,0)	44,65[4] (34,6-49,5)	0,045[4-4]
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	52,0[5] (44,0-70,8)	**40,8[6]** (38,5-51,3)	59,9[5] (51,8-71,4)	**47,7[6]** (46,5-63,6)	
В-лимфоциты (CD45+)	15,3[7] (12,5-19,3)	16,8[8] (12,5-23,3)	19,5[7] (15,5-21,7)	25,75[8] (19,1-29,1)	
NK-клетки (CD314+)	4,9[9] (3,0-6,1)	**22,4[10]** (18,9-27,5)	5,55[9] (2,9-9,6)	**30,8**[10] (20,9-40,8)	
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	7,8[11] (5,0-11,2)	6,4[12] (6,0-9,4)	3,3[11] (2,4-4,7)	3,45[12] (2,0-4,6)	0,002[11-11] 0,001[12-12]
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	3,8[13] (3,4-4,6)	4,2[14] (2,3-4,3)	3,7[13] (3,6-4,8)	4,2[14] (3,3-5,2)	
Статистически значимые различия, значения	0,074[1-2] 0,036[3-4] 0,025[5-6] 0,595[7-8]	0,0002[9-10] 0,79[11-12] 0,51[13-14]	0,0002[9-10] 0,79[11-12] 0,51[13-14]	0,12[1-2] 0,51[3-4] 0,025[5-6] 0,38[7-8]	

Абсолютное количество, млн/мл	Самки		Самцы		p
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=6)	
Т-лимфоциты (CD3+)	4,9[1] (3,4-7,4)	3,5[2] (2,9-4,7)	9,7[1] (6,9-11,3)	**5,6[2]** (2,8-6,9)	0,004[1-1]
Т-хелперы (CD3+CD4+)	1,8[3] (1,6-2,7)	1,7[4] (1,5-2,5)	3,9[3] (3,1-4,2)	**2,2[4]** (1,2-2,4)	0,004[3-3]
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	2,4[5] (1,5-5,6)	**1,7[6]** (1,1-1,9)	6,3[5] (4,4-8,2)	**2,7[6]** (1,3-4,4)	**0,006[5-5]**
В-лимфоциты (CD45+)	1,6[7] (1,1-2,1)	1,4[8] (1,2-3,1)	3,7[7] (2,6-4,3)	3,7[8] (1,4-4,3)	0,003[7-7]
NK-клетки (CD314+)	0,5[9] (0,2-0,9)	**2,0[10]** (1,6-2,9)	0,8[9] (0,5-2,2)	**2,9[10]** (2,4-4,5)	
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	0,01[11] (0,006-0,018)	0,01[12] (0,006-0,02)	0,02[11] (0,01-0,03)	0,01[12] (0,006-0,01)	0,016[11-11]
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	0,006[13] (0,004-0,008)	0,006[14] (0,003-0,009)	0,03[13] (0,017-0,04)	**0,014[14]** (0,006-0,02)	0,0004[13-13]
Статистически значимые различия, значения	0,21[1-2] 0,67[3-4] 0,02[5-6] 0,93[7-8]	0,001[9-10] 0,67[11-12] 0,79[13-14]	0,03[1-2] 0,009[3-4] 0,03[5-6] 0,74[7-8]	0,007[9-10] 0,01[11-12] 0,02[13-14]	

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Заключение

На 1-е сут после введения ЛПС по сравнению с самками у самцов выявляется более выраженная воспалительная реакция в легких, о чем свидетельствует более высокое число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках у самцов по сравнению с самками. В эти сроки у самцов определяется увеличение показателей активности ферментов печени – АлАТ и АсАТ, что характеризует более выраженные альтеративные изменения в печени по сравнению с самками. На фоне более выраженных воспалительных изменений в печени и легких у самцов наблюдается увеличение уровня эндотоксина в сыворотки крови, тогда как содержание кортикостерона, оказывающего противовоспалительное действие, не изменяется. У самок, напротив, содержание эндотоксина остается на уровне контрольной группы, при этом концентрация кортикостерона статистически значимо увеличивается (табл. 12).

На 1-е сут развития СВО у самок в тимусе выявляется акцидентальная инволюция I стадии, характеризующаяся расширением коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны. Тогда как у самцов акцидентальная инволюция более выражена, наблюдается картина «звездного неба», при этом субкапсулярная зона расширяется, а объемная доля коркового вещества тимуса не изменяется по сравнению с контрольной группой. Акцидентальная инволюция тимуса у самок и самцов сопровождается повышением числа апоптотически гибнущих тимоцитов. В селезенке у самцов и самок в эти сроки наблюдается «опустошение» белой пульпы за счет снижения объемной доли ПАЛМ-зоны. Герминативные центры лимфоидных узелков у самцов и самок расширяются, а маргинальная зона суживается по сравнению с контрольными группами, причем эти изменения были более выражены у самок, чем у самцов.

На 1-е сут после введения ЛПС у самцов наблюдается поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу, о чем свидетельствует увеличение содержания неоптерина в сыворотке крови и продукции клетками селезенки Тх1-цитокина – ИЛ-2. У самок, напротив, уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-12 и концентрация неоптерина снижаются. В периферической крови у самцов и самок в этот срок развития СВО выявлено повышение числа NK-клеток и снижение цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако у самцов также наблюдается уменьшение абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов, тогда как у самок эти показатели остаются без изменений.

На 7-е сут после введения ЛПС у самок и самцов наблюдается восстановление нормальной морфологической структуры органов-мишеней: уменьшается число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, дистрофические изменения в печени минимально выражены. Показатели активности АлАТ и АсАТ у самок нормализуются, а у самцов, наоборот,

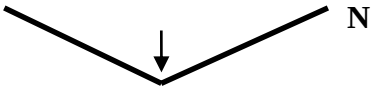
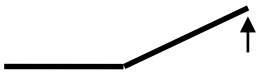
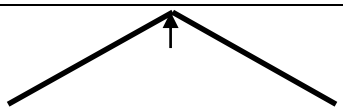
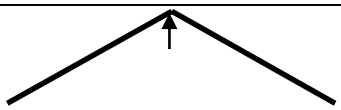
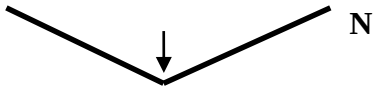
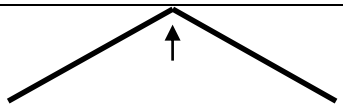
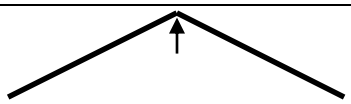
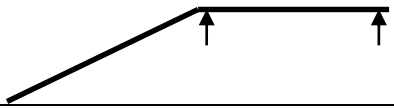
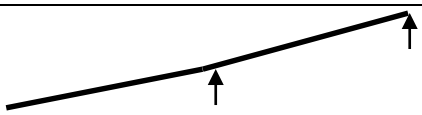
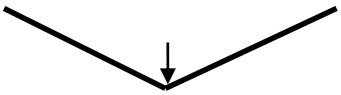
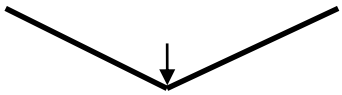
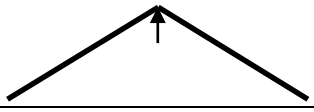
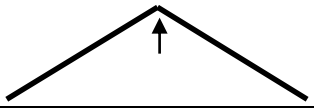
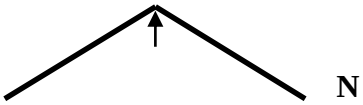
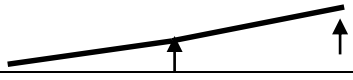
продолжают увеличиваться. В эти сроки у самцов нормализуется уровень эндотоксина, а у самок – кортикостерона.

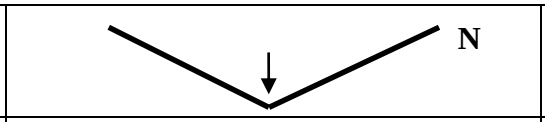
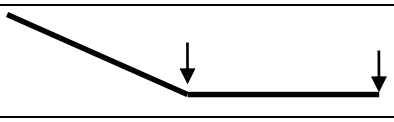
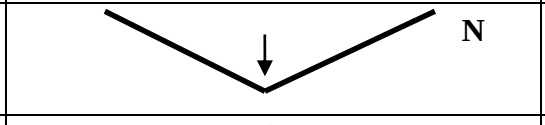
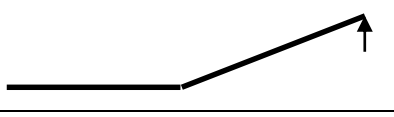
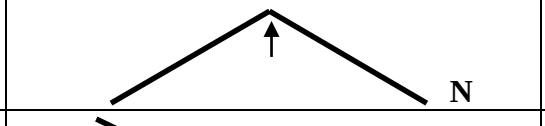
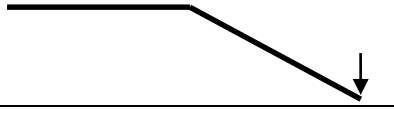
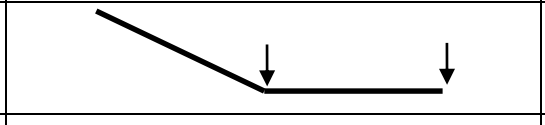
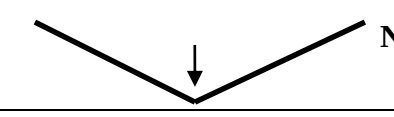
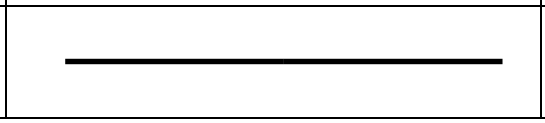
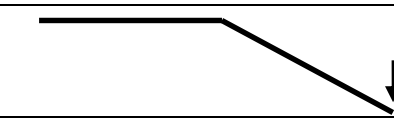
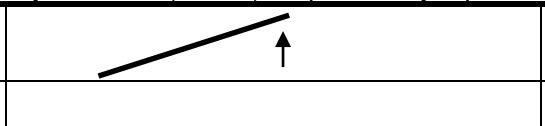
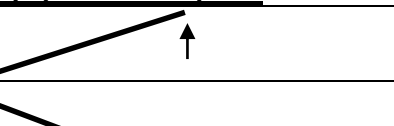
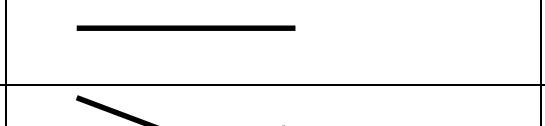
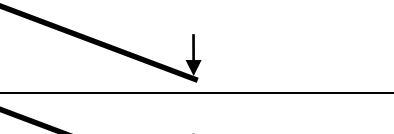
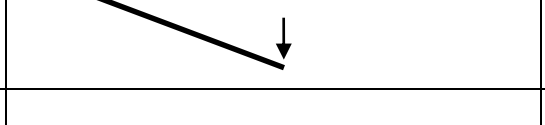
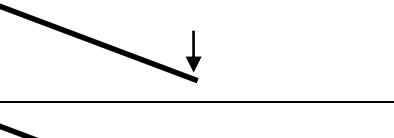
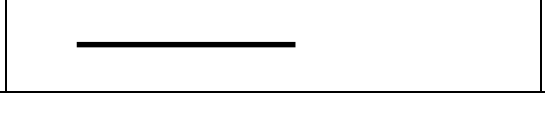
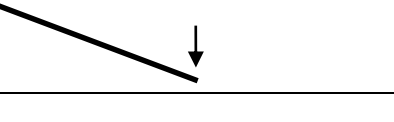
На 7-е сут после введения ЛПС в тимусе самцов и самок наблюдалось расширение коркового вещества по сравнению с 1-ми сутками эксперимента. Ширина субкапсулярной зону увеличивается только у самцов, а у самок не изменяется. В эти сроки у самцов и самок наблюдается увеличение объемной доли белой пульпы селезенки, что проявляется в увеличении объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков по сравнению с 1-ми сутками эксперимента. Размеры светлых центров лимфоидных узелков селезенки у самцов и самок нормализуются. В эти сроки показатели относительной доли маргинальной зоны у самок не отличаются от контрольных значений, а у самцов не изменяются по сравнению с 1-ми сутками после введения ЛПС.

По данным цитокинового профиля у самцов и самок на 7-е сут после введения ЛПС в культуре клеток селезенки наблюдается нормализация содержания ИЛ-12 и снижение – ИЛ-4. У самцов поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу сохраняется до 7-х сут развития СВО, о чем свидетельствует высокий уровень продукции ИЛ-2 и низкий – ИЛ-4. В эти сроки у них снижается продукция провоспалительного ФНО-α, однако повышается содержание другого провоспалительного цитокина – ИЛ-6, одной из функций которого является активация гуморального звена иммунного ответа. У самок на фоне нормализации продукции цитокинов клетками селезенки, в сыворотке крови содержание неоптерина остается ниже, чем в контрольной группе.

Таблица 5.3.3.11

Схема динамики изменений содержания стероидных гормонов, показателей выраженности СВО у самок и самцов крыс Вистар после введения ЛПС. Приведены статистически значимые данные по сравнению с контрольной группой

Пол	Самки			Самцы		
Параметры	**КГ**	**1-е сут ЛПС**	**7-е сут ЛПС**	**КГ**	**1-е сут ЛПС**	**7-е сут ЛПС**
Уровень стероидных половых гормонов и эндотоксина						
Эстрадиол						
Прогестерон						
Тестостерон Кортикостерон						
Эндотоксин						
Морфофункциональное состояние органов-мишеней и активность ферментов печени						
Печень Число НФ в м/а п-х легких						
АлАТи АсАТ						
Морфофункциональное состояние тимуса						
Объемная доля КВ						
Ширина СКЗ						
Апоптоз тимоцитов						
Морфофункциональное состояние селезенки						
Объемная доля ПАЛМ МЗ ЛУз						
Объемная доля ГЦ ЛУз						
Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки и в сыворотке крови						
Неоптерин в сыворотке крови						
ИЛ-2						

ИЛ-4		
ИЛ-6		
ФНО-α		
ИЛ-12		
ИФН-γ		
Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови		
NK-клетки		
Т-хелперы		
Т-цитотокси-ческие		
Т-регулятор-ные		

Оценка информативности статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение низкой дозы ЛПС половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

На 1-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг количество статистически значимо изменяющихся показателей составило 23 у самок и 21 у самцов, а на 7-е – 13 и 16, соответственно. Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей было проведено вычисление информативности каждого признака по формуле Кульбака (табл. 5.3.3.12, 5.3.3.13). В каждой группе, для которой были получены значения информативности, были отобраны первые пять показателей, показатели информативности которых были максимальными (табл. 5.3.3.12, 5.3.3.13). На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС у самок выявлена максимальная диагностическая значимость следующих параметров: содержания апоптотически гибнущих тимоцитов в культуре клеток тимуса, концентрации эстрадиола, уровня активности АсАТ в сыворотке крови, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и содержания общего тестостерона в крови. У самцов наиболее информативными показателями оказались: уровень продукции ИЛ-12 КонА активированными клетками селезенки, содержание тестостерона, уровень эндотоксина в сыворотке крови, число нейтрофилов в межальвеолярных

перегородках легких и объемная доля герминативных центров в лимфоидных узелках селезенки (табл. 5.3.3.12, рис. 5.3.3.8).

На 7-е сут после введения ЛПС у самок максимальная диагностическая значимость была выявлена для следующих параметров: содержания прогестерона в сыворотке крови, объемной доли коркового вещества тимуса и ширины его субкапсулярной зоны, концентрации неоптерина в крови и объемной доли белой пульпы селезенки (табл. 5.3.3.13, рис. 5.3.3.8). На 7-е сут после введения ЛПС у самцов высоко информативными были показатели уровня продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного ИЛ-6 клетками селезенки, ширина субкапсулярной зоны тимуса, объемная доля белой пульпы селезенки, а также содержание тестостерона в сыворотке крови (табл. 5.3.3.13, рис. 5.3.3.8). Таким образом, на 7-е сут развития СВО у самок наиболее значимыми в механизмах развития СВО были иммунологические нарушения – изменения структурно-функциональных зон тимуса и селезенки, а также содержания прогестерона и неоптерина в сыворотке крови. На 7-е сут после введения ЛПС у самцов среди иммунологических изменений наибольшую патогенетическую значимость имеет снижение уровня продукции ИЛ-4 и ИЛ-6 клетками культуры селезенки, расширение субкапсулярной зоны тимуса и гиперплазия белой пульпы селезенки наряду с гормональными изменениями - снижением концентрации тестостерона в сыворотке крови.

Таблица 5.3.3.12

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей через сутки после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

Пол					
Самки			Самцы		
Параметр	Изменения по отношению к контрольной группе	Информа-тивность	Параметр	Изменения по отношению к контрольной группе	Информа-тивность
Апоптоз тимоцитов	**↑ в 3.2**	**1062**	**ИЛ-12**	**↓ в 384**	**20848853**
Эстрадиол	**↓ в 1.6**	**141,9**	**Тестостерон**	**↓ в 56.5**	**9029,96**
АсАТ	**↓ в 2.9**	**125**	**Эндотоксин**	**↑ в 2.9**	**878**
НФ в легких	**↑ в 3.6**	**109**	**НФ в легких**	**↑ в 7.4**	**660**
Тестостерон	**↑ в 5.8**	**85,4**	**%ГЦ**	**↑ в 1.4**	**156,9**
%ГЦ селезенки	↑ в 2.1	66,7	Т-цитотокси-ческие ЛФ	↓ в 1.3	138
Кортикостерон	↑ в 1.7	66,6	ИЛ-4	↓ в 5.6	124,7
АлАТ	↓ в 3.7	64	НК	↑ в 5.5	81,5
НК	↑ в 4.5	61,5	Апоптоз тимоцитов	↑ в 9	61,5
СКЗ тимуса	↑ в 1.3	35,2	ИЛ-2	↑ в 1.4	46,11
TGF-β	↓ в 1.8	23,9	%МЗ селезенки	↓ в 1.2	41,1
ФНО-α	↑ в 2.5	18,2	СКЗ тимуса	↑ в 1.6	38,9
Неоптерин	↓ в 2	16,5	Баллы печень	↑ в 2	24,4
ИЛ-6	↓ в 2.7	16,2	АлАТ	↑ в 1.4	14
%МЗ селезенки	↓ в 1.4	13,1	%ПАЛМ	↓ в 1.1	7,3
%ПАЛМ	↓ в 1.4	11,1	АсАТ	↑ в 1.3	7
Баллы печень	↑ в 2	10,3	Неоптерин	↑ в 2	6,3
%БП селезенки	↓ в 1.3	9,9	TGF-β	↓ в 1.9	4,3
ИЛ-2	↓ в 3	9,1	Т-регуляторные ЛФ	↓ в 2	1,88
%КВ тимуса	↑ в 1.2	7,5	%БП селезенки	↓ в 1.1	1,4
ИЛ-12	↓ в 13	5,4	Т-хелперы	↓ в 1.8	0,39
Т-цитотокси-ческие ЛФ	↓ в 1.3	2,16			
Прогестерон	↑ в 4.7	0,99			

Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

Таблица 5.3.3.13

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 7-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

Пол					
Самки			Самцы		
Параметр	Изменения по отношению к контрольной группе	Информа-тивность	Параметр	Изменения по отношению к контрольной группе	Информа-тивность
Прогестерон	**↑ в 2**	**66**	**ИЛ-4**	**↓ в 9**	**472,6**
СКЗ	**↑ в 1.2**	**49,9**	**СКЗ**	**↑ в 2,1**	**232,6**
%КВ	**↑ в 1.3**	**46,7**	**ИЛ-6**	**↓ в 1,8**	**165,6**
Неоптерин	**↓ в 2.3**	**43,2**	**Тестостерон**	**↓ в 6,6**	**145,4**
%БП	**↓ в 1.4**	**37,5**	**%БП**	**↑ в 1,2**	**117,2**
НФ в легких	↑ в 1.7	27,6	ИЛ-2	↑ в 2,4	80,5
Тестостерон	↓ в 2.4	22	%ПАЛМ	↑ в 1,1	50,1
ИЛ-4	↓ в 2	21,2	НФ в легких	↑ в 2,4	38,3
%ПАЛМ	↓ в 1.7	15,2	АсАТ	↑ в 1,3	37,5
%ГЦ	↓ в 1.4	12,1	%КВ	↑ в 1,3	28,9
%МЗ	↑ в 1.2	9,1	Эндотоксин	↓ в 5,5	23,8
ИЛ-12	↓ в 626	5,4	Эстрадиол	↑ в 1,3	17,5
Неоптерин	↑ в 2	66	ФНО-α	↓ в 2,8	14,2
			ИФН-γ	↓ в 1,9	6,1
			Кортикостерон	↑ в 2	2,6
			%МЗ	↑ в 1,1	1,54

Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

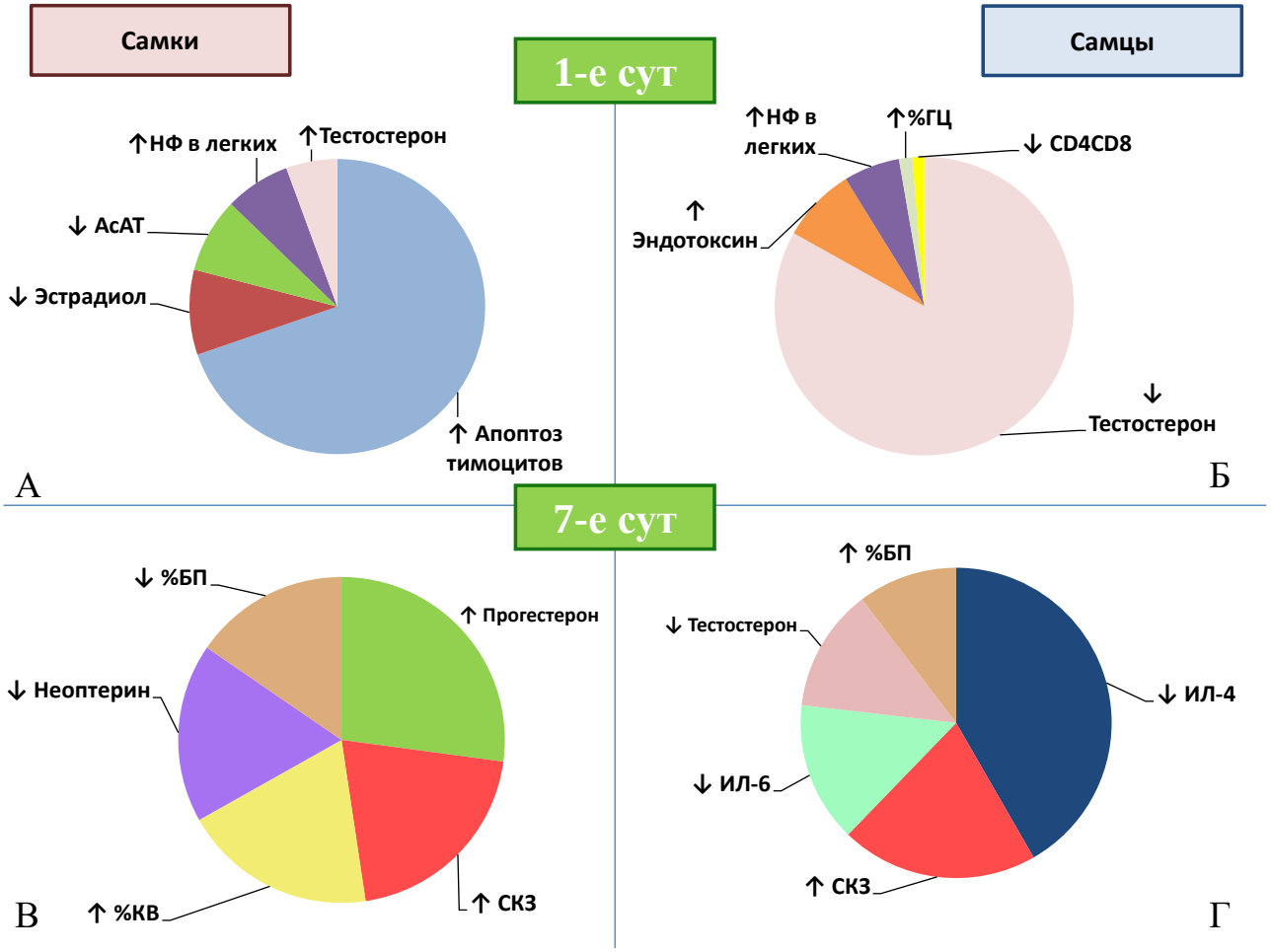


Рис. 5.3.3.8. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е (А, Б) и 7-е (В, Г) сутки после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг самкам (А, В) и самцам крыс Вистар (Б, Г). Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; СКЗ – субкапсулярная зона; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

5.3.4 Обсуждение

Механизмы возникновения половых различий течения инфекционно-воспалительных процессов исследуются в основном на экспериментальных моделях, на которых показано, что уровень половых гормонов коррелирует с тяжестью и исходами заболевания (Angele M.K. et al, 2000; Choudhry M.A. et al., 2006). По данным экспериментальных и клинических исследований половые стероидные гормоны могут как подавлять, так и активировать иммунный ответ (Choudhry M.A. et al., 2006; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). По сравнению с мужчинами женщины более устойчивы к вирусным, бактериальным и паразитарным инфекциям, однако у них чаще развиваются и тяжелее протекают аутоиммунные заболевания, в том числе системная красная волчанка, ревматоидный артрит и др. (Quach C. et al., 2003; Angele M.K. et al., 2006; Lang C., et al., 2007). Предрасположенность или устойчивость мужчин и женщин как к инфекционно-воспалительным, так и к аутоиммунным заболеваниям во многом определяется уровнем половых стероидов, содержание которых в сыворотке крови изменяется в зависимости от периода постнатального развития, а в половозрелом возрасте – в зависимости от репродуктивного статуса

и фазы менструального цикла у женщин (Wichmann M.W. et al., 2003; Angele M.K. et al., 2006). При лечении различных инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний половые различия, как правило, не учитываются, что может снижать эффективность терапевтических мероприятий.

В работе изучены половые различия морфологических нарушений и иммунологических проявлений при развитии СВО у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в разные сроки после введения низкой дозы ЛПС.

На 1-е сут после введения ЛПС самкам в фазу проэструса в сыворотке крови у них было выявлено снижение концентрации эстрадиола на фоне повышения прогестерона и общего тестостерона, что, по-видимому, связано с нарушением биосинтеза эстрадиола гранулезной тканью фолликулов яичников вследствие взаимодействия ЛПС с TLR4, экспрессируемых на их поверхности (Shimizu T. et al., 2012). В эти сроки развития СВО в сыворотке крови самцов наблюдалось снижение содержания только общего тестостерона, тогда как концентрация эстрадиола и прогестерона не отличалась от значений в контрольной группе. По данным литературы введение ЛПС половозрелым самцам лабораторных грызунов сочетается со снижением содержания тестостерона в сыворотке крови, что сопровождается ингибированием экспрессии стероидогенного острого регуляторного белка (Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein), и как следствие, нарушение сперматогенеза (Wang H. et al., 2014). В эти сроки развития СВО в сыворотке крови у самок наблюдалось повышение содержания кортикостерона, тогда как у самцов, напротив, его снижение. Согласно данным литературы развитие СВО на ранних сроках сопровождается повышением концентрации кортикостерона в сыворотке крови (Kessler W., et al., 2012), однако, нами показано, что у самцов, напротив, содержание кортикостерона снижается, что может определять более выраженные воспалительные изменения в легких по сравнению с самками. К 7-м сут эксперимента содержание всех исследуемых половых стероидных гормонов и кортикостерона в сыворотке крови у самок нормализовалось, а у самцов было отмечено повышение концентрации эстрадиола. По данным клинических исследований повышенное содержание эстрадиола в сыворотке крови у больных сепсисом является неблагоприятным прогнозом и коррелирует с высокими показателями смертности в течение 28 дней после развития септического шока (Feng J.Y. et al., 2014).

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у самцов крыс Вистар выявлено повышение уровня эндотоксина, тогда как у самок, которым моделировали СВО в фазу проэструса, эндотоксинемия не обнаруживалась. Эндотоксин - один из основных активаторов TLR4 при развитии СВО и сепсиса. Это взаимодействие приводит к последовательным этапам развития воспалительной реакции, являющейся основным механизмом реализации реакций врожденного иммунитета. Увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови у самцов отражает

тяжесть течения СВО. M. Erikoglu и соавт. (2005) показали, что уровень эндотоксина у самок крыс с экспериментально индуцированным сепсисом значительно ниже, чем у самцов, что согласуется с полученными нами данными. На 7-е сут после введения ЛПС уровень эндотоксина в сыворотке крови у самок не отличался от значений в контрольной группе, а у самцов – нормализовался.

На 1-е сут после введения ЛПС по сравнению с самками у самцов воспалительная реакция в легких была более выраженной, о чем свидетельствует высокое число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. По данным литературы миграция нейтрофилов в респираторном отделе легких и их функционирование модулируются половыми гормонами (Bekesi G., et al., 2007; Pioli P.A. et al., 2007). Известно, что эстрогены снижают созревание и миграцию нейтрофилов из красного костного мозга (Wessendorf G. et al., 1998), а также уменьшают их адгезию к эндотелию сосудов (Delyani J.A. et al., 1996). По данным полуколичественной оценки морфологических изменений печени через сутки после введения ЛПС половых различий выявлено не было: как у самцов, так и у самок обнаружены разные по выраженности и распространенности некрозы и дистрофические изменения гепатоцитов. Однако в сыворотке крови у самцов выявлено увеличение показателей активности ферментов печени – АлАТ и АсАТ, что характеризует более выраженные альтеративные изменения гепатоцитов по сравнению с самками. На 7-е сут после введения ЛПС у самок и самцов наблюдается восстановление нормальной морфологической структуры органов-мишеней: уменьшается число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, дистрофические изменения в печени минимально выражены. Показатели активности АлАТ и АсАТ у самок нормализуются, а у самцов, наоборот, продолжают увеличиваться, что свидетельствует о функциональных нарушениях гепатоцитов в поздние сроки развития СВО у самцов. По данным литературы высокий уровень активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у больных сепсисом коррелирует с показателями смертности (Koskinas J. et al., 2008; Zhu W. et al., 2013).

На 1-е сут развития СВО у самок в тимусе выявляется акцидентальная инволюция I стадии, характеризующаяся расширением коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны. Тогда как у самцов акцидентальная инволюция была более выражена, наблюдалась картина «звездного неба», при этом субкапсулярная зона расширялась, а объемная доля коркового вещества тимуса не изменялась по сравнению с контрольной группой. Акцидентальная инволюция тимуса у самок и самцов сопровождалась повышением числа апоптотически гибнущих тимоцитов. Более выраженные изменения в тимусе у самцов, по-видимому, связаны с прямым воздействием эндотоксина, так как по сравнению с самками его уровень в крови самцов повышался в несколько раз. По данным литературы эндотоксин связывается TLR4 рецепторами, экспрессируемыми клетками иммунной системы, в том числе тимоцитами, что может приводить

как к апоптозу, так и изменению продукции цитокинов (Gong S.L. et al., 2008). На 7-е сут после введения ЛПС в тимусе у самцов и самок восстанавливается структура тимуса, выявляется расширение коркового вещества по сравнению с 1-ми сутками эксперимента, а также увеличение ширины субкапсулярной зоны у самцов. Согласно данным литературы инволютивные изменения тимуса у экспериментальных животных сохраняются в течение 3-4 дней после введения ЛПС (Love P.E., Bhandoola A., 2011), а затем наблюдается восполнение пула $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов за счет миграции предшественников Т-клеток из красного костного мозга в субкапсулярную зону тимуса, их дальнейшего созревания, миграции в корковое вещество и пролиферации Т-лимфоцитов (Love P.E., Bhandoola A., 2011).

На 1-е сут развития СВО в селезенке у самцов и самок выявлено «опустошение» белой пульпы за счет снижения объемной доли ПАЛМ-зоны, что отражает процессы гибели Т-лимфоцитов (Markwart R. et al., 2014). Герминативные центры лимфоидных узелков у самцов и самок расширяются, а объемная доля маргинальной зоны уменьшается по сравнению с контрольными группами, причем эти изменения более выражены у самок, чем у самцов. Морфологические изменения в селезенке, обнаруженные нами в ранние сроки развития СВО у крыс обоего пола, отражают процессы активации пролиферации и миграции В-лимфоцитов. По данным литературы маргинальная зона лимфоидных узелков представлена преимущественно В1-лимфоцитами, которые могут реализовывать реакции как врожденного иммунитета, а именно презентировать антигены, так и гуморального – синтезировать антитела (Bronte V., Pittet M.J., 2013). В1-клетки маргинальной зоны, в отличие от В-лимфоцитов, расположенных в лимфоидных узелках, захватывают антигены из сосудов красной пульпы и могут мигрировать в лимфоидные узелки белой пульпы за счет десенситизации рецепторов к сфингозин-1-фосфат-1 (Arnon et al., 2013). Как показано *ex vivo* по сравнению с В-клетками лимфоидных узелков В1-лимфоциты маргинальной зоны более ярко реагируют на такие митогены, как ЛПС, что проявляется в выраженной продукции ими антител (Zouali M., Richard Y. et al., 2011). Таким образом, через сутки после введения ЛПС в результате антигенной стимуляции происходит сужение маргинальной зоны за счет миграции лимфоцитов в лимфоидные узелки, а также расширение герминативных центров, обусловленных активацией пролиферации В-лимфоцитов. Более выраженные изменения, выявленные у самок, по-видимому, связаны со стимулирующим действием эстрогенов на В-лимфоциты (Lu F.X. et al., 2002). На 7-е сут после введения ЛПС у самцов и самок обнаружена нормализация объемной доли белой пульпы селезенки за счет увеличения ПАЛМ-зоны, лимфоидных узелков, а также сужение их светлых центров и расширение маргинальных зон.

На 1-е сут после введения ЛПС у самцов наблюдалась поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу, о чем свидетельствует увеличение содержания неоптерина в

сыворотке крови и продукции клетками селезенки Тх1-цитокина – ИЛ-2. У самок, напротив, уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-12 и концентрация неоптерина снижались. На 7-е сут после введения ЛПС у самок наблюдается нормализация уровня продукции ИЛ-4, провоспалительного ИЛ-6 на фоне низкого содержания ИЛ-1, ФНО-α и ИФН-γ в культуре клеток селезенки и неоптерина в сыворотке крови. Тогда как у самцов поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу сохраняется до 7-х сут развития СВО, о чем свидетельствует высокий уровень продукции ИЛ-2 и низкий – ИЛ-4. В эти сроки у них снижается продукция провоспалительного ФНО-α, однако повышается содержание другого провоспалительного цитокина – ИЛ-6, одной из функций которого является активация гуморального звена иммунного ответа. Развитие сепсиса и септического шока связано с высокой продукцией таких цитокинов, как ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-8 (Blackwell T.S., Christman J.W., 1996), которые часто определяют смертельный исход при данных заболеваниях (Dossett L.A. et al., 2008). Увеличение уровня продукции ИЛ-6 в культуре клеток селезенки у самцов на 7-е сут развития СВО может определять более выраженное течение СВО по сравнению с самками.

В периферической крови у самцов и самок на 1-е сут развития СВО выявлено повышение числа NK-клеток и снижение цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако у самцов также наблюдалось уменьшение абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов, тогда как у самок эти показатели оставались без изменений. По данным литературы у мышей на 1-е сут развития СВО, индуцированного введением зимозана, снижается число Т-регуляторных клеток в легких, что соответствует полученным нами данным (Jia W. et al., 2013). Снижение числа $CD8^+$ лимфоцитов коррелирует с тяжестью течения абдоминального сепсиса у мышей (Condotta S.A. et al., 2013). В клинике у септических больных снижение количества Т-цитотоксических лимфоцитов является одним из показателей развития «иммунного паралича» (Boomer J.S. et al., 2011).

Таким образом, в разные сроки развития СВО воспалительные изменения в органах-мишенях более выражены у самцов. На 1-е сут после введения ЛПС у самцов обнаружена эндотоксинемия, которая сопровождалась снижением концентрации кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови. Тогда как у самок во все сроки эксперимента эндотоксинемия не выявлялась, а содержание кортикостерона, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови на 1-е сут после введения ЛПС повышалось, что сопровождалось снижением концентрации эстрадиола.

В тимусе самцов в ранние сроки развитии СВО выявлялась акцидентальная инволюция II стадии, в селезенке – «опустошение» белой пульпы и расширение герминативных центров лимфоидных узелков. В тимусе у самок, напротив, изменения были менее выраженными, тогда как в селезенке, наоборот, «опустошение» белой пульпы и расширение герминативных центров

лимфоидных узелков было более выраженным по сравнению с самцами. На 7-е сут развития СВО у крыс обоего пола наблюдалось восстановление структуры органов иммунной системы.

В ранние сроки СВО у самцов наблюдалась поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу, о чем свидетельствовало увеличение уровня продукции ИЛ-2 клетками селезенки и содержания неоптерина в сыворотке крови. Однако на 7-е сут после введения ЛПС у них отмечался высокий уровень продукции ИЛ-6, который, по-видимому, определяет более выраженные альтеративные изменения в органах-мишенях у самцов. На 1-е сут после введения ЛПС у самок клетками селезенки снижается уровень продукции всех исследуемых цитокинов, а к 7-м сут эксперимента наблюдается нормализация продукции цитокинов, за исключением ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-12, уровень которых был ниже значений в контрольной группе. В ранние сроки развития СВО в периферической крови у самцов по сравнению с самками наблюдается снижение абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов, что отражает более выраженные процессы миграции и гибели лимфоцитов у них.

Глава 6 ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫСОКОЙ ДОЗОЙ ЛПС, У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР

С целью оценки выраженности возрастных особенностей течения СВО половозрелым крысам Вистар обоего пола внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 15 мг/кг. Самкам вводили ЛПС в фазу проэструса. Оценку фазы эстрального цикла проводили по влагалищным мазкам. Летальность половозрелых самок и самцов после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг была высокая и составляла в обеих группах 56%. В связи с высокой смертностью животных в ранние сроки эксперимента исследование СВО в отдаленный период не проводили.

6.1 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самок крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг в сыворотке крови у самок изменения содержания эстрадиола, прогестерона и общего тестостерона не выявлено (табл. 6.1.1).

Таблица 6.1.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=5)	20,79 (17,48-27,76)	74,00 (12,02-95,00)	0,77 (0,76-1,13)
ЛПС 1-е сут (n=6)	32,51 (25,88-38,14)	22,54 (18,56-41,54)	0,60 (0,32-0,92)
Статистическая значимость различий (p)	0,39	0,38	0,38

Морфологические изменения легких у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут развития СВО в легких у самок в просветах бронхов определялись зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. Эпителий бронхов был очагово десквамирован. В адвентициальном слое бронхов наблюдалась диффузная нейтрофильная инфильтрация. Межальвеолярные перегородки были очагово утолщены, в них большое количество диффузно рассеянных нейтрофилов (15-20 в поле зрения при ув. 400). У 2 из 10 самок выявлены мелкие очаги пневмонии. Периваскулярные лимфатические щели некоторых легочных вен расширены. У 3 из 10 животных выявлялся интраальвеолярный отек: небольшая часть просветов альвеол и альвеолярных ходов была

заполнена гомогенными эозинофильными массами, эритроцитами и единичными лейкоцитами (рис. 6.1.1В, Г). Таким образом, в легких крыс на 1-е сут после введения ЛПС развивался отек и воспалительная реакция, которая характеризовалась увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (табл. 6.1.2).

Таблица 6.1.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Число нейтрофилов на площади 25 тыс. мкм^2
Контрольная (n=10)	1,64 (1,43-1,86)
ЛПС 1-е сут (n=7)	23,60 (14,6-28,7)
Статистическая значимость различий (p)	0,00001

Морфологические изменения печени у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сутки после введения ЛПС у самок в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов – ландшафтообразные и очаговые некрозы (у 4 самок из 10), выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы (ув. 640). По ходу триад определялась слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация, неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, стазы и сладжи (рис. 6.1.2В, Г).

Таблица 6.1.3

Показатель выраженности альтеративных изменений в печени у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений (баллы)
Контрольная (n=10)	1,50 (1,00-2,50)
ЛПС 1-е сут (n=11)	3,00 (3,00-4,00)
Статистическая значимость различий (p)	0,002

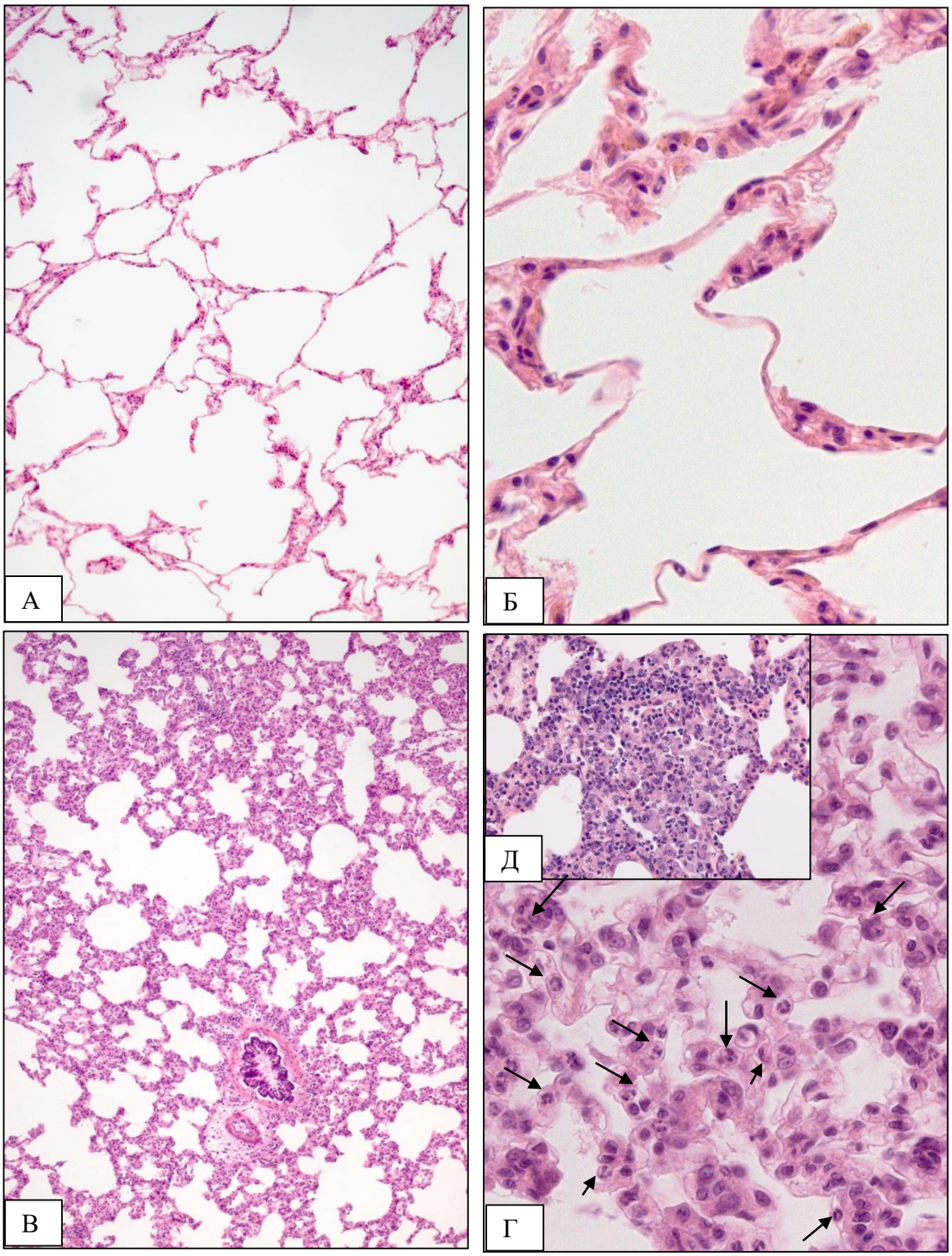


Рис. 6.1.1. Морфологическая характеристика легких у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (В, Г, Д). *Контрольная группа*: А – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные; Б – в межальвеолярных перегородках единичные нейтрофилы. *1-е сут после введения высокой дозы ЛПС*: В – воспалительные изменения, интраальвеолярный отек, дистелектазы и острая эмфизема, расширена периваскулярная лимфатическая щель; Г - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты (указаны стрелками) в межальвеолярных перегородках; Д – очаг пневмонии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В 100; Б, Г 640, Д 200

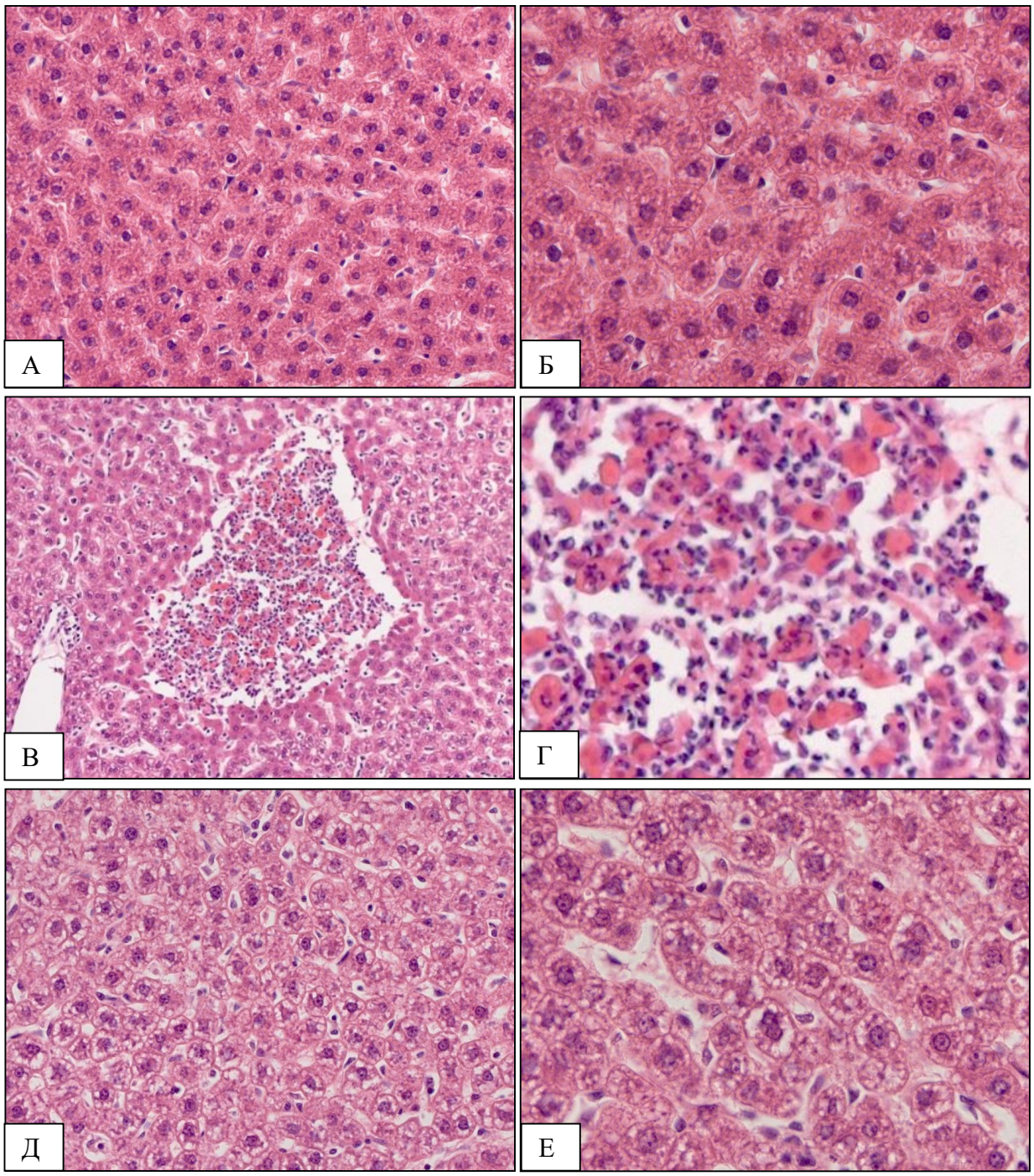


Рис. 6.1.2. Морфологическая характеристика печени у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (В, Г, Д, Е). *Контрольная группа*: А, Б – в цитоплазме гепатоцитов мелкая базофильная зернистость. *1-е сут после введения высокой дозы ЛПС*: В, Г – очаг некроза; Д – выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов; Е – дистрофические изменения гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А,В, Д 400, Б, Г, Е 640

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самок показатели уровня активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови были статистически значимо выше значений в контрольной группе (табл.6.1.4).

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самок уровень эндотоксина статистически значимо возрастал по сравнению с контрольной группой (табл. 6.1.4).

Концентрация кортикостерона в эти сроки эксперимента не изменялась (табл. 6.1.4).

Таблица 4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=5)	86 (72–97)	139 (98–166)	0,70 (0,53-0,75)	58,59 (31,27-65,49)
ЛПС 1-е сут (n=10)	736 (96–2141)	771 (160–2652)	22,09 (33,63-100)	33,15 (21,78-41,58)
Статистическая значимость различий (p)	0,01	0,04	0,001	0,36

Морфологические изменения тимуса и содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самок в тимусе выявлялись признаки акцидентальной инволюции II–III стадии. В корковом веществе обнаружена картина «звездного неба», фрагменты ядер погибших клеток и фагоцитирующие их макрофаги (рис. 6.1.3В, Г). Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткими (рис. 6.1.3Д). Наблюдалось сужение коркового вещества тимуса, его субкапсулярная зона не выявлялась (табл. 6.1.5, рис. 6.1.3Г). В мозговом веществе обнаружены тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 концентрически расположенных эпителиальных клеток с накоплением кератогиалина.

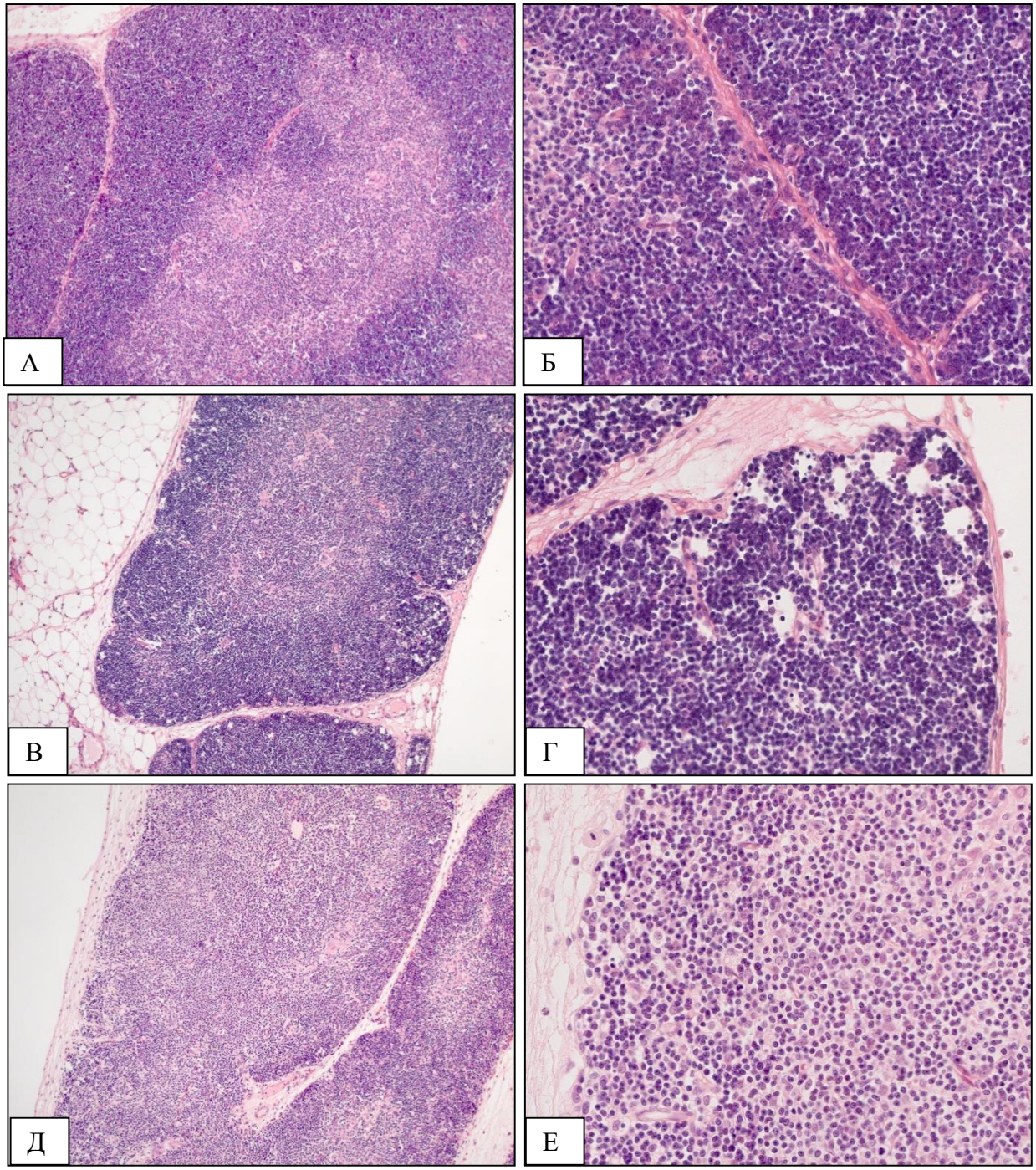


Рис. 6.1.3. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (В, Г, Д, Е). *Контрольная группа*: А – границы между корковым и мозговым веществом четкие, соотношение между корковым и мозговым веществом примерно 1:1; Б – субкапсулярная зона широкая, состоит из 6-8 рядов лимфобластов. *1-е сут после введения ЛПС*: В – границы между корковым и мозговым веществом четкие, в корковом веществе картина звездного неба, акцидентальная инволюция II стадии; Г – субкапсулярная зона отсутствует, в корковом веществе опустошение, появление макрофагов; Д – границы между корковым и мозговым веществом нечеткие, узкое корковое вещество; Е – субкапсулярная зона отсутствует, опустошение коркового вещества, наличие макрофагов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 400

Таблица 6.1.5

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина субкапсулярной зоны, мкм
	КВ	МВ		
Контрольная (n=11)	49,16 (47,4-50,0)	50,83 (46-52,6)	1,02 (0,95-1,22)	35,75 (29,59-37,61)
ЛПС 1-е сут (n=15)	32,81 (29,4-41,1)	67,19 (58,89-70,58)	0,47 (0,33-0,51)	0,00 (0,0-15,6)
Статистическая значимость различий (p)	0,025	0,025	0,017	0,0001

Условные обозначения: КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе, и среди них $CD3^{+-}$лимфоцитов, статистически значимо не изменялось (табл. 6.1.6).

Таблица 6.1.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^{+}$-лимфоцитов у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^{-}$)	$CD3^{+}$-лимфоциты
Контрольная группа (n=6)	1,3 (1,1-1,3)	11,9 (9,4-15,2)
ЛПС 1-е сут (n=6)	1,4 (0,4-1,6)	9,4 (9,3-20,2)
Статистическая значимость различий (p)	0,84	0,055

Таким образом, на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС в тимусе у половозрелых самок крыс Вистар выявлена акцидентальная инволюция II-III стадий, которая характеризовалась опустошением коркового вещества, сужением субкапсулярной зоны тимуса без изменений количества апоптотически гибнущих тимоцитов.

Морфологические изменения селезенки у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе в селезенке у самок крыс Вистар белая пульпа выражена, представлена ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками. В лимфоидных узелках выявлены лимфоциты, лимфобласты, фрагменты ядер. Клеточные элементы в лимфоидных узелках располагались рыхло. Маргинальные зоны лимфоидных узелков были узкими и состояли из 1-2 рядов клеток. В красной пульпе выраженное полнокровие сосудов, большое количество нейтрофилов (рис. 6.1.4). По данным морфометрического исследования при введении высокой дозы ЛПС в селезенке самок не было обнаружено изменений объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков (табл. 6.1.7). Было выявлено сужение маргинальных зон и расширение герминативных центров, что свидетельствует об активации адаптивного звена иммунного ответа.

Содержание TGF-β в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов клетками селезенки, активированными КонА, у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут развития СВО у половозрелых самок наблюдалось снижение содержания TGF-β в сыворотке крови. На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у самок выявлено снижение уровня продукции ИЛ-4 и ФНО-α. Содержание ИЛ-2 и ИФН-γ в культуральной жидкости клеток селезенки через сутки после введения ЛПС статистически значимо не изменялось по сравнению с контрольной группой (табл. 6.1.8).

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у половозрелых самок крыс Вистар в периферической крови выявлено повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение – регуляторных Т-лимфоцитов. Относительное и абсолютное число Т-цитотоксических лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов в периферической крови статистически значимо не изменялось (табл. 6.1.9).

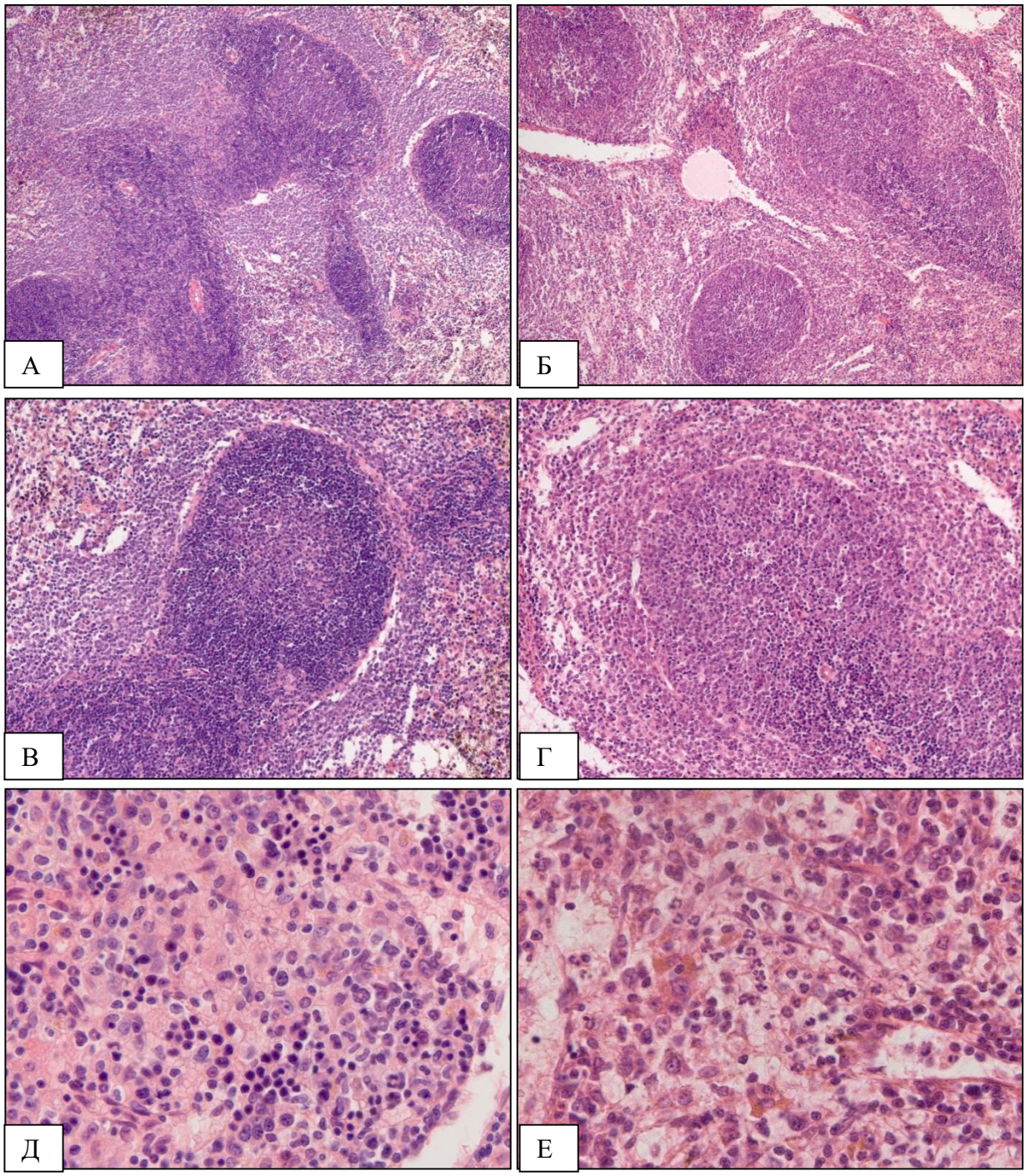


Рис. 6.1.4. Морфологическая характеристика селезенки у половозрелых самок крыс Вистар контрольной группы (А, В, Д) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Б, Г, Е). *Контрольная группа*: А – белая пульпа представлена выраженной ПАЛМ-зоной и крупными лимфоидными узелками со светлыми центрами; В – лимфоидный узелок с крупным светлым центром и маргинальной зоной; Д – в строме красной пульпы небольшое число лимфоцитов. *1-е сут после введения ЛПС*: Б – ПАЛМ-зона не выражена; крупные лимфоидные узелки; Г – лимфоидный узелок с широким светлым центром и узкой маргинальной зоной; Е – в красной пульпе много нейтрофилов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, Б 100; В, Г 200; Д, Е 640

Таблица 6.1.7

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля функциональных зон селезенки, %			Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	Объемная доля функциональных зон ЛУз селезенки, %	
	ПАЛМ-зона	ЛУз	БП		МЗ	ГЦ
Контрольная (n=9)	19,2 (18,4-24,8)	15,0 (12,4-20,0)	38,4 (31,2-41,8)	0,63 (0,45-0,76)	40,8 (35,0-43,2)	15,5 (7,6-18,6)
ЛПС 1-е сут (n=10)	19,6 (17,2-22,0)	16,7 (13,4-23,4)	34,6 (29,8-43,4)	0,55 (0,44-0,81)	22,9 (10,2-27,5)	66,6 (60,9-69,3)
Статистическая значимость различий (p)	0,73	0,63	0,73	0,92	0,001	0,0006

Условные обозначения: ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Таблица 6.1.8

Содержание TGF-β в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов клетками селезенки, активированными КонА, у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Среда	Цитокины	Контрольная (n=8)	ЛПС 1-е сут (n=8)	Статистическая значимость различий (p)
Сыворотка, нг/мл	**TGF-β**	79,0 (63,2-81,9)	37,1 (17,5-41,0)	0,09
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	**ИЛ-2**	4700 (4000-5600)	5400 (5100-5400)	0,57
	ИЛ-4	300 (284-344)	86,83 (46,04-127,1)	0,035
	ИФН-γ	378,9 (339,8-425,8)	375,0 (320,3-421,9)	0,71
	ФНО-α	452,6 (308,3-624,0)	172,7 (135,7-202,4)	0,023

Таблица 6.1.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Субпопуляция	Относительное число, %		Абсолютное число, млн/мл	
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$43,8^{1*}$ (37,2-51,1)	$39,4^{2}$ (30,7-52,7)	$6,8^{1}$ (3,7-7,9)	$7,2^{2}$ (5,3-8,9)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$54,7^{3}$ (51,9-64,8)	$65,2^{4}$ (37,6-67,4)	$3,7^{3}$ (2,3-4,2)	$3,4^{4}$ (2,7-4,5)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$38,8^{5}$ (30,4-45,0)	$32,55^{6}$ (26,8-46,3)	$3,2^{5}$ (2,0-4,0)	$3,4^{6}$ (1,6-4,3)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$20,8^{7}$ (20,0-25,9)	$18,2^{8}$ (15,5-22,4)	$3,1^{7}$ (2,1-4,6)	$2,7^{8}$ (1,7-3,4)
NK-клетки ($CD314^+$)	$4,9^{9}$ (3,0-6,1)	**$26,3^{10}$** (16,2-52,2)	$0,5^{9}$ (0,2-0,9)	**$4,7^{10}$** (2,5-8,4)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$3,2^{11}$ (2,3-3,7)	$4,1^{12}$ (2,8-5,0)	$0,43^{11}$ (0,38-0,51)	$0,65^{12}$ (0,40-0,91)
Регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$3,4^{13}$ (3,2-4,6)	**$2,2^{14}$** (1,5-2,7)	$0,51^{13}$ (0,33-0,55)	**$0,23^{14}$** (0,088-0,44)
Статистически значимые различия, значения	$0,74^{1-2}$ $0,47^{3-4}$ $0,78^{5-6}$ $0,26^{7-8}$	$0,0002^{9-10}$ $0,32^{11-12}$ $0,002^{13-14}$	$0,15^{1-2}$ $0,84^{3-4}$ $0,91^{5-6}$ $0,38^{7-8}$	$0,001^{9-10}$ $0,46^{11-12}$ $0,04^{13-14}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Заключение

Таким образом, введение самкам крыс Вистар в фазу проэструса ЛПС в дозе 15 мг/кг приводит к выраженному повышению уровня эндотоксина (в 22 раза по сравнению с контрольной группой). Содержание кортикостерона и половых стероидных гормонов в сыворотке крови на 1-е сут развития СВО не изменяется.

На 1-е сут развития СВО в легких у самок крыс Вистар развивается интраальвеолярный отек и воспалительная реакция, которая характеризуется увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. В печени у самок в эти сроки эксперимента выявлены выраженные дистрофические изменения гепатоцитов и у части животных ландшафтообразные некрозы, что сочетается повышением уровня активности ферментов печени – АлАТ и АсАТ в сыворотке крови.

В ранние сроки развития СВО в тимусе у самок выявлена акцидентальная инволюция II-III стадии, которая характеризуется наличием картины «звездного неба» и опустошением коркового вещества, сужением его субкапсулярной зоны. В эти сроки в селезенке снижается объемная доля маргинальной зоны лимфоидных узелков, а размеры герминативных центров – увеличиваются, что свидетельствует об активации процессов миграции и пролиферации В-лимфоцитов.

На 1-е сут после введения ЛПС в периферической крови выявлено снижение количества регуляторных Т-лимфоцитов и повышение числа NK-клеток. В эти сроки уровень продукции ИЛ-4, ФНО-α клетками селезенки снижается, а показатель продукции ИЛ-2 и ИФН-γ не изменяется.

6.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых самцов крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг в сыворотке крови у самцов изменений содержания эстрадиола, прогестерона и общего тестостерона выявлено не было (табл. 6.2.1).

Таблица 6.2.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Контрольная (n=5)	24,59 (20,34-29,34)	4,49 (4,21-6,12)	1,29 (1,19-1,48)
ЛПС 1-е сут (n=6)	19,79 (16,41-30,42)	3,83 (3,25-4,30)	1,61 (0,42-2,92)
Статистическая значимость различий (p)	0,57	0,1	0,37

Морфологические изменения легких у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самцов в просветах бронхов определялись зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. Эпителий бронхов был очагово десквамирован. В адвентициальном слое бронхов выявлена диффузная нейтрофильная инфильтрация. Межальвеолярные перегородки очагово утолщены, в них большое число нейтрофилов (15-20 в поле зрения при ув. 400). Периваскулярные лимфатические щели части легочных вен расширены, в адвентиции легочных вен диффузная нейтрофильная инфильтрация. У 9 из 14 животных выявлялся интраальвеолярный отек: часть просветов альвеол и альвеолярных ходов была заполнена гомогенными эозинофильными массами, эритроцитами и единичными лейкоцитами (рис. 6.2.1В, Г). Таким образом, в легких у самцов на 1-е сут после введения ЛПС развивалась воспалительная реакция, которая характеризовалась увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (табл. 6.2.2).

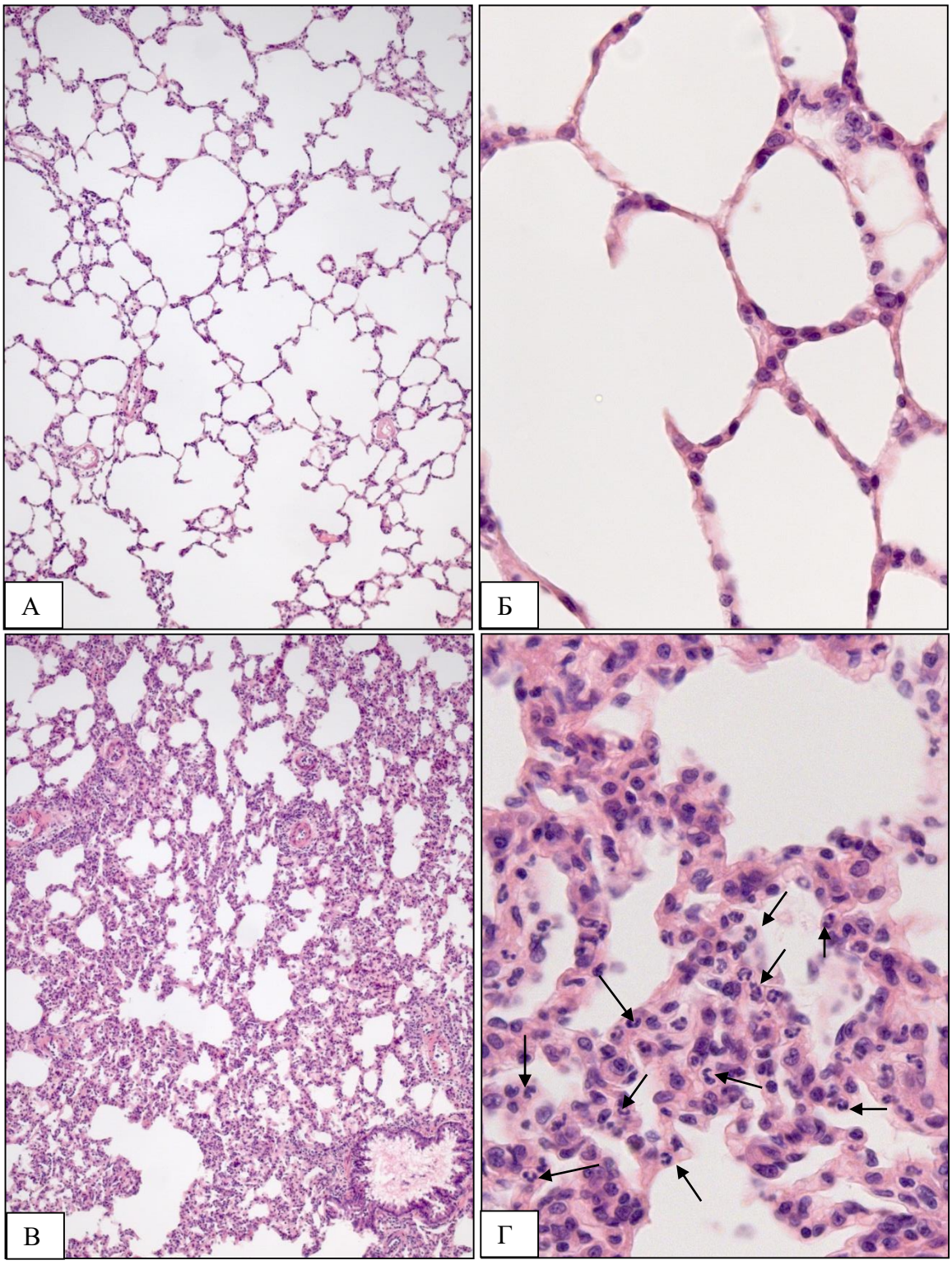


Рис. 6.2.1. Морфологическая характеристика легких у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (В, Г). *Контрольная группа*: А – просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные; Б – в межальвеолярных перегородках единичные нейтрофилы. *1-е сут после введения высокой дозы ЛПС*: В - зоны интраальвеолярного отека, дистелектазы и острая эмфизема, просвет бронха заполнен эритроцитами и эозинофильными массами, диффузная периваскулярная инфильтрация; Г - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты (указаны стрелками) в межальвеолярных перегородках. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В 100; Б, Г 640

Таблица 6.2.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Число нейтрофилов на площади 25 тыс. мкм^2
Контрольная (n=10)	2,55 (1,95-4,05)
ЛПС 1-е сут (n=7)	27,83 (24,0-32,6)
Статистическая значимость различий (p)	0,003

Морфологические изменения печени у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сутки после введения высокой дозы ЛПС у самцов в печени выявлены ландшафтообразные и очаговые некрозы, выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов. У 7 крыс из 14 определялись очаговые некрозы. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы (ув. 640). По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, стазы и сладжи (рис. 6.2.2В, Г). По данным полуколичественной оценки выраженности альтеративных изменений в печени на 1-е сут развития СВО показатель дистрофических и некротических изменений был статистически значимо выше, чем в контрольной группе (табл. 6.2.3).

Таблица 6.2.3

Показатель выраженности альтеративных изменений в печени у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений (баллы)
Контрольная (n=10)	1,00 (0,50-1,50)
ЛПС 1-е сут (n=11)	3,50 (2,00-4,00)
Статистическая значимость различий (p)	0,001

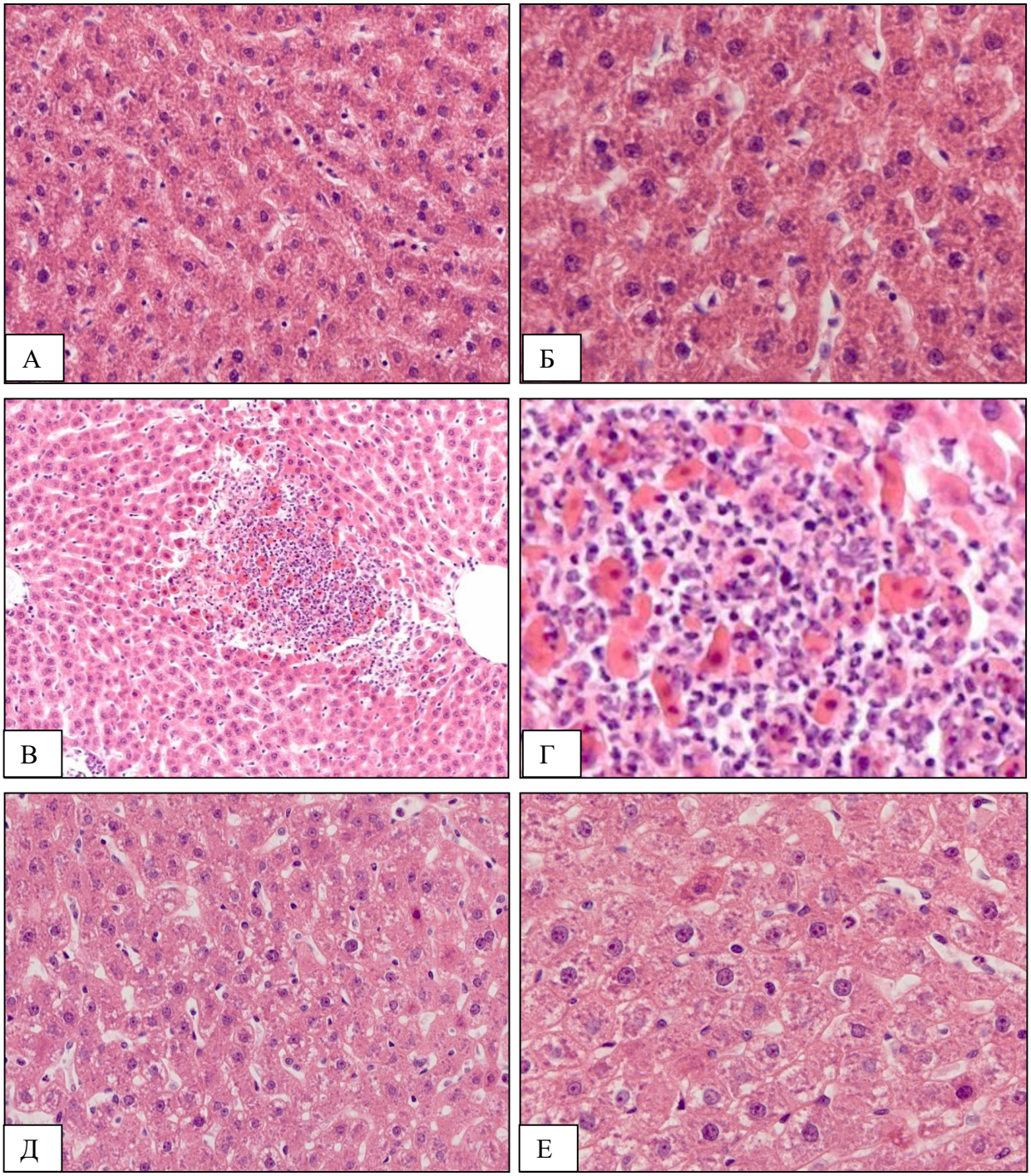


Рис. 6.2.2. Морфологическая характеристика печени у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (В, Г, Д, Е). *Контрольная группа*: А, Б – в цитоплазме гепатоцитов мелкая базофильная зернистость. *1-е сут после введения высокой дозы ЛПС*: В, Г – очаг некроза; Д, Е – выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 400; Б, Г, Е 640

Активность ферментов АлАТ и АсАТ, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС у самцов показатели уровня активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови были статистически значимо выше значений в контрольной группе (табл. 6.2.4).

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самцов уровень эндотоксина возрастал в 183 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 6.2.4).

В эти сроки эксперимента концентрация кортикостерона была ниже, чем в контрольной группе (табл. 6.2.4).

Таблица 6.2.4

Активность ферментов печени, уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
	АлАТ	АсАТ		
Контрольная (n=5)	78 (69-87)	103 (100-119)	0,57 (0,48-0,66)	25,53 (21,19-30,94)
ЛПС 1-е сут (n=8)	297 (145-398)	425 (188–604)	110 (105-125)	18,76 (12,02-20,34)
Статистическая значимость различий (p)	0,02	0,01	0,004	0,016

Морфологические изменения тимуса и содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самцов в тимусе выявлялись признаки акцидентальной инволюции II–III стадии. У всех самцов в корковом веществе картина «звездного неба», фрагменты ядер погибших клеток и фагоцитирующие их макрофаги (рис. 6.2.3В, Г). Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткими (рис. 6.2.3Д). Наблюдалось сужение коркового вещества тимуса, его субкапсулярная зона не выявлялась (табл. 6.2.5, рис. 6.2.3Г). В мозговом веществе обнаруживались тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 концентрически расположенных эпителиальных клеток с накоплением кератогиалина.

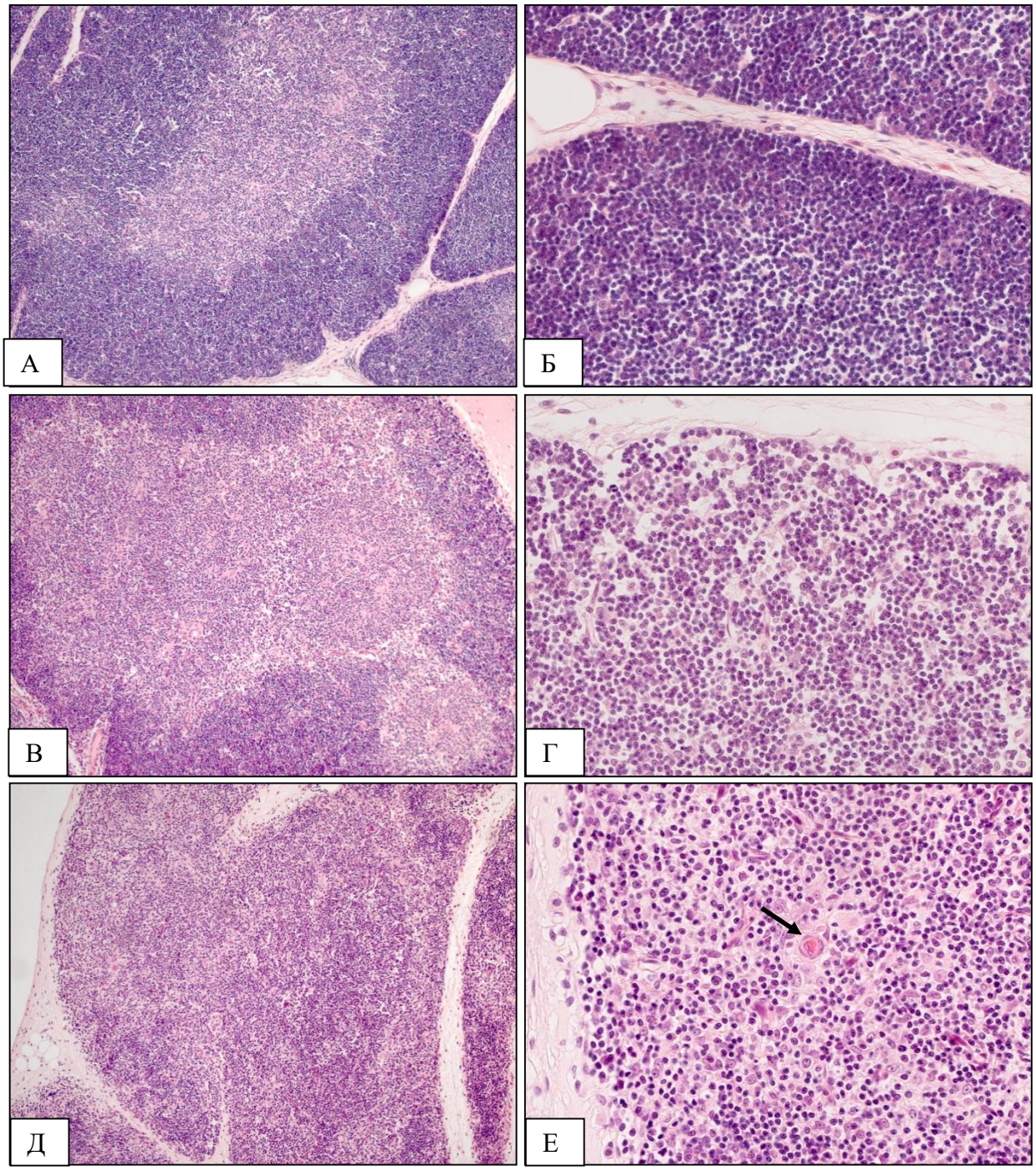


Рис. 6.2.3. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (В, Г, Д, Е). *Контрольная группа*: А – границы между корковым и мозговым веществом четкие, соотношение между корковым и мозговым веществом 1:1; Б – субкапсулярная зона широкая, состоит из 8-10 рядов лимфобластов. *1-е сут после введения ЛПС*: В – границы между корковым и мозговым веществом четкие, в корковом веществе картина звездного неба, акцидентальная инволюция II стадии; Г – субкапсулярная зона не выражена, в корковом веществе опустошение, макрофаги; Д – границы между корковым и мозговым веществом нечеткие, инверсия слоев, акцидентальная инволюция III стадии; Е – субкапсулярная зона отсутствует, опустошение коркового вещества, тимическое тельце с накоплением кератогиалина (указано стрелкой) в корковом веществе. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, В, Д 100; Б, Г, Е 400

Таблица 6.2.5

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина субкапсулярной зоны, мкм
	КВ	МВ		
Контрольная (n=11)	55,19 (50,8-57,6)	44,81 (42,4-49,2)	1,34 (1,07-1,43)	25,75 (21,58-29,16)
ЛПС 1-е сут (n=15)	46,25 (39,4-53,3)	53,75 (46,7-60,6)	0,99 (0,74-1,38)	0,00 (0,0-0,0)
Статистическая значимость различий (p)	0,025	0,025	0,017	0,0001

Условные обозначения: КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС в тимусе увеличивалось относительное содержание апоптотически гибнущих клеток. Однако показатель числа апоптотической гибели $CD3^{+}$-лимфоцитов статистически значимо не изменялся (табл. 6.2.6).

Таблица 6.2.6

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (%) и $CD3^{+}$-лимфоцитов у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Все клетки тимуса ($CD3^{-}$)	$CD3^{+}$-лимфоциты
Контрольная группа (n=5)	0,4 (0,1-1,0)	11,8 (4,4-13,4)
ЛПС 1-е сут (n=5)	1,5 (0,9-2,3)	10,5 (10,2-13,9)
Статистическая значимость различий (p)	0,04	0,99

Таким образом, на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС в тимусе у половозрелых самцов крыс Вистар выявлена акцидентальная инволюция II-III стадий с опустошением коркового вещества тимуса, сужением субкапсулярной зоны и увеличением числа апоптотически гибнущих тимоцитов.

Морфологические изменения селезенки у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе в селезенке у самцов крыс Вистар выявлено опустошение белой пульпы. Т-зависимая ПАЛМ-зона опустошена, лимфоциты вокруг сосудов располагались в несколько рядов. В лимфоидных узелках выявлены лимфоциты, лимфобласты, погибшие клетки, которые были рыхло расположены. Маргинальные зоны лимфоидных узелков опустошены. В красной пульпе выраженное полнокровие сосудов, большое количество нейтрофилов (рис. 6.2.4). В селезенке самцов на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС наблюдалось снижение объемной доли маргинальных зон и расширение герминативных центров лимфоидных узелков. Объемная доля белой пульпы, включая ПАЛМ-зону и лимфоидные узелки, не изменялась (табл. 6.2.7).

Содержание TGF-β в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов клетками селезенки, активированными КонА, у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут развития СВО у половозрелых самцов выявлено снижение содержания TGF-β в сыворотке крови. В эти сроки у самцов в культуре клеток селезенки наблюдается снижение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ и ФНО-α по сравнению с контрольной группой (табл. 6.2.8).

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у половозрелых самцов крыс Вистар в периферической крови выявлено повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение – регуляторных и цитотоксических Т-лимфоцитов. Относительное число В-лимфоцитов в эти сроки снижалось, а Т-хелперов – повышалось. Абсолютное количество Т-хелперов, В-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов в периферической крови статистически значимо не изменялось (табл. 6.2.9).

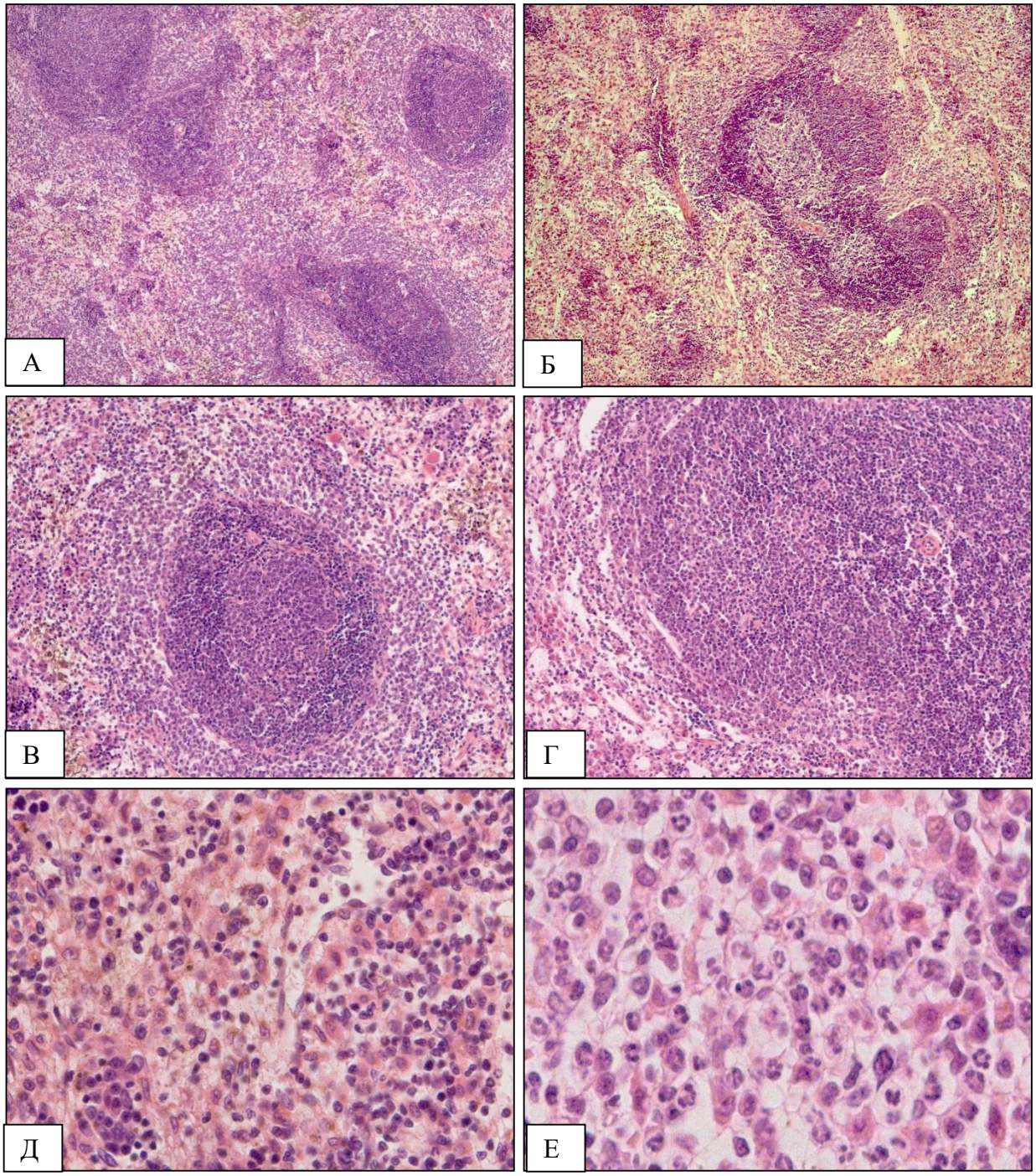


Рис. 6.2.4. Морфологическая характеристика селезенки у половозрелых самцов крыс Вистар контрольной группы (А, В, Д) и на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Б, Г, Е). *Контрольная группа*: А – белая пульпа представлена выраженной ПАЛМ-зоной и крупными лимфоидными узелками со светлыми центрами; В – лимфоидный узелок с крупным светлым центром и с широкой маргинальной зоной; Д – в строме красной пульпы небольшое число лимфоцитов. *1-е сут после введения ЛПС*: Б – ПАЛМ-зона представлена рыхло расположенными лимфоцитами; Г – лимфоидный узелок с широким светлым центром и узкой маргинальной зоной; Е – в строме красной пульпы нейтрофилы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. А, Б 100; В, Г 200; Д, Е 640

Таблица 6.2.7

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения	Объемная доля функциональных зон селезенки, %			Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	Объемная доля функциональных зон ЛУз селезенки, %	
	ПАЛМ-зона	ЛУз	БП		МЗ	ГЦ
Контрольная (n=10)	17,0 (15,2-18,2)	12,4 (11,8-14,4)	29,0 (27,4-34,2)	0,41 (0,38-0,53)	40,1 (36,7-43,9)	17,9 (11,3-24,6)
ЛПС 1-е сут (n=14)	18,8 (14,6-20,8)	11,6 (9,8-16,1)	29,2 (25,7-33,6)	0,43 (0,37-0,54)	12,8 (8,1-24,7)	61,0 (51,0-75,1)
Статистическая значимость различий (p)	0,86	0,52	0,67	0,83	0,0004	0,0003

Условные обозначения: ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Таблица 6.2.8

Содержание TGF-β в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов клетками селезенки, активированными КонА, у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Среда	Цитокины	Контрольная (n=8)	ЛПС 1-е сут (n=8)	Статистическая значимость различий (p)
Сыворотка, нг/мл	**TGF-β**	50,8 (42,9-63,9)	20,2 (19,3-29,4)	0,009
Культуральная жидкость клеток селезенки, пг/мл	**ИЛ-2**	3107 (2199-5200)	2094 (1313-2270)	0,039
	ИЛ-4	252 (220-356)	17,76 (16,47-17,86)	0,035
	ИФН-γ	421,9 (359,4-1164,2)	281,3 (206,5-320,3)	0,035
	ФНО-α	386,7 (221,0-417,5)	100,8 (56,5-156,0)	0,02

Таблица 6.2.9

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у половозрелых самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляции лимфоцитов	Относительное число, %		Абсолютное число, млн/мл	
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$43,5^{1*}$ (42,1-45,0)	$\mathbf{23,2^{2}}$ (18,0-29,0)	$7,1^{1}$ (4,4-9,3)	$\mathbf{3,1^{2}}$ (2,3-5,3)
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$55,6^{3}$ (48,7-57,4)	$\mathbf{70,2^{4}}$ (60,5-73,0)	$2,7^{3}$ (2,5-3,8)	$2,5^{4}$ (2,1-4,9)
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$42,6^{5}$ (39,2-44,3)	$\mathbf{28,6^{6}}$ (26,4-29,5)	$3,4^{5}$ (1,6-3,6)	$\mathbf{1,2^{6}}$ (0,6-2,4)
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$21,3^{7}$ (20,1-24,8)	$\mathbf{16,2^{8}}$ (13,0-24,8)	$3,5^{7}$ (2,3-4,4)	$3,6^{8}$ (3,4-4,7)
NK-клетки ($CD314^+$)	$5,55^{9}$ (2,9-9,6)	$\mathbf{28,3^{10}}$ (21,0-38,7)	$0,5^{9}$ (0,2-0,9)	$\mathbf{5,1^{10}}$ (3,3-10,4)
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$3,3^{11}$ (3,0-3,8)	$2,6^{12}$ (2,1-3,1)	$0,68^{11}$ (0,36-0,76)	$0,37^{12}$ (0,31-0,47)
Регуляторные Т-лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$3,8^{13}$ (3,1-4,7)	$\mathbf{2,4^{14}}$ (1,4-3,2)	$0,54^{13}$ (0,43-0,64)	$\mathbf{0,23^{14}}$ (0,14-0,36)
Статистически значимые различия, значения	$0,05^{1-2}$ $0,001^{3-4}$ $0,0005^{5-6}$ $0,045^{7-8}$	$0,0001^{9-10}$ $0,32^{11-12}$ $0,04^{13-14}$	$0,03^{1-2}$ $0,34^{3-4}$ $0,006^{5-6}$ $0,72^{7-8}$	$0,002^{9-10}$ $0,32^{11-12}$ $0,03^{13-14}$

Заключение

Таким образом, введение самцам крыс Вистар ЛПС в высокой дозе 15 мг/кг не приводит к изменению содержания общего тестостерона, эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови. Уровень эндотоксина на 1-е сут развития СВО увеличивается в 100 раз, а концентрация кортикостерона снижается в 1,5 раза.

На 1-е сут развития СВО в легких у самцов крыс Вистар развивается распространенный и выраженный интраальвеолярный отек и воспалительная реакция, которая характеризуется увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. В печени у самцов выявлены выраженные дистрофические изменения гепатоцитов, а у части животных ландшафтообразные некрозы, что сочетается повышением уровня активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови.

В ранние сроки развития СВО в тимусе у самцов выявлена акцидентальная инволюция II-III стадии, которая характеризуется наличием картины «звездного неба» и опустошением коркового вещества, сужением его субкапсулярной зоны. У части животных наблюдается инверсия слоев тимуса. В эти сроки в селезенке снижается объемная доля маргинальной зоны лимфоидных узелков, а размеры герминативных центров – увеличиваются, что свидетельствует об активации процессов миграции и пролиферации В-лимфоцитов.

На 1-е сут после введения ЛПС в периферической крови выявлено снижение количества регуляторных и цитотоксических Т-лимфоцитов и повышение числа NK-клеток. В эти сроки уровень продукции ИЛ-4, ФНО-α, ИЛ-2 и ИФН-γ клетками селезенки снижается.

6.3 Половые различия морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар

Сравнительная характеристика содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС у самок и самцов крыс Вистар в сыворотке крови концентрация эстрадиола, прогестерона и общего тестостерона статистически значимо не изменялась по сравнению с контрольной группой (табл. 6.3.1).

Таким образом, при развитии СВО в ответ на введение высокой дозы ЛПС у половозрелых самок и самцов различия в динамике изменений содержания половых гормонов не выявлены.

Таблица 6.3.1

Содержание половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдений		Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Общий тестостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=8)**	20,8 (14,5-27,8)[1*]	74,0 (12,0-95,0)[1]	0,77 (0,76-1,13)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	32,5 (25,9-38,1)[2]	22,5 (18,6-41,5)[2]	0,57 (0,32-0,91)[2]
Самцы	**Контрольная (n=7)**	24,6 (20,4-29,3)[3]	4,5 (4,2-6,1)[3]	1,29 (1,19-1,48)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=8)	19,8 (16,4-30,4)[4]	3,8 (3,3-4,3)[4]	1,61 (0,42-2,92)[4]
Статистическая значимость различий (p)		$0,39^{1-2}$ $0,57^{3-4}$ $0,85^{1-3}$ $0,06^{2-4}$	$0,38^{1-2}$ $0,1^{3-4}$ $0,033^{1-3}$ $0,01^{2-4}$	$0,38^{1-2}$ $0,37^{3-4}$ $0,033^{1-3}$ $0,117^{2-4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут СВО в легких у самцов и самок в просветах бронхов выявлялись зернистые эозинофильные массы, частично заполняющие просвет, и единичные десквамированные эпителиальные клетки. Межальвеолярные перегородки очагово утолщены, в них большое количество нейтрофилов (15-20 в поле зрения при ув. 400). Периваскулярные лимфатические щели расширены. У 3 из 10 самок (30%), и у 9 из 14 (64%) самцов наблюдался отек – небольшая часть просветов альвеол и альвеолярных ходов была заполнена гомогенными эозинофильными массами, эритроцитами и единичными лейкоцитами.

По данным морфометрического исследования на 1-е сут после введения ЛПС количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов и самок крыс Вистар было достоверно выше по сравнению со значениями контрольной группы (табл. 6.3.2, рис. 6.3.1). Однако между самцами и самками статистически значимых различий по этому показателю не выявлено.

Таблица 6.3.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (25 тыс. мкм^2)		
Самки	**Контрольная (n=10)**	1,64 (1,43-1,86)[1*]		
	ЛПС1-е сут (n=7)	23,6 (14,6-28,7)[2]		
Самцы	**Контрольная (n=10)**	2,55 (1,95-4,05)[3]		
	ЛПС1-е сут (n=8)	27,8 (24,0-32,6)[4]		
Статистическая значимость различий (p)		0,00001[1-2]	0,003[3-4]	0,057[1-3] 0,36[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

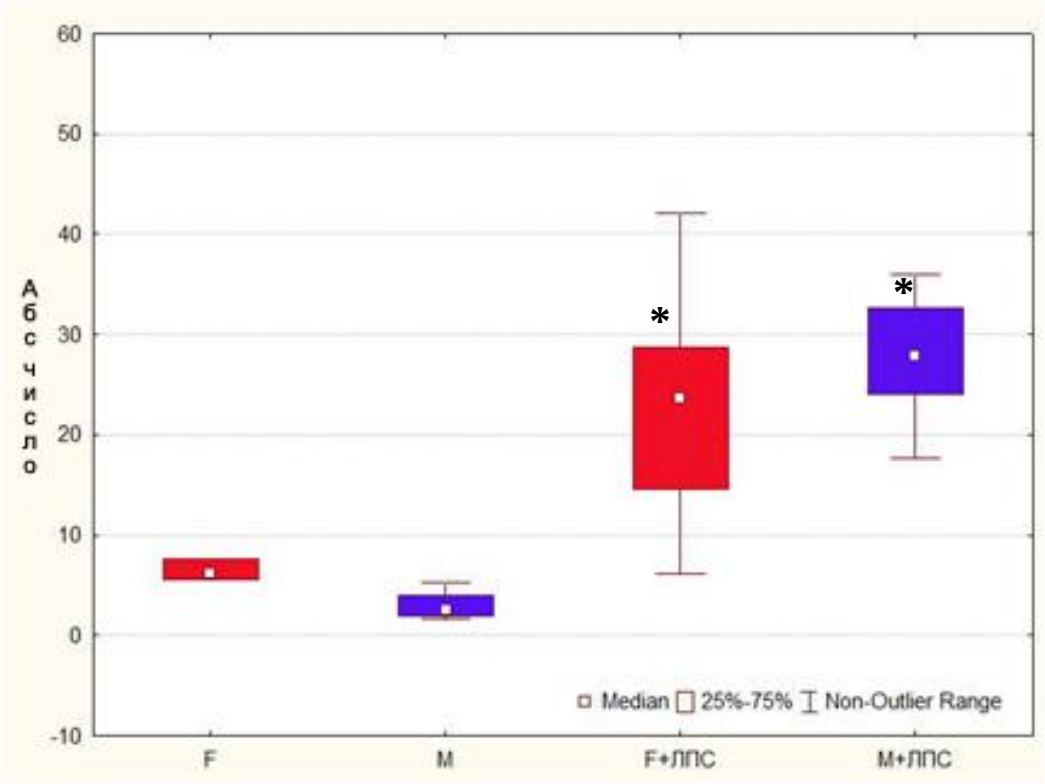


Рис. 6.3.1. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок (F) и самцов (M) крыс Вистар контрольной группы (F, M), на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (F+ЛПС, M+ЛПС). Различия статистически значимы: * - по сравнению с контрольной группой соответствующего пола

Сравнительная характеристика морфологических изменений печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сутки после введения высокой дозы ЛПС у самок и у самцов в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов - выраженная и распространенная дистрофия гепатоцитов. Очаги некрозов определялись у 4 самок из 10 и у 7 самцов из 14 в группе. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись единичные в поле зрения нейтрофилы. По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, в просвете отдельных из них определялись зернистые скопления, стазы и сладжи.

По данным морфометрической оценки выраженности дистрофических и некротических изменений в печени на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС половых различий выявлено не было. В эти сроки определялись очаговые некрозы у 50% животных в каждой группе. Показатели дистрофических и некротических изменений печени у самцов и самок на 1-е сут после введения ЛПС статистически значимо не различались (табл. 6.3.3).

Таблица 6.3.3

Полуколичественные показатели патологических изменений в печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)
Самки	**Контрольная (n=5)**	1,50 (1,00-2,50)[1*]
	ЛПС1-е сут (n=10)	3,00 (3,00-4,00)[2]
Самцы	**Контрольная (n=6)**	1,00 (0,50-1,50)[3]
	ЛПС1-е сут (n=14)	3,50 (2,00-4,00)[4]
Статистическая значимость различий (p)		0,002[1-2] 0,001[3-4] 0,44[1-3] 0,26[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у самок и самцов показатели активности АлАТ и АсАТ были статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой (табл. 6.3.4).

Таблица 6.3.4

Активность ферментов печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Ферменты печени, Е/л	
		АлАТ	АсАТ
Самки	Контрольная (n=10)	86 (72–97)[1*]	139 (98–166)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=5)	736 (96–2141)[2]	771 (160–2652)[2]
Самцы	Контрольная (n=9)	78 (69-87)[3]	103 (100-119)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=6)	297 (145-398)[4]	425 (188–604)[4]
Статистическая значимость различий (p)		$0,01^{1-2}$ $0,02^{3-4}$ $0,25^{1-3}$ $0,05^{2-4}$	$0,01^{1-2}$ $0,016^{3-4}$ $0,2^{1-3}$ $0,6^{2-4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у самцов наблюдалось статистически значимое увеличение содержания эндотоксина, показатели которого были выше значений в контрольной группе более чем в 100 раз. Введение высокой дозы ЛПС самкам привело к повышению уровня эндотоксина в 40 раз, и его показатели в эти сроки развития СВО были ниже, чем у самцов (табл. 6.3.5, рис. 6.3.2А).

В контрольной группе у самок содержание кортикостерона в сыворотке крови было статистически значимо выше чем у самцов (табл. 6.3.5). На 1-е сут после введения ЛПС у самцов наблюдалось снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови, тогда как у самок этот показатель статистически значимо не отличался от значений контрольной группы (табл. 6.3.5, рис. 6.3.2Б).

Таким образом, на 1-е сут развития СВО у самцов уровень эндотоксина увеличивался более чем в 200 раз, тогда как у самок эндотоксинемия была менее выраженной. Через сутки после введения ЛПС у самок в сыворотке крови концентрация кортикостерона не изменялась, а у самцов - снижалась.

Таблица 6.3.5

Показатели уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
Самки	**Контрольная (n=5)**	0,70 (0,53-0,75)[1]	58,59 (31,27-65,49)[1]
	ЛПС 1-е сут (n=6)	22,09 (33,63-100)[2]	33,15 (21,78-41,58)[2]
Самцы	**Контрольная (n=5)**	0,57 (0,48-0,66)[3]	25,53 (21,19-30,94)[3]
	ЛПС 1-е сут (n=7)	110 (105-125)[4]	18,76 (12,02-20,34)[4]
Статистическая значимость различий (p)		$0,001^{1-2}$ $0,004^{3-4}$ $0,22^{1-3}$ $0,0047^{2-4}$	$0,36^{1-2}$ $0,016^{3-4}$ $0,05^{1-3}$ $0,01^{2-4}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

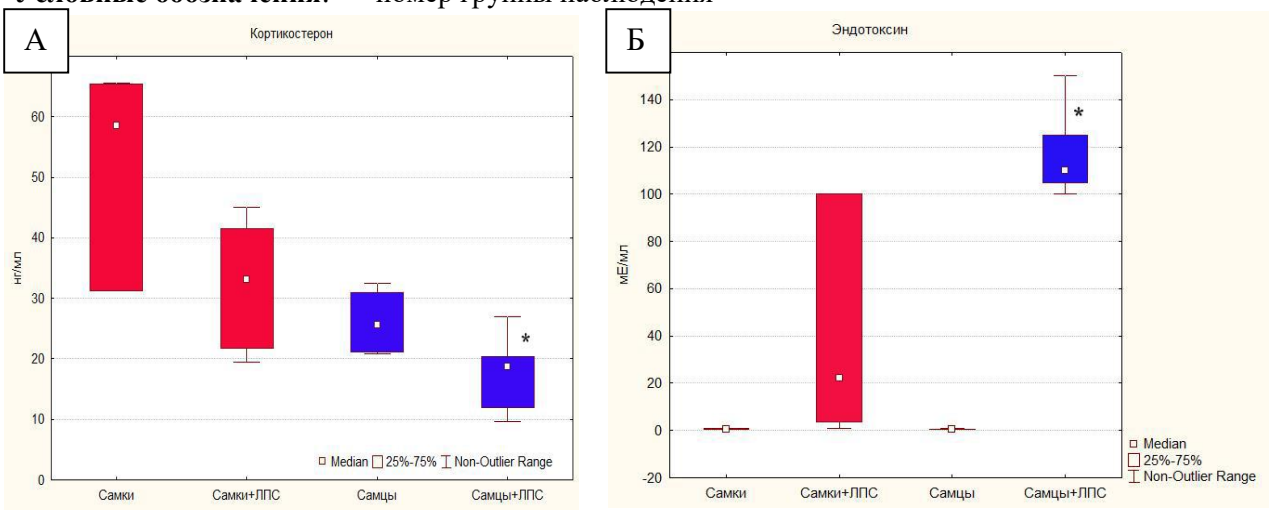


Рис. 6.3.2. Динамика уровня эндотоксина (А) и содержания кортикостерона (Б) в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар контрольной группы и на 1-е сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - группой самок на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самок и самцов в тимусе выявлялись признаки акцидентальной инволюции II–III стадии. В корковом веществе обнаруживалась картина «звездного неба», фрагменты ядер погибших клеток и фагоцитирующие их макрофаги. Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткими. Наблюдалось сужение коркового вещества тимуса, у большинства животных его субкапсулярная зона не

выявлялась (табл. 6.3.6, рис. 6.3.3). В корковом и мозговом веществе обнаруживались тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 концентрически расположенных эпителиальных клеток с накоплением кератогиалина в центре.

Таблица 6.3.6

Морфометрическая характеристика тимуса у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Объемная доля, %		Ширина субкапсулярной зоны, мкм
		КВ	МВ	
Самки	Контрольная (n=6)	49,16[1] (47,4-50,0)	50,83[1] (46-52,6)	35,75[1] (29,59-37,61)
	ЛПС 1-е сут (n=9)	32,81[2] (29,4-41,1)	67,19[2] (58,89-70,58)	0,00[2] (0,0-15,6)
Самцы	Контрольная (n=7)	55,19[3] (50,8-57,6)	44,81[3] (42,4-49,2)	25,75[3] (21,58-29,16)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	46,25[4] (39,4-53,3)	53,75[4] (46,7-60,6)	0,00[4] (0,0-0,0)
Статистическая значимость различий (p)		0,0025[1-2] 0,0015[3-4] 0,022[1-3] 0,057[2-4]	0,0025[1-2] 0,0015[3-4] 0,022[1-3] 0,057[2-4]	0,0001[1-2] 0,0001[3-4] 0,045[1-3] 0,81[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

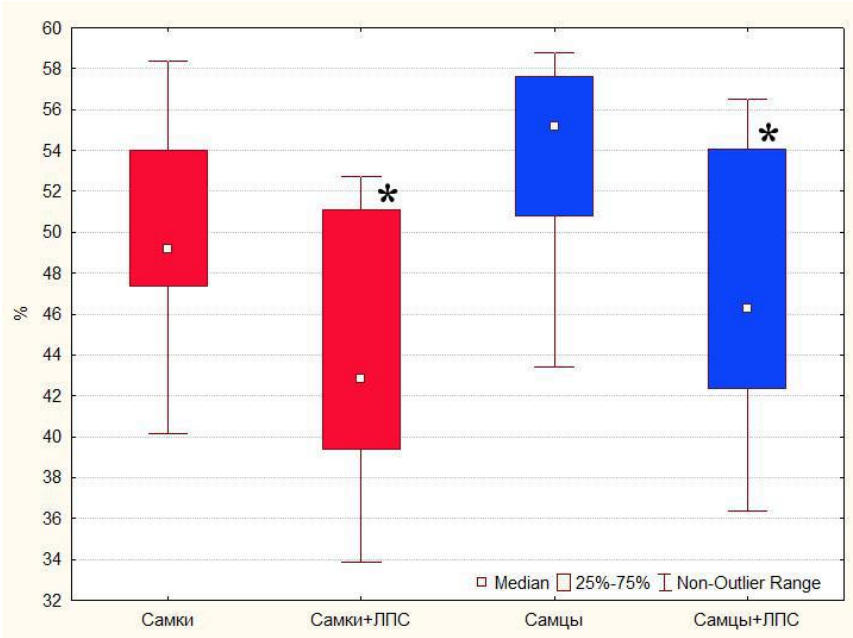


Рис. 6.3.3. Изменение объемной доли коркового вещества тимуса у половозрелых самцов и самок на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС. * - различия показателей статистически значимы по сравнению с контрольной группой соответствующего пола

Показатели относительного содержания апоптотически гибнущих клеток тимуса и CD3$^+$-лимфоцитов и число макрофагов в корковом веществе у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе у половозрелых самцов крыс Вистар увеличивалось по сравнению с контрольной группой. У самок изменения показателя содержания апоптотически гибнущих тимоцитов не выявлено. Половых различий числа апоптотически гибнущих тимоцитов на 1-е сут развития СВО обнаружено не было (табл. 6.3.7, рис. 6.3.4А).

Таблица 6.3.7

Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса и CD3$^+$-лимфоцитов и число макрофагов в корковом веществе, фагоцитирующих погибающие тимоциты, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток		Число макрофагов, фагоцитирующих гибнущие клетки
		Все клетки тимуса	CD3$^+$-лимфоциты	
Самки	**Контрольная группа (n=6)**	1,3 (1,1-1,3)[1]	11,9 (9,4-15,2)[1]	-
	ЛПС 1-е сут (n=6)	1,4 (0,4-1,6)[2]	9,4 (9,3-20,2)[2]	9,5 (9,0-13,6)
Самцы	**Контрольная группа (n=6)**	0,4 (0,1-1,0)[3]	11,8 (4,4-13,4)[3]	-
	ЛПС 1-е сут (n=6)	1,5 (0,9-2,3)[4]	10,5 (10,2-13,9)[4]	17,2 (14,2-18,4)
Статистическая значимость различий (p)		$0,84^{1-2}$ $0,04^{3-4}$ $0,05^{1-3}$ $0,61^{2-4}$	$0,055^{1-2}$ $0,99^{3-4}$ $0,48^{1-3}$ $0,72^{2-4}$	0,009

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Абсолютное число макрофагов, фагоцитирующих погибающие клетки в корковом веществе тимуса выше у самцов с СВО, чем у самок (табл. 6.3.7, рис. 6.3.4Б), что характеризует более выраженные процессы акцидентальной инволюции тимуса у самцов.

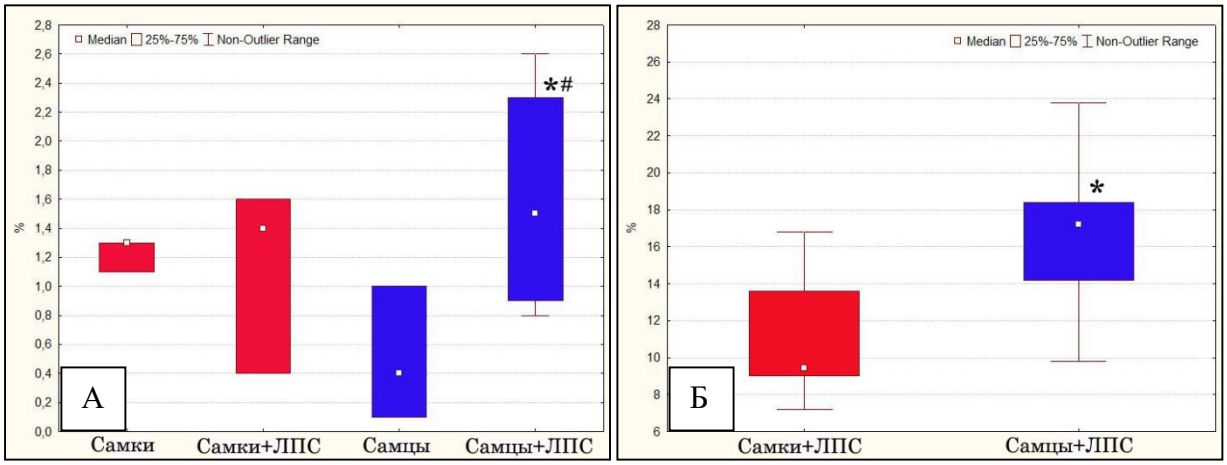


Рис. 6.3.4. Относительное содержание апоптотически гибнущих клеток тимуса (А) и число макрофагов, фагоцитирующих погибающие тимоциты в корковом веществе (Б), у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС. Различия показателей статистически значимы по сравнению с: (А) * - контрольной группой соответствующего пола, # - группой самок с СВО; (Б) * - группой самок с СВО

Сравнительная характеристика морфологических изменений в селезенке у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС в селезенке у самок крыс Вистар белая пульпа выражена, представлена ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками, у самцов – ПАЛМ-зона опустошена, лимфоциты вокруг сосудов располагаются в несколько рядов. В светлых центрах лимфоидных узелков селезенки у самок и самцов рыхло расположенные лимфоциты, лимфобласты, фрагменты ядер. Маргинальные зоны лимфоидных узелков у крыс обоего пола были узкими и состояли из 1-2 рядов клеток. В красной пульпе выраженное полнокровие сосудов, высокое число нейтрофилов, небольшое количество лимфоцитов.

По данным морфометрической оценки функциональных зон селезенки на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС у крыс Вистар обоего пола изменений показателей объемной доли белой и красной пульпы не обнаружено (табл. 6.3.8). Однако по сравнению с самками этот показатель у самцов с СВО был статистически значимо ниже. Объемная доля герминативных центров лимфоидных узелков селезенки у самцов и самок на 1-е сут после введения ЛПС повышалась, а маргинальной зоны – снижалась (табл. 6.3.8).

Таблица 6.3.8

Морфометрическая характеристика селезенки у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	Объемная доля функциональных зон селезенки, %			Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	Объемная доля функциональных зон ЛУз селезенки, %	
		ПАЛМ-зона	ЛУз	БП		МЗ	ГЦ
Самки	**Контрольная (n=9)**	$19,2^{1*}$ (18,4-24,8)	$15,0^{1}$ (12,4-20,0)	$38,4^{1}$ (31,2-41,8)	$0,63^{1}$ (0,45-0,76)	$40,8^{1}$ (35,0-43,2)	$15,5^{1}$ (7,6-18,6)
	ЛПС 1-е сут (n=10)	$19,6^{2}$ (17,2-22,0)	$16,7^{2}$ (13,4-23,4)	$34,6^{2}$ (29,8-43,4)	$0,55^{2}$ (0,44-0,81)	$22,9^{2}$ (10,2-27,5)	$66,6^{2}$ (60,9-69,3)
Самцы	**Контрольная (n=10)**	$17,0^{3}$ (15,2-18,2)	$12,4^{3}$ (11,8-14,4)	$29,0^{3}$ (27,4-34,2)	$0,41^{3}$ (0,38-0,53)	$40,1^{3}$ (36,7-43,9)	$17,9^{3}$ (11,3-24,6)
	ЛПС 1-е сут (n=14)	$18,8^{4}$ (14,6-20,8)	$11,6^{4}$ (9,8-16,1)	$29,2^{4}$ (25,7-33,6)	$0,43^{4}$ (0,37-0,54)	$12,8^{4}$ (8,1-24,7)	$61,0^{4}$ (51,0-75,1)
Статистическая значимость различий (p)		$0,73^{1-2}$ $0,86^{3-4}$ $0,06^{1-3}$ $0,46^{2-4}$	$0,63^{1-2}$ $0,52^{3-4}$ $0,1^{1-3}$ $0,02^{2-4}$	$0,73^{1-2}$ $0,67^{3-4}$ $0,02^{1-3}$ $0,03^{2-4}$	$0,92^{1-2}$ $0,83^{3-4}$ $0,02^{1-3}$ $0,07^{2-4}$	$0,001^{1-2}$ $0,0004^{3-4}$ $0,87^{1-3}$ $0,39^{2-4}$	$0,0006^{1-2}$ $0,0003^{3-4}$ $0,26^{1-3}$ $0,55^{2-4}$

Условные обозначения. ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры. * - номер группы наблюдения

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у самок и самцов выявлено снижение уровня продукции ИЛ-4 и ФНО-α, однако супрессия продукции ИЛ-4 в культуре клеток селезенки у самцов было более выражена, чем у самок. Содержание ИЛ-2 и ИФН-γ в ответ на введение высокой дозы ЛПС у самок статистически значимо не изменялось, тогда как у самцов выявлено снижение этих показателей (табл. 6.3.9, рис. 6.3.5).

Таблица 6.3.9

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	Группа наблюдения	TGF-β	ИЛ-2	ИЛ-4	ИФН-γ	ФНО-α
Самки	Контрольная (n=8)	79,0[1*] (63,2-81,9)	4700[1] (4000-5600)	300[1] (284-344)	378,9[1] (339,8-425,8)	452,6[1] (308,3-624,0)
	ЛПС 1-е сут (n=8)	37,2[2] (17,5-41,0)	5400[2] (5100-5400)	86,83[2] (46,04-127,1)	375,0[2] (320,3-421,9)	172,7[2] (135,7-202,4)
Самцы	Контрольная (n=8)	50,8[3] (43,0-64,0)	3107[3] (2199-5200)	252[3] (220-356)	421,9[3] (359,4-1164,2)	386,7[3] (221,0-417,5)
	ЛПС 1-е сут (n=8)	20,2[4] (19,3-29,4)	2094[4] (1313-2270)	17,76[4] (16,47-17,86)	281,3[4] (206,5-320,3)	100,8[4] (56,5-156,0)
Статистическая значимость различий (p)		0,009[1-2] 0,009[3-4] 0,117[1-3] 0,75[2-4]	0,5[1-2] 0,035[3-4] 0,7[1-3] 0,008[2-4]	0,0057[1-2] 0,039[3-4] 0,39[1-3] 0,007[2-4]	0,71[1-2] 0,035[3-4] 0,7[1-3] 0,39[2-4]	0,023[1-2] 0,02[3-4] 0,4[1-3] 0,09[2-4]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в периферической крови выявлено повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение – регуляторных Т-лимфоцитов. Относительное и абсолютное число Т-цитотоксических лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов в периферической крови у самок статистически значимо не изменялось, тогда как у самцов наблюдалось снижение Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 6.3.10, рис. 6.3.6).

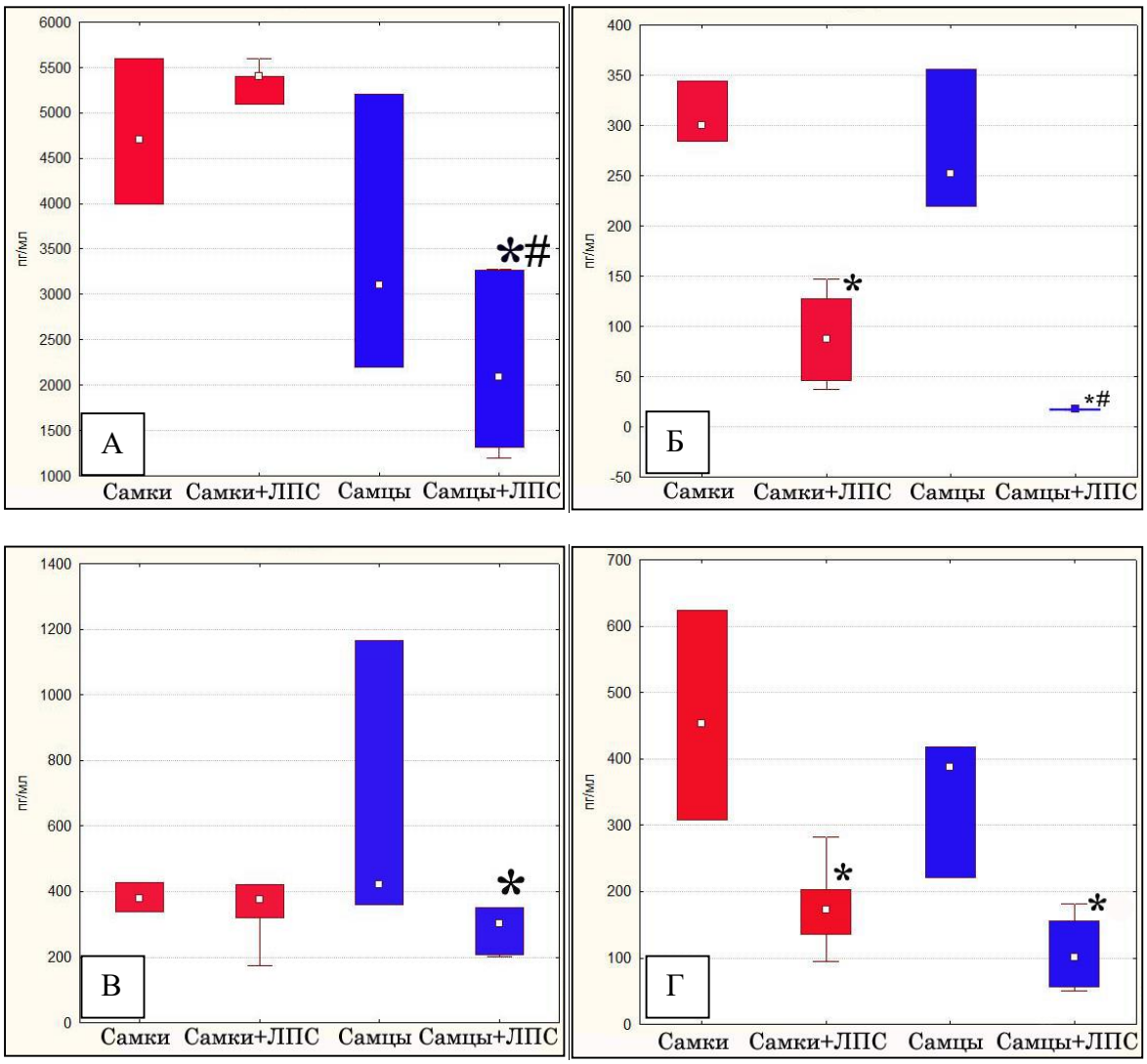


Рис. 6.3.5. Содержание ИЛ-2 (А), ИЛ-4 (Б), ИФН-γ (В), ФНО-α (Г) в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%). Различия статистически значимы по сравнению с: * - контрольной группой соответствующего пола; # - группой самок с СВО

Таблица 6.3.10

Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Относительное количество, %	Самки		Самцы		p
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=6)	
Т-лимфоциты (CD3+)	43,8[1*] (37,2-51,1)	39,4[2] (30,7-52,7)	43,5[1*] (42,1-45,0)	**23,2[2]** (18,0-29,0)	0,0008[2-2]
Т-хелперы (CD3+CD4+)	54,7[3] (51,9-64,8)	65,2[4] (37,6-67,4)	55,6[3] (48,7-57,4)	70,2[4] (60,5-73,0)	0,015[4-4]
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	38,8[5] (30,4-45,0)	32,55[6] (26,8-46,3)	42,6[5] (39,2-44,3)	**28,6[6]** (26,4-29,5)	0,003[6-6]
В-лимфоциты (CD45+)	20,8[7] (20,0-25,9)	18,2[8] (15,5-22,4)	21,3[7] (20,1-24,8)	16,2[8] (13,0-24,8)	
NK-клетки (CD314+)	4,9[9] (3,0-6,1)	**26,3[10]** (16,2-52,2)	5,55[9] (2,9-9,6)	**28,3[10]** (21,0-38,7)	
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	3,2[11] (2,3-3,7)	4,1[12] (2,8-5,0)	3,3[11] (3,0-3,8)	2,6[12] (2,1-3,1)	
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	3,4[13] (3,2-4,6)	**2,2[14]** (1,5-2,7)	3,8[13] (3,1-4,7)	**2,4[14]** (1,4-3,2)	
Статистически значимые различия, значения	0,74[1-2] 0,47[3-4] 0,78[5-6] 0,26[7-8]	0,0002[9-10] 0,32[11-12] 0,002[13-14]	0,05[1-2] 0,001[3-4] 0,0005[5-6] 0,045[7-8]	0,0001[9-10] 0,32[11-12] 0,04[13-14]	

Абсолютное количество, млн/мл	Самки		Самцы		p
	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=9)	Контрольная (n=10)	ЛПС (n=6)	
Т-лимфоциты (CD3+)	6,8[1] (3,7-7,9)	7,2[2] (5,3-8,9)	7,1[1] (4,4-9,3)	**3,1[2]** (2,3-5,3)	0,01[2-2]
Т-хелперы (CD3+CD4+)	3,7[3] (2,3-4,2)	3,4[4] (2,7-4,5)	2,7[3] (2,5-3,8)	2,5[4] (2,1-4,9)	
Т-цитотоксические (CD3+CD8a+)	3,2[5] (2,0-4,0)	3,4[6] (1,6-4,3)	3,4[5] (1,6-3,6)	**1,2[6]** (0,6-2,4)	0,009[6-6]
В-лимфоциты (CD45+)	3,1[7] (2,1-4,6)	2,7[8] (1,7-3,4)	3,5[7] (2,3-4,4)	3,6[8] (3,4-4,7)	
NK-клетки (CD314+)	0,5[9] (0,2-0,9)	**4,7[10]** (2,5-8,4)	0,5[9] (0,2-0,9)	**5,1[10]** (3,3-10,4)	
Активированные Т-хелперы (CD4+CD25+Foxp3-)	0,43[11] (0,38-0,51)	0,65[12] (0,40-0,91)	0,68[11] (0,36-0,76)	0,37[12] (0,31-0,47)	
Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+Foxp3+)	0,51[13] (0,33-0,55)	**0,23[14]** (0,088-0,44)	0,54[13] (0,43-0,64)	**0,23[14]** (0,14-0,36)	
Статистически значимые различия, значения	0,15[1-2] 0,84[3-4] 0,91[5-6] 0,38[7-8]	0,001[9-10] 0,46[11-12] 0,04[13-14]	0,03[1-2] 0,34[3-4] 0,006[5-6] 0,72[7-8]	0,002[9-10] 0,32[11-12] 0,03[13-14]	

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

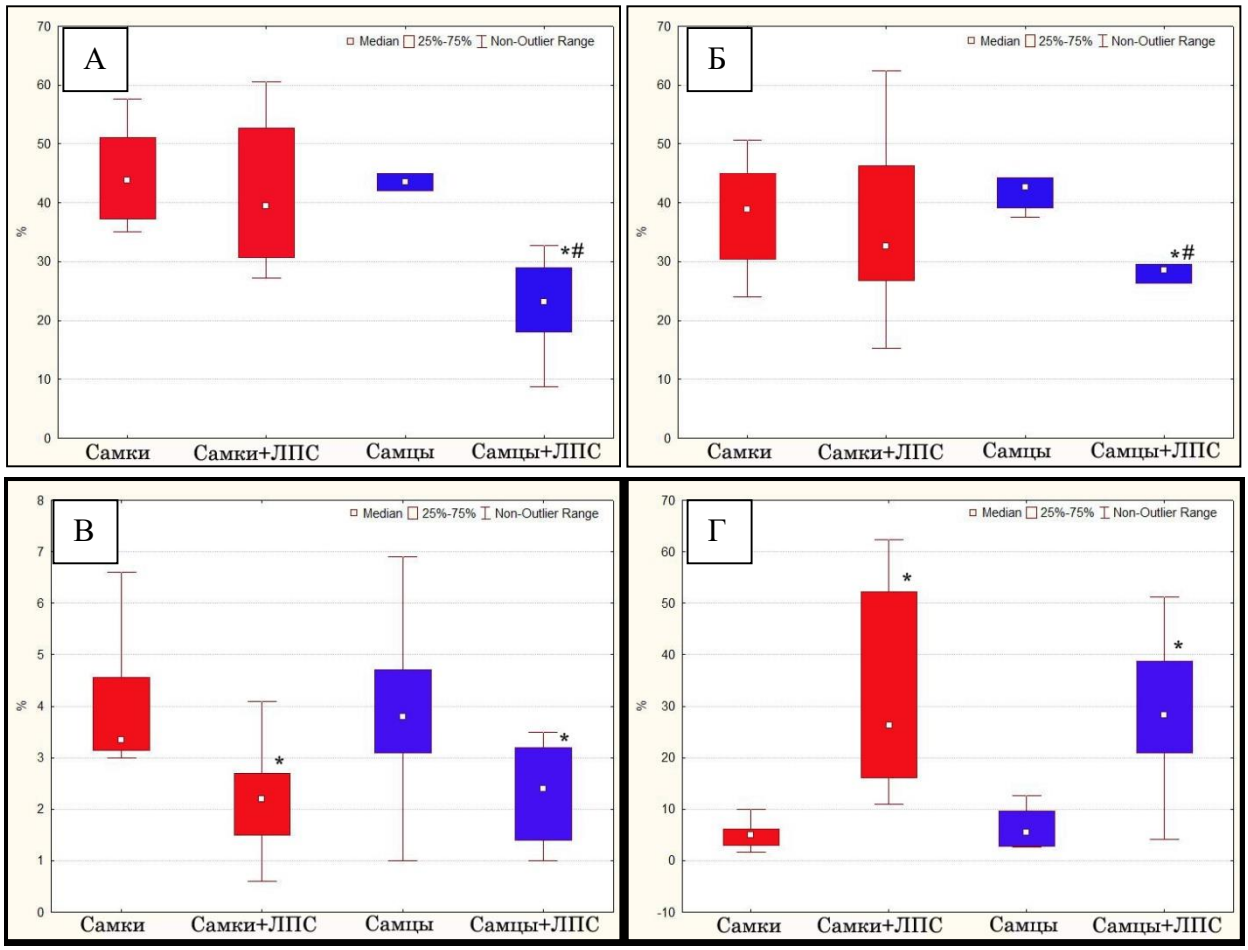


Рис. 6.3.6. Изменения относительного количества Т-лимфоцитов $CD3^+$ (А), цитотоксических Т-лимфоцитов $CD3^+CD8^+$ (Б), регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (В) и NK клеток (Г) в периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС

Заключение

При введении высокой дозы ЛПС, являющейся для половозрелых крыс Вистар сублетальной, у самок и самцов не обнаружено изменения содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови. В легких и печени у крыс обоего пола наблюдались выраженные воспалительные изменения, которые характеризовались увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и наличием ландшафтообразных некрозов и выраженных дистрофических изменений в печени. В тимусе у самок и самцов в эти сроки определялась акцидентальная инволюция II-III стадии с опустошением его коркового вещества и субкапсулярной зоны. В селезенке у крыс обоего пола наблюдалось сужение маргинальных зон лимфоидных узелков и расширение их светлых центров. В ответ на введение высокой дозы ЛПС в культуре клеток селезенки у самок и самцов крыс Вистар была выявлена супрессия продукции ИЛ-4 и ФНО-α, а в периферической крови – снижение количества Т-регуляторных лимфоцитов и увеличение NK клеток.

По сравнению с самками в сыворотке крови у самцов на 1-е сут после введения ЛПС была выявлена выраженная эндотоксинемия, которая сопровождалась снижением концентрации кортикостерона. В тимусе у самцов количество апоптотически гибнущих клеток и число макрофагов, фагоцитирующих погибшие лимфоциты, было выше, чем у самок. В селезенке более выраженное сужение маргинальной зоны лимфоидных узелков было выявлено у самок, что сопровождалось повышением продукции клетками селезенки ИЛ-2, тогда как у самцов концентрация ИЛ-2 и ИФН-γ, напротив, уменьшалась. В периферической крови у самцов наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических. Выявленные иммунологические изменения свидетельствует о более выраженной супрессии реакций иммунного ответа у самцов по сравнению с самками.

6.4 Обсуждение

Введение самкам и самцам крыс Вистар ЛПС в высокой дозе 15 мг/кг привело к гибели 56% животных, поэтому эта доза для животных этой возрастной группы является сублетальной. На 1-е сут после введения ЛПС у выживших животных выявлены патологические изменения в органах-мишенях и тимусе, которые сопоставимы с характерными изменениями при сепсисе.

При введении высокой дозы ЛПС у самок и самцов не обнаружено изменений содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови. Концентрация иммуносупрессорного кортикостерона в сыворотке крови у самцов снижалась, а у самок не изменялась. Синтез половых стероидов главным образом осуществляется в гонадах. По данным литературы введение экспериментальным животным низкой дозы ЛПС (4мг/кг) приводит к снижению концентрации тестостерона в сыворотке крови, увеличению перекисного окисления липидов и уровня продукции провоспалительных цитокинов в тестикулах (Li L. et al., 2013). В ответ на введение ЛПС самкам наблюдается снижение синтеза эстрадиола клетками гранулезы яичников (Shimizu T. et al., 2012). Однако при введении высокой дозы ЛПС у самок и самцов крыс Вистар нами не было выявлено изменения половых стероидов.

По данным литературы при экспериментальном перитоните, сопровождающимся развитием СВО, в надпочечниках повышается число нейтрофилов на фоне снижения количества дендритных клеток и макрофагов, что сочетается с выраженными альтеративными изменениями в виде обширных некрозов коркового и мозгового вещества этого органа (Jennewein C. et al., 2016). M.L. von Bruhl и соавт. (2012) показано, что ROS (reactive oxygen species) и протеолитические ферменты нейтрофилов приводят к повреждению клеток надпочечников при сепсисе, что коррелирует со снижением синтеза глюкокортикоидных гормонов. Дефенсины, секретируемые нейтрофилами, ингибируют АКТГ-зависимую стимуляцию синтеза адренокортикотропных гормонов, в частности кортикостерона (Kanczkowski W. et al., 2016).

Таким образом, длительная и выраженная инфильтрация нейтрофилами надпочечников приводит к снижению содержания этого гормона в сыворотке крови (Kanczkowski W. et al., 2013), что и было выявлено нами у самцов.

Через сутки после введения ЛПС как у самцов, так и у самок наблюдалась выраженная эндотоксинемия, причем у самок уровень эндотоксина в сыворотке крови повышался в 100 раз, а у самцов – в 200. Резкое увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови у больных сепсисом коррелирует с показателями шкалы APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, шкала оценки острых и хронических функциональных изменений II) и, соответственно, с тяжестью течения и показателями летальности (Marshall J.C. et al., 2004).

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС в легких и печени у крыс обоего пола наблюдались выраженные воспалительные изменения, которые характеризовались увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и наличием в печени ландшафтообразных некрозов и выраженных дистрофических изменений. Как показано в клинических исследованиях A. Koch и соавт. (2013), на ранних сроках развития сепсиса и ССВО уровень эндотоксина коррелирует со скоростью и выраженностью тромбообразования, что, в последующем, приводит к развитию ДВС-синдрома, патологическим изменениям в органах-мишенях и полиорганной недостаточности. A. Sharma и соавт. (2015) показано, что при экспериментальном перитоните в легких у мышей в течение 20 ч резко увеличивается число нейтрофилов на фоне снижения числа $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов.

В тимусе у самок и самцов в эти сроки определялась акцидентальная инволюция II-III стадии с опустошением его коркового вещества и субкапсулярной зоны. Выявленные морфологические изменения связаны со снижением количества незрелых Т-лимфоцитов в корковом веществе тимуса, - двойных негативных ($CD4^-CD8^-$) и двойных позитивных ($CD4^+CD8^+$) лимфоцитов (Sharma A. et al., 2015). Однако нами показано, что в тимусе у самцов количество апоптотически гибнущих клеток и число макрофагов, фагоцитирующих погибшие лимфоциты, было выше, чем у самок, что отражает более выраженные иммунологические нарушения у самцов.

В селезенке у крыс обоего пола наблюдалось сужение маргинальных зон лимфоидных узелков и расширение их светлых центров, тогда как объемная доля белой пульпы статистически значимо не изменялась. На экспериментальных моделях в ранние сроки (от 20 часов до 5 дней) развития ССВО и сепсиса показано опустошение белой пульпы селезенки, что характеризовалось снижением числа $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, в частности за счет апоптотической гибели Т-клеток (Unsinger L. et al., 2009; Aziz M. et al., 2014). Однако нами не было выявлено изменений объемных долей Т-зависимой ПАЛМ-зоны, что, по-видимому, связано с активацией миграции Т-лимфоцитов из тимуса в селезенку. Тогда как при введении высокой дозы ЛПС наблюдались

реактивные изменения В-зоны селезенки: обнаружено сужение маргинальной зоны лимфоидных узелков и расширение их герминативных центров. Как было отмечено выше, маргинальная зона лимфоидных узелков селезенки представлена преимущественно В1-лимфоцитами, которые постоянно мигрируют из маргинальной зоны в красную пульпу для захвата антигена, и обратно, в лимфоидные узелки для последующей презентации его В-клеткам (Bronte V., Pittet M.J., 2013). Более выраженные изменения В-зоны селезенки на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС были выявлены у самок, как и при развитии СВО в ответ на введение низкой дозы ЛПС, что, по-видимому, связано с иммуностимулирующим действием эстрадиола на В-лимфоциты (Lu F.X. et al., 2002).

В ответ на введение высокой дозы ЛПС в культуре клеток селезенки у самцов крыс Вистар была выявлена супрессия продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ и ФНО-α, тогда как у самок на фоне снижения ИЛ-4 и ФНО-α наблюдалось повышение ИЛ-2. Уменьшение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ и ФНО-α у самцов, по-видимому, отражает снижение функциональной активности лимфоцитов и других клеток селезенки в ответ на введение высокой дозы ЛПС (Luan Y.Y. et al., 2014). Согласно полученным данным по сравнению с самцами у самок активность компонентов врожденного иммунитета более высокая, что характеризуется менее выраженной супрессией продукции цитокинов клетками селезенки, и увеличением уровня секреции ИЛ-2.

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС в периферической крови у самцов и самок было выявлено снижение количества Т-регуляторных лимфоцитов и увеличение NK клеток. Согласно данным литературы в развитии сепсиса выделяют две фазы: фазу активации иммунного ответа с продукцией провоспалительных цитокинов и реализацией реакций клеточного звена врожденного иммунитета (ССВО или SIRS) и фазу иммуносупрессии (синдром компенсаторного провоспалительного ответа или CARS), которая проявляется в снижении продукции провоспалительных цитокинов, активацией апоптоза лимфоцитов и снижение их пролиферации (Hirsiger S. et al., 2012; Luan Y.Y. et al., 2012; Fang H. et al., 2015). Однако границу между этими фазами определить довольно сложно как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях: активация реакций врожденного иммунитета сопровождается иммуносупрессией. Через сутки после введения ЛПС на фоне снижения Т-регуляторных лимфоцитов и повышения числа NK клеток, что характеризует активацию реакций врожденного иммунитета, в периферической крови у самцов наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических, что свидетельствует о более выраженной иммуносупресии по сравнению с самками.

Таким образом, через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самок и самцов крыс Вистар на фоне эндотоксинемии развиваются воспалительные и патологические изменения в органах-мишенях, которые более выражены у самцов. В тимусе наблюдается акцидентальная

инволюция II-III стадий, опустошение коркового вещества за счет увеличения числа апоптотически гибнущих лимфоцитов и фагоцитирующих их макрофагов. Однако более выраженные иммунологические нарушения в тимусе нами были выявлены у самцов.

На 1-е сут после введения ЛПС в селезенке как у самцов, так и у самок морфологических изменений Т-зависимой ПАЛМ-зоны выявлено не было, тогда как в В-зоне наблюдалось сужение маргинальной зоны лимфоидных узелков и расширение их светлых центров, более выраженное у самок. Морфологические изменения, выявленные в селезенке у самок, сопровождались повышением продукции ИЛ-2, и снижением – ИЛ-4 и ФНО-α. Тогда как у самцов концентрация ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ и ФНО-α в культуре клеток селезенки уменьшалась. В периферической крови у самцов по сравнению с самками наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических, что свидетельствует о более выраженной супрессии реакций врожденного иммунитета у самцов.

6.5 Сравнительная характеристика половых различий морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар при введении низкой и высокой дозы ЛПС

С целью моделирования СВО разной тяжести самкам и самцам половозрелых крыс Вистар внутрибрюшинно вводили ЛПС в двух дозах: низкой – 1,5 мг/кг, вызывающей развитие патологических изменений в органах-мишенях, и высокой – 15 мг/кг, сублетальной. Проводили сравнительную оценку половых различий морфологических проявлений и иммунологических нарушений при СВО, вызванном введением ЛПС в двух дозах.

Сравнительная характеристика содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС у самок крыс Вистар наблюдалось увеличение содержания в сыворотке крови прогестерона и общего тестостерона, тогда как концентрация эстрадиола статистически значимо снижалась по сравнению с контрольной группой (табл. 6.5.1). После введения низкой дозы ЛПС у самцов снижалась концентрация только общего тестостерона, показатели содержания двух других стероидных гормонов не изменялись (табл. 6.5.1).

При введении высокой дозы ЛПС самкам и самцам изменений содержания всех исследуемых половых стероидных гормонов в сыворотке крови не выявлено (табл. 6.5.1).

Таблица 6.5.1

Изменения содержания половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС по сравнению с контрольными группами

Гормоны	**ЛПС 1,5 мг/кг**		**ЛПС 15 мг/кг**	
	Самки	**Самцы**	**Самки**	**Самцы**
Эстрадиол	↓ в 1,6 раза	не изм.	не изм.	не изм.
Тестостерон	↑ в 5,8 раза	↓ в 56,5 раз	не изм.	не изм.
Прогестерон	↑ в 4,7 раза	не изм.	не изм.	не изм.

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС в межальвеолярных перегородках легких при ув. 400 в них определялось 5-13 нейтрофилов в поле зрения. У 3 из 7 самок (43%), и у 7 из 8 самцов (88%) выявлялся отек легких.

По сравнению с низкой дозой через сутки после введения высокой дозы ЛПС в утолщенных межальвеолярных перегородках легких число нейтрофилов было более высоким и составляло 15-20 полиморфноядерных лейкоцитов в поле зрения при ув. 400. Интраальвеолярный отек был менее распространенным и выявлялся относительно реже: у 3 из 10 самок (30%), и у 9 из 14 самцов (64%).

Как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС интраальвеолярный отек выявлялся чаще у самцов. Воспалительная реакция, характеризующаяся увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, была более выражена через сутки после введения ЛПС в высокой дозе, однако половых различий по этому показателю выявлено не было (табл. 6.5.2). Тогда как при введении низкой дозы ЛПС, количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов было статистически значимо выше по сравнению с самками (табл. 6.5.2).

Таблица 6.5.2

Показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	**Группа наблюдения**	**Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (25 тыс. мкм2)**		
Самки	**Контрольная (n=10)**	1,64 (1,43-1,86)[1]*		
	ЛПС 1,5 мг/кг (n=7)	5,71 (4,71-7,57)[2]		
	ЛПС 15 мг/кг (n=10)	23,6 (14,6-28,7)[3]		
Самцы	**Контрольная (n=10)**	1,43 (1,43-2,00)[4]		
	ЛПС 1,5 мг/кг (n=8)	10,29 (8,14-13,86)[5]		
	ЛПС 15 мг/кг (n=14)	27,8 (24,0-32,6)[6]		
Статистическая значимость различий (p)		0,00001[1-2] 0,00001[1-3] 0,009[2-3]	0,0027[4-5] 0,0003[4-6] 0,0007[5-6]	0,631[1-4] 0,0022[2-5] 0,36[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика морфологических изменений в печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сутки после введения ЛПС в низкой дозе у самок и самцов в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов - выраженная и распространенная дистрофия клеток печени, особенно на периферии долек. У 1 самки и 1 самца из 7 в группе определялись очаги некрозов. Показатели дистрофических и некротических изменений печени у самцов и самок на 1-е сут после введения ЛПС статистически значимо не отличались (табл. 6.5.3).

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самок и у самцов в печени выявлялась выраженная и распространенная дистрофия клеток печени. Очаги некрозов определялись у 4 самок из 10 (40%) и у 7 самцов из 14 (50%) в группе. Также как и при введении низкой дозы ЛПС через сутки после введения высокой дозы показатели дистрофических и некротических изменений печени у самцов и самок статистически значимо не различались (табл. 6.5.3).

Таблица 6.5.3

Полуколичественные показатели патологических изменений в печени у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС (Me; 25-75%)

Пол	**Группа наблюдения**	**Показатель дистрофических и некротических изменений гепатоцитов (баллы)**		
Самки	**Контрольная (n=10)**	1,50 (1,00-2,50)[1*]		
	ЛПС 1,5 мг/кг (n=7)	3,00 (2,00-3,00)[2]		
	ЛПС 15 мг/кг (n=10)	3,00 (3,00-4,00)[3]		
Самцы	**Контрольная (n=8)**	1,00 (0,50-1,50)[4]		
	ЛПС 1,5 мг/кг (n=7)	2,00 (2,00-2,20)[5]		
	ЛПС 15 мг/кг (n=14)	3,50 (2,00-4,00)[6]		
Статистическая значимость различий (p)		0,0032[1-2] 0,02[1-3] 0,01[2-3]	0,0048[4-5] 0,01[4-6] 0,01[5-6]	0,4474[1-4] 0,26[2-5] 0,26[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Сравнительная характеристика активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в низкой дозе в сыворотке крови у самцов показатели активности АлАТ и АсАТ повышались по сравнению с контрольной группой, а у самок, наоборот, - снижались (рис. 6.5.1). При введении высокой дозы ЛПС показатели активности АлАТ и АсАТ были статистически значимо выше значений контрольных групп как у самцов, так и у самок, что свидетельствует о более выраженных патологических изменениях в печени при введении ЛПС в дозе 15 мг/кг (рис. 6.5.1).

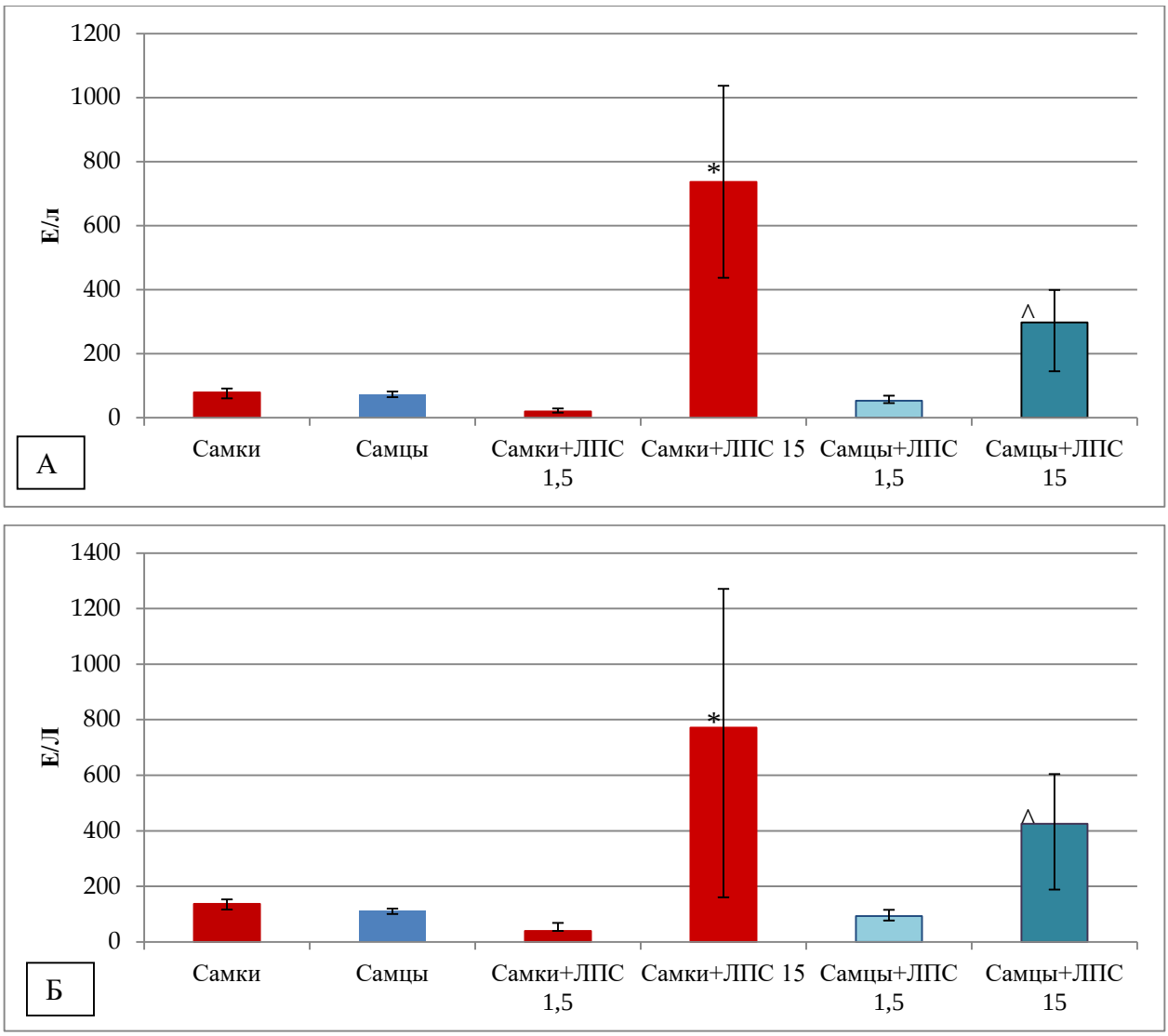


Рис. 6.5.1. Изменение уровня активности АлАТ (А) и АсАТ (Б) в сыворотке крови у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг и 15 мг/кг. Различия статистически значимы по сравнению с: * - группой самок, которым вводили ЛПС в дозе 1,5 мг/кг; ^ – группой самцов, которым вводили ЛПС в дозе 1,5 мг/кг

Сравнительная характеристика уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в низкой дозе в сыворотке крови у самцов наблюдалось статистически значимое увеличение уровня эндотоксина. Напротив, у самок введение низкой дозы ЛПС не привело к изменениям содержания эндотоксина (табл. 6.5.4). Через сутки после введения высокой дозы ЛПС в сыворотке крови как у самцов, так и у самок наблюдалось выраженное увеличение уровня эндотоксина по сравнению с группами животных, которым вводили низкую дозу ЛПС. Показатели эндотоксина у самцов были выше значений в

контрольной группе более чем в 100 раз, а у самок – в 40 раз. Уровень эндотоксина в сыворотке крови у самок с СВО был ниже, чем у самцов.

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС увеличение содержания кортикостерона в сыворотке крови было выявлено только у самок, тогда как у самцов показатели концентрации этого гормона статистически значимо не изменялись (табл. 6.5.4). На 1-е сут развития СВО концентрация кортикостерона в сыворотке крови у самок было статистически значимо выше, чем у самцов. Через сутки после введения ЛПС в высокой дозе у самцов наблюдалось снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови, тогда как у самок этот показатель статистически значимо не отличался от значений контрольной группы (табл. 6.5.4).

Таким образом, по сравнению с введением низкой дозы ЛПС развитие СВО, индуцированное высокой дозой ЛПС сопровождается выраженным увеличением эндотоксина как у самцов, так и у самок, причем уровень его выше в сыворотке крови у самцов. Введение низкой дозы ЛПС приводит к повышению содержания кортикостерона только у самок, тогда как при введении высокой дозы ЛПС наблюдается снижение концентрации этого гормона только у самцов.

Таблица 6.5.4

Изменения уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС по сравнению с контрольными группами

	1,5 мг/кг		**15 мг/кг**	
	Самки	**Самцы**	**Самки**	**Самцы**
Эндотоксин	не изм.	↑ в 2,9 раза	↑ в 31,6 раз	↑ в 183 раза
Кортикостерон	↑ в 1,7 раза	не изм.	не изм.	↓ в 1,4 раза

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

Через сутки после введения низкой дозы ЛПС в тимусе у самок и самцов выявлялись признаки акцидентальной инволюции I–II стадий. При морфометрической оценке изменений в тимусе у самок на 1-е сут развития СВО было обнаружено расширение коркового вещества, а у самцов статистически значимых различий объемной доли коркового вещества по сравнению с контрольной группой выявлено не было (табл. 6.5.5). У крыс обоего пола в этот срок наблюдалось расширение субкапсулярной зоны тимуса.

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у самок и самцов в тимусе выявлялись признаки акцидентальной инволюции более поздних II–III стадий. Наблюдалось сужение коркового вещества тимуса, как у самцов, так и у самок. Субкапсулярная зона у большинства животных не выявлялась (табл. 6.5.5).

Таблица 6.5.5

Изменения объемной доли коркового вещества тимуса и ширины субкапсулярной зоны у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС по сравнению с контрольными группами

	1,5 мг/кг		**15 мг/кг**	
	Самки	**Самцы**	**Самки**	**Самцы**
Объемная доля КВ	↑ в 1,2 раза	не изм.	↓ в 1,5 раза	↓ в 1,2 раза
СКЗ	↑ в 1,3 раза	↑ в 1,6 раза	↓ в 15 раза	↓ в 20 раз

Условные обозначения: КВ – корковое вещество; СКЗ – субкапсулярная зона

Таким образом, на 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС у самцов по сравнению с самками выявлена акцидентальная инволюция более поздней II стадии. При введении высокой дозы ЛПС в тимусе как у самцов, так и у самок выявлена акцидентальная инволюция II-III стадий, причем у самцов проявления акцидентальной инволюции более выражены.

Показатели относительного содержания апоптотически гибнущих клеток тимуса и $CD3^+$-лимфоцитов у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС относительное содержание апоптотически гибнущих клеток в тимусе у половозрелых самок и самцов крыс Вистар увеличивалось по сравнению с соответствующими контрольными группами (рис. 6.5.2А).

Через сутки после введения ЛПС в высокой дозе относительное содержание апоптотически гибнущих клеток увеличивалось только в тимусе у половозрелых самцов, тогда как у самок изменений показателя содержания апоптотически гибнущих тимоцитов не выявлено (рис. 6.5.2Б).

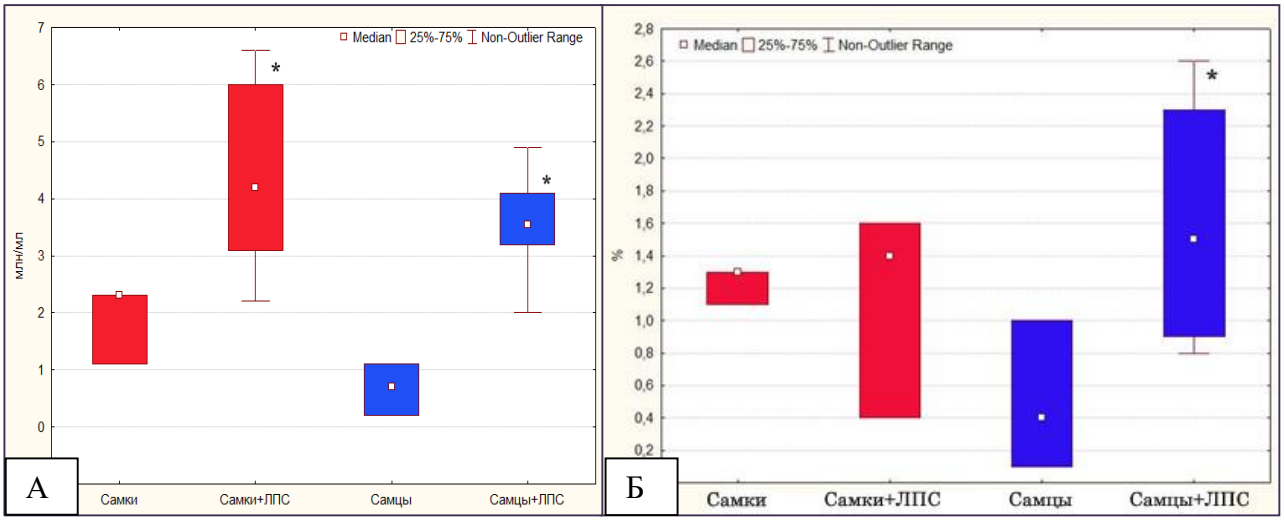


Рис. 6.5.2. Содержание апоптотически гибнущих тимоцитов у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг (А) и 15 мг/кг (Б). Различия статистически значимы по сравнению с: * - контрольной группой соответствующего пола

Сравнительная характеристика морфологических изменений селезенки у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут развития СВО, индуцированного введением низкой дозы ЛПС, в селезенке самок и самцов наблюдалось «опустошение» белой пульпы за счет снижения доли ПАЛМ-зоны. В лимфоидных узелках выявлялись крупные герминативные центры, маргинальные зоны лимфоидных узелков были уже по сравнению с контрольной группой (табл. 6.5.6).

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у крыс Вистар обоего пола изменений показателей объемной доли белой и красной пульпы не обнаружено (табл. 6.5.6). Однако по сравнению с самками показатель объемной доли белой пульпы селезенки у самцов с СВО был статистически значимо ниже. Объемная доля герминативных центров лимфоидных узелков селезенки у самцов и самок на 1-е сут после введения ЛПС была выше, а маргинальной зоны – ниже показателей контрольных групп (табл. 6.5.6).

Таким образом, на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС по сравнению с низкой дозой в селезенке у самцов и самок наблюдаются более выраженные изменения функциональных зон лимфоидных узелков, которые характеризуются расширением их светлых центров и уменьшением объемной доли маргинальных зон. Однако при введении высокой дозы ЛПС у животных изменений показателей объемной доли ПАЛМ-зоны выявлено не было, тогда как при введении низкой дозы ЛПС наблюдалось снижение этого показателя. При морфометрической оценке изменений функциональных зон селезенки половых различий выявлено не было как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС.

Таблица 6.5.6

Изменения объемной доли ПАЛМ-зоны и функциональных зон лимфоидных узелков селезенки у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС по сравнению с контрольными группами

	1,5 мг/кг		**15 мг/кг**	
	Самки	**Самцы**	**Самки**	**Самцы**
Объемная доля ПАЛМ	↓ в 1,4 раза	↓ в 1,1 раза	не изм.	не изм.
Объемная доля МЗ	↓ в 1,4 раза	↓ в 1,2 раза	↓ в 1,8 раза	↓ в 3 раза
Объемная доля ГЦ	↑ в 2,1 раза	↑ в 1,4 раза	↑ в 4,3 раза	↑ в 3,4 раза

Условные обозначения: ПАЛМ – периартериолярные муфты, МЗ – маргинальная зона, ГЦ – герминативные центры

Концентрация TGF-β в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС как в низкой, так и в высокой дозе в сыворотке крови у крыс Вистар обоего пола наблюдалось снижение концентрации TGF-β, однако в ответ на введение высокой дозы ЛПС снижение содержания TGF-β было более выражено по сравнению с низкой дозой (табл. 6.5.7).

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС у самок и самцов наблюдалось разнонаправленное изменение уровня секреции клетками селезенки Тх1-цитокина ИЛ-2: у самцов уровень продукции ИЛ-2 повышался, а у самок, снижался (табл. 6.5.7). У самцов выявлено статистически значимое снижение уровня секреции клетками селезенки Тх2-цитокина ИЛ-4 (табл. 6.5.7). У самок в эти сроки уровень продукции ИЛ-4 не отличался от контрольных значений, а секреция ФНО-α повышалась, тогда как у самцов изменений показателей продукции этого провоспалительного цитокина выявлено не было (табл. 6.5.7).

На 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе у самок и самцов выявлено снижение уровня продукции ИЛ-4 и ФНО-α, однако изменение ИЛ-4 в культуре клеток селезенки у самцов было более выражено, чем у самок. Содержание ИЛ-2 и ИФН-γ в ответ на введение высокой дозы ЛПС у самок статистически значимо не изменялось, тогда как у самцов выявлено снижение показателей этих цитокинов (табл. 6.5.7).

Таблица 6.5.7

Изменения содержания TGF-β в сыворотке крови и уровня продукции и секреции цитокинов КонА активированными клетками селезенки у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС по сравнению с контрольными группами

Среда	Цитокин	1,5 мг/кг		15 мг/кг	
		Самки	Самцы	Самки	Самцы
Сыворотка крови	**TGF-β**	↓ в 1,8 раза	↓ в 1,9 раза	↓ в 2,1 раза	↓ в 2,6 раза
Культура клеток селезенки	**ИЛ-2**	↓ в 3 раза	↑ в 1,4 раза	не изм.	↓ в 1,5 раза
	ИЛ-4	не изм.	↓ в 5,6 раз	↓ в 3,5 раз	↓ в 14 раз
	ИФН-γ	не изм.	не изм.	не изм.	↓ в 1,5 раза
	ФНО-α	↑ в 2,5 раз	не изм.	↓ в 2,6 раз	↓ в 3,9 раза

Таким образом, при введении низкой дозы ЛПС у самок на фоне повышения уровня продукции ФНО-α наблюдается снижение ИЛ-2, тогда как у самцов содержание ИЛ-2 в культуре клеток селезенки увеличивается, а продукция ИЛ-4, напротив, уменьшается, что свидетельствует о преимущественной поляризации иммунного ответа у самцов по Тх1-типу. При введении высокой дозы ЛПС у самцов выявлено выраженное снижение продукции всех цитокинов, тогда как у самок уменьшался только уровень ИЛ-4 и ФНО-α.

Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС

На 1-е сут после введения как низкой, так и высокой дозы ЛПС у половозрелых самок и самцов крыс Вистар в периферической крови наблюдалось повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток (табл. 6.5.8).

У самцов при введении ЛПС в двух дозах выявлено снижение относительного и абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как у самок наблюдалось уменьшение этого показателя только при введении ЛПС в низкой дозе (табл. 6.5.8).

При введении ЛПС в низкой дозе количество регуляторных Т-клеток в периферической крови снижалось только у самцов, тогда как через сутки после введения ЛПС в высокой дозе число регуляторных Т-лимфоцитов уменьшалось у крыс обоего пола.

На 1-е сут после введения ЛПС в низкой дозе у самцов выявлено снижение числа Т-хелперов, тогда как у самок данные показатели были выше значений в контрольной группе (табл. 6.5.8).

Таблица 6.5.8

Изменения относительного количества субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой и высокой дозы ЛПС по сравнению с контрольными группами

Субпопуляции	1,5 мг/кг		15 мг/кг	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Т-лимфоциты	не изм.	не изм.	не изм.	↓ в 1,9 раза
Т-хелперы	↑ в 1,2 раза	↓ в 1,8 раза	не изм.	не изм.
Т-цитотоксические	↓ в 1,3 раза	↓ в 1,3 раза	не изм.	↓ в 1,5 раза
Т-регуляторные	не изм.	↓ в 2 раза	↓ в 1,5 раза	↓ в 1,6 раза
NK-клетки	↑ в 4,5 раза	↑ в 5,5 раза	↑ в 5,3 раза	↑ в 5 раз

Таким образом, при введении как низкой, так и высокой дозы ЛПС в периферической крови у самцов выявлено более выраженное снижение числа Т-лимфоцитов, а именно цитотоксических и регуляторных Т-клеток по сравнению с самками.

Оценка информативности статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение низкой и высокой дозы ЛПС половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

При введении ЛПС в дозе 1,5 мг/кг количество статистически значимо изменяющихся показателей составило 23 у самок и 21 у самцов, а при более высокой дозе 15 мг/кг – 11 у самок и 17 у самцов. Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей было проведено вычисление информативности каждого признака по формуле Кульбака (табл. 6.5.9, 6.5.10). В каждой группе, для которой были получены значения информативности, были отобраны первые пять показателей, показатели информативности которых были максимальными (табл. 6.5.9, 6.5.10). На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС у самок выявлена максимальная диагностическая значимость следующих параметров: содержания апоптотически гибнущих тимоцитов в культуре клеток тимуса, концентрации эстрадиола, уровня активности АсАТ в сыворотке крови, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и содержания общего тестостерона в крови. У самцов наиболее информативными показателями оказались: уровень продукции ИЛ-12 КонА активированными клетками селезенки, содержание тестостерона, уровень эндотоксина в сыворотке крови, число нейтрофилов в межальвеолярных

перегородках легких и объемная доля герминативных центров в лимфоидных узелках селезенки (табл. 6.5.9, рис. 6.5.3).

При введении более высокой дозы ЛПС максимально информативными были показатели уровня эндотоксина в сыворотке крови, активности АсАТ, уровня продукции ИЛ-4 клетками селезенки и числа НК-клеток в периферической крови как у самок, так и у самцов (табл. 6.5.10, рис. 6.5.3).

Таким образом, при введении низкой дозы ЛПС наиболее значимыми в механизмах развития СВО у самок и самцов были иммунологические нарушения: у самок – выраженный апоптоз тимоцитов, у самцов – снижение уровня продукции ИЛ-12, а также изменения содержания половых гормонов: у самок – снижение концентрации эстрадиола, у самцов – тестостерона. При введении более высокой дозы ЛПС у самок и самцов изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови имеет наибольшую патогенетическую значимость, а половые различия в информативности диагностических критериев нивелируются.

Таблица 6.5.9

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение ЛПС в дозе 1,5 мг/кг половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

Пол					
Самки			Самцы		
Параметр	Изменения по отношению к контрольной группе	Информативность	Параметр	Изменения по отношению к контрольной группе	Информативность
Апоптоз тимоцитов	**↑ в 3.2**	**1062**	**ИЛ-12**	**↓ в 384**	**20848853**
Эстрадиол	**↓ в 1.6**	**141,9**	**Тестостерон**	**↓ в 56.5**	**9029,96**
АсАТ	**↓ в 2.9**	**125**	**Эндотоксин**	**↑ в 2.9**	**878**
НФ в легких	**↑ в 3.6**	**109**	**НФ в легких**	**↑ в 7.4**	**660**
Тестостерон	**↑ в 5.8**	**85,4**	**%ГЦ селезенки**	**↑ в 1.4**	**156,9**
%ГЦ селезенки	↑ в 2.1	66,7	Т-цитотокси-ческие ЛФ	↓ в 1.3	138
Кортикостерон	↑ в 1.7	66,6	ИЛ-4	↓ в 5.6	124,7
АлАТ	↓ в 3.7	64	НК	↑ в 5.5	81,5
НК	↑ в 4.5	61,5	Апоптоз тимоцитов	↑ в 9	61,5
СКЗ тимуса	↑ в 1.3	35,2	ИЛ-2	↑ в 1.4	46,11
TGF-β	↓ в 1.8	23,9	%МЗ селезенки	↓ в 1.2	41,1
ФНО-α	↑ в 2.5	18,2	СКЗ тимуса	↑ в 1.6	38,9
Неоптерин	↓ в 2	16,5	Баллы печень	↑ в 2	24,4
ИЛ-6	↓ в 2.7	16,2	АлАТ	↑ в 1.4	14
%МЗ селезенки	↓ в 1.4	13,1	%ПАЛМ	↓ в 1.1	7,3
%ПАЛМ	↓ в 1.4	11,1	АсАТ	↑ в 1.3	7
Баллы печень	↑ в 2	10,3	Неоптерин	↑ в 2	6,3
%БП селезенки	↓ в 1.3	9,9	TGF-β	↓ в 1.9	4,3
ИЛ-2	↓ в 3	9,1	Т-регуляторные ЛФ	↓ в 2	1,88
%КВ тимуса	↑ в 1.2	7,5	%БП селезенки	↓ в 1.1	1,4
ИЛ-12	↓ в 13	5,4	Т-хелперы	↓ в 1.8	0,39
Т-цитотокси-ческие ЛФ	↓ в 1.3	2,16			
Прогестерон	↑ в 4.7	0,99			

Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

Таблица 6.5.10

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение ЛПС в дозе 15 мг/кг половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

Пол					
Самки			**Самцы**		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**
Эндотоксин	**↑ в 31.6**	**313093**	**Эндотоксин**	**↑ в 183**	**1164999**
АсАТ	**↑ в 5.6**	**6657**	**ИЛ-4**	**↓ в 14**	**1718,3**
ИЛ-4	**↓ в 3.5**	**782**	**АсАТ**	**↑ в 3.6**	**1197**
НФ в легких	**↑ в 14.8**	**380,7**	**НК**	**↑ в 5**	**64,8**
НК	**↑ в 5.3**	**142,2**	**%ГЦ селезенки**	**↑ в 3.4**	**47,5**
%ГЦ селезенки	↑ в 4.3	84,9	Баллы печень	↑ в 3.5	40,1
ФНО-α	↓ в 2.6	30	НФ в легких	↑ в 10.7	36,5
%МЗ селезенки	↓ в 1.8	17,5	ФНО-α	↓ в 3.9	26,7
Баллы печень	↑ в 2	13,5	%МЗ селезенки	↓ в 3	19,2
Т-регуля-торные ЛФ	↓ в 1.5	5,9	ИФН-γ	↓ в 1.5	11,9
%КВ тимуса	↓ в 1.5	3,16	Апоптоз тимоцитов	↑ в 3.8	9,95
			Т-регуля-торные ЛФ	↓ в 1.6	6,5
			Кортико-стерон	↓ в 1.4	4,84
			Т-цитотокси-ческие ЛФ	↓ в 1.5	4,76
			%КВ тимуса	↓ в 1.2	4,3
			Т-лимфоциты	↓ в 1.9	4,16
			ИЛ-2	↓ в 1.5	0,43

Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; КВ – корковое вещество

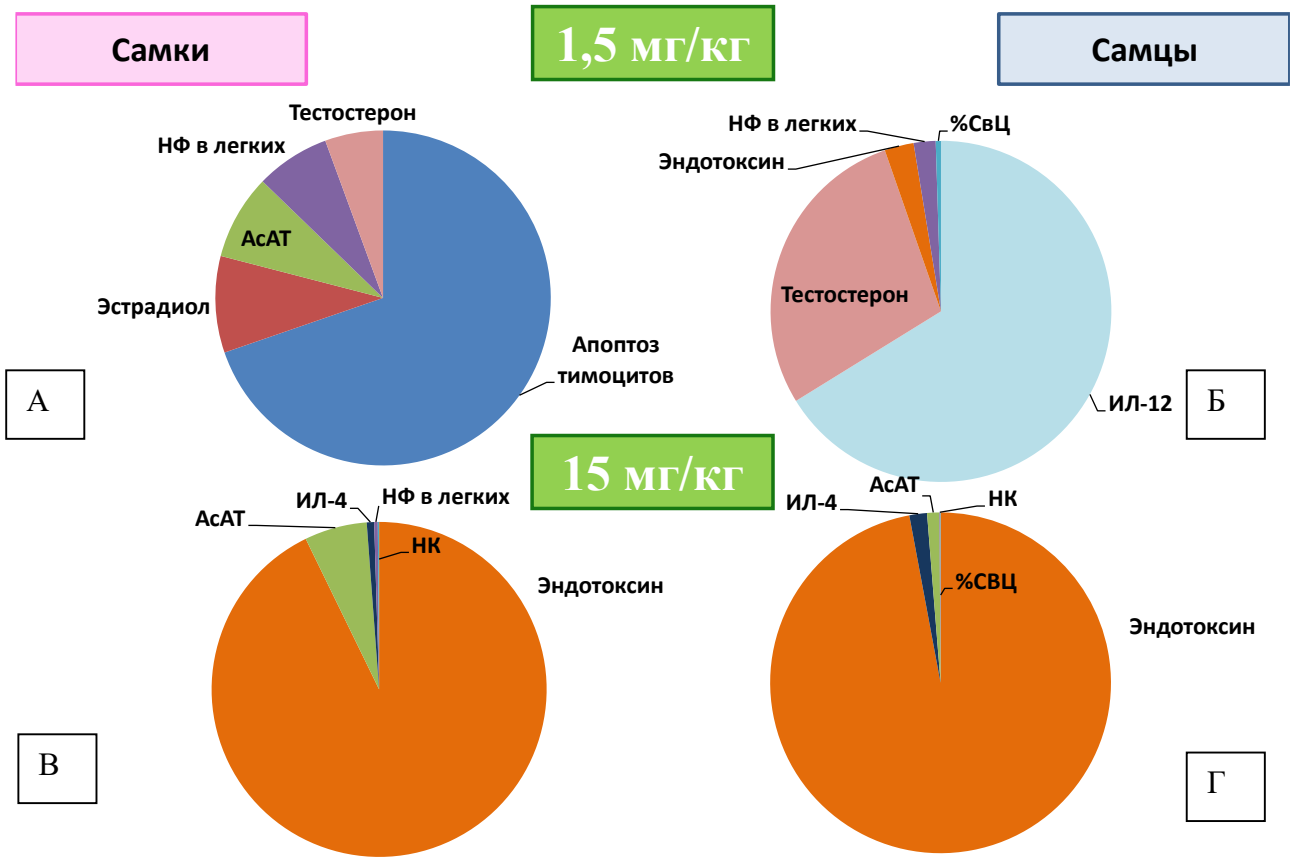


Рис. 6.5.3. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение ЛПС в дозе 1,5 мг/кг (А, Б) и 15 мг/кг (В, Г) половозрелым самкам (А, В) и самцам (Б, Г) крыс Вистар

6.6. Обсуждение

По данным литературы устойчивость к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжесть их течения и такие показатели как выживаемость и смертность зависят от пола (Eshima N. et al., 2012). К сожалению, многими авторами в большинстве как клинических, так и экспериментальных исследований особенности воспалительных реакций в зависимости от пола не учитываются. Однако в ряде работ показано, что частота развития ССВО и сепсиса, а также показатели смертности от этих заболеваний выше у мужчин по сравнению с женщинами, что может быть связано с различиями в уровне стероидных половых гормонов, которые оказывают иммуномодулирующее действие (Eshima N. et al., 2012). Несмотря на то, что в литературе встречаются работы, посвященные половым различиям течения инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в 50% экспериментальных и клинических исследованиях пол не учитывается (Klein S.L., 2015). Однако 80% доклинических испытаний лекарственных средств проводится на самцах (Hughes R.N., 2007). Применение 8 из 10 медицинских препаратов женщинами приводят к развитию побочных реакций, не наблюдаемых у мужчин (US General Accounting Office (2001)). В *in vitro* исследованиях пол не учитывается никогда. Однако в отдельных работах показано, что клетки скелетной мускулатуры, полученные от женщин, в культуре характеризуются более высокой пролиферативной активностью, чем мужские (Deasy B.M., et al., 2007).

В экспериментальных исследованиях с целью моделирования сепсиса и СВО используют внутрибрюшинное введение ЛПС *E.coli* разных серотипов и доз (Sun Y. et al., 2012; Coldewey S.M. et al., 2013; Wang X. et al., 2016), однако в литературе нет работ, посвященных изучению в сравнительном аспекте влияния низкой и высокой дозы на течение СВО с учетом пола.

По сравнению с животными, которым вводили низкую дозу ЛПС, у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы выраженность воспалительных изменений и иммунологических нарушений возрастала, а половые различия нивелировались. Высокая доза ЛПС не вызывала изменений содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови как у самцов, так и у самок, тогда как введение низкой дозы ЛПС приводило к снижению эстрадиола у самок, а тестостерона – у самцов. Основным органом, метаболизирующим половые стероидные гормоны, является печень (Lucki N.C., Sewer M.B., 2008). При введении высоких доз ЛПС в печени выявлены обширные некрозы и выраженная дистрофия гепатоцитов, что приводит к нарушению синтетических процессов в клетках печени, и, соответственно, сниженному метаболизму стероидов. Помимо этого, в работах W.J. Gilmore и соавт. (2003; 2004) показано, что введение мышам низких доз ЛПС вызывает значительное снижение активности цитохрома P450 2A, тогда как высокие дозы ЛПС не приводят к изменению его активности. Цитохромы участвуют в метаболизме стероидных гормонов, видимо поэтому, введение высокой дозы ЛПС

самкам и самцам крыс Вистар не привело к изменению содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови.

Как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС интраальвеолярный отек легких выявлялся чаще у самцов. Воспалительная реакция, характеризующаяся увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, была более выражена через сутки после введения ЛПС в высокой дозе, однако половых различий по этому показателю выявлено не было. Тогда как при введении низкой дозы ЛПС, количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов было статистически значимо выше по сравнению с самками.

По сравнению с низкой дозой ЛПС через сутки после введения высокой дозы у самок и у самцов в печени выявлялись более выраженные альтеративные изменения. После введения низкой дозы ЛПС у самцов в сыворотке крови показатели активности АлАТ и АсАТ повышались, а у самок, наоборот, - снижались. При введении высокой дозы ЛПС показатели активности ферментов печени были выше значений контрольных групп как у самцов, так и у самок, что свидетельствует о более выраженных патологических изменениях в печени при введении ЛПС в высокой дозе, однако половых различий морфофункциональных изменений печени при введении ЛПС в дозе 15 мг/кг выявлено не было.

По сравнению с изменениями, обнаруженными при введении низкой дозы ЛПС, альтеративные изменения в печени и воспалительные – в легких, выявленные у самцов и самок после введения высокой дозы ЛПС, были более выраженными и сочетались с более высоким уровнем эндотоксина в сыворотке крови. По данным литературы высокий уровень эндотоксина в сыворотке крови является неблагоприятным прогностическим критерием тяжести течения септического шока, а его терапевтическая элиминация повышает выживаемость, снижает риск развития полиорганной недостаточности, содержание С-реактивного белка и прокальцитонина в сыворотке крови, повышает артериальное давление (Yaguchi A. et al. 2012; Adamik B. et al., 2015). Высокий уровень эндотоксина, выявленный нами через сутки в сыворотке крови как у самцов, так и у самок, может быть причиной выраженных воспалительных изменений, наблюдаемых при введении высокой дозы ЛПС. Отсутствие половых различий выраженности патологических изменений в органах-мишенях после введения высокой дозы ЛПС может быть связано с нарушениями синтеза и метаболизма половых стероидов, и как следствие, снижением способности половых стероидов модулировать развитие иммунного ответа на введение ЛПС.

При введении высокой дозы ЛПС в сыворотке крови у самцов снижалась концентрация кортикостерона, тогда как низкая доза не влияла на изменение этого показателя. Введение высокой дозы ЛПС самкам не приводило к изменениям содержания кортикостерона, тогда как низкая доза, напротив, вызывала увеличение этого показателя. Снижение содержания кортикостерона в сыворотке крови при введении высокой дозы ЛПС, по-видимому, связано с

необратимыми повреждениями клеток коркового вещества надпочечников, вызванными высокими концентрациями эндотоксина (Kanczkowski W. et al., 2013). Низкая концентрация противовоспалительного гормона кортикостерона в сыворотке крови может быть одной из причин более выраженных альтеративных изменений в органах-мишенях у самцов и самок, обнаруженных через сутки после введения высокой дозы ЛПС. Полиорганная недостаточность при сепсисе развивается в следствие гиперактивации провоспалительных реакций, инициаторным механизмом которых служит связывание ЛПС с TLR4 и дальнейший запуск внутриклеточных реакций: активация киназы I-κB с последующей транслокацией через ядерную мембрану фактора транскрипции NF-κB, инициирующего экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α (Medzhitov R. et al., 1997; Dominguez J.A. et al., 2013; Sun J. et al., 2015). Высокие концентрации кортикостерона при сепсисе ограничивают гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, снижая уровень активации киназ и NF-kB (Zacharowski K. et al., 2006). Тем самым снижение концентрации кортикостерона через сутки после введения высокой дозы ЛПС может быть одним из факторов, опосредующих развитие более выраженных альтеративных изменений в органах-мишенях.

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС в тимусе у самцов по сравнению с самками обнаружена акцидентальная инволюция II стадии. При введении высокой дозы ЛПС в тимусе как у самцов, так и у самок акцидентальная инволюция была более выражена (II-III стадии), причем у самцов ее морфологические проявления были более тяжелыми, что сочеталось с высоким показателем числа апоптотически гибнущих тимоцитов по сравнению с самками. Известно, что ЛПС оказывает прямое негативное действие на клетки тимуса, в частности на двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$), населяющие корковое вещество (Tsuji T. et al., 2000). Высокий уровень эндотоксина, обнаруженный нами в сыворотке крови у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС, может определять более выраженную акцидентальную инволюцию тимуса, чем при введении низкой дозы. Половые различия инволютивных проявлений через сутки развития СВО после введения высокой дозы ЛПС, по-видимому, объясняются в первую очередь более высоким уровнем эндотоксина в сыворотке самцов, чем иммуномодулирующим действием половых стероидов и кортикостерона, концентрации которых не менялись в ответ на введение высокой дозы ЛПС.

По сравнению с низкой дозой ЛПС введение высокой дозы приводило к более выраженным изменениям функциональных зон лимфоидных узелков в селезенке как у самцов, так и у самок, которые характеризовались расширением их светлых центров и уменьшением объемной доли маргинальных зон. Однако введение высокой дозы ЛПС не вызывала изменений показателей объемной доли Т-зависимой ПАЛМ-зоны, тогда как при введении низкой дозы ЛПС наблюдалось снижение этого показателя. При морфометрической оценке изменений

функциональных зон селезенки половых различий выявлено не было как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС.

При введении низкой дозы ЛПС у самок на фоне повышения уровня продукции ФНО-α наблюдается снижение ИЛ-2, тогда как у самцов содержание ИЛ-2 в культуре клеток селезенки увеличивается, а продукция ИЛ-4, напротив, уменьшается, что свидетельствует о преимущественной поляризации иммунного ответа у самцов по Тх1-типу. При введении высокой дозы ЛПС у самцов выявлено выраженное снижение продукции всех цитокинов, тогда как у самок уменьшался только уровень ИЛ-4 и ФНО-α. По данным литературы клетки селезенки людей, умерших от сепсиса, продуцируют низкие количества как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов (Boomer J.S. et al., 2011). Низкие концентрации исследованных нами цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки у самцов, которым вводили высокую дозу ЛПС, свидетельствует о выраженной иммуносупрессии.

При введении как низкой, так и высокой дозы ЛПС по сравнению с самками в периферической крови у самцов выявлено более выраженное снижение числа Т-лимфоцитов, а именно цитотоксических и регуляторных Т-клеток. Снижение числа Т-лимфоцитов в периферической крови у больных сепсисом и септическим шоком свидетельствуют об иммуносупрессии (Pravda J., 2014), причем более выраженное снижение числа Т-лимфоцитов на ранних сроках сепсиса и септического шока коррелируют с неблагоприятным прогнозом (Rimmelè T. et al., 2016).

Согласно анализу полученных результатов оценки информативности статистически значимых изменений с помощью формулы Кульбака показателей, характеризующих СВО разной тяжести, оказалось, что при введении высокой дозы ЛПС максимальная диагностическая значимость характерна для показателя уровня эндотоксина в сыворотке крови у животных обоего пола, а при введении низкой дозы ЛПС – только у самцов.

Эндотоксин – триггер активации воспалительных реакций при сепсисе, однако как на поздних, так и на более ранних стадиях развития сепсиса выявлен феномен «эндотоксиновой толерантности», или клеточного репрограммирования, что проявляется неспособностью иммунокомпетентных клеток отвечать продукцией провоспалительных цитокинов в ответ на длительное воздействие высоких доз эндотоксина (Schefold J.C. et al., 2008; Pena O.M. et al., 2014). Выраженность эндотоксиновой толерантности на ранних стадиях сепсиса напрямую связана с тяжестью течения заболевания (Pena O.M. et al., 2014). Уже через сутки после диагностирования сепсиса в моноцитах периферической крови больных повышается уровень экспрессии 99 генов, экспрессия которых характерна для развития эндотоксиновой толерантности, но она не проявляется при развитии провоспалительного ответа (Pena O.M. et al., 2011; Pena O.M. et al., 2014). Развитие эндотоксиновой толерантности при сепсисе коррелирует с тяжестью

полиорганной недостаточности, выраженностью воспалительной инфильтрации, ДВС-синдромом, гибелью лимфоцитов (Hotchkiss R.S. et al., 2013).

В последнее время в качестве эффективной терапии сепсиса и септического шока используется гемоперфузия эндотоксина с помощью Полимексина B (Polymyxin B) – катионного полипептидного антибиотика с высокой аффинностью к эндотоксину (Hirabayashi K. et al., 2010; Esteban E. et al., 2013). Гемоперфузия больных с сепсисом и септическим шоком приводила к снижению уровня эндотоксина в сыворотке крови, и как следствие, отмечалось уменьшение концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ФНО-α), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) – маркера активации эндотелия сосудов, активатора провоспалительных реакций HMGB1 (High Mobility Group Box-1 protein), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), NO, тропонина, эритропоэтина, числа нейтрофилов в крови, активация экспрессии HLA-DR на моноцитах и CD-16 на гранулоцитах, повышение количества Т-хелперов и снижение числа Т-регуляторных лимфоцитов в крови, а также уменьшение числа апоптотически гибнущих иммунокомпетентных клеток (Esteban E. et al., 2013).

Таким образом, введение высокой дозы ЛПС самкам и самцам крыс Вистар приводит к развитию более тяжелой формы СВО, что связано, в первую очередь, с повышением уровня эндотоксина в сыворотке крови и развитию реакций врожденного иммунитета. Тогда как при введении низкой дозы ЛПС основными диагностически значимыми критериями были иммунологические нарушения и изменения уровня половых гормонов, что определяло наличие половых различий в течении СВО у крыс Вистар.

Глава 7 МОРФОЛОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС ВИСТАР В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОВАРИЭКТОМИИ

7.1 Морфологические изменения и иммунологические нарушения у самок крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

С целью создания модели посткастрационной менопаузы проводили хирургическую билатеральную овариэктомию у половозрелых самок крыс Вистар. В отдаленные сроки после овариэктомии (52 дня) моделировали СВО внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 1,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС.

Содержание стероидных гормонов в сыворотке крови в отдаленные сроки после овариэктомии

По сравнению с контрольной группой в отдаленные сроки после овариэктомии наблюдалось снижение концентрации эстрадиола, свободного и общего тестостерона (табл. 1), а содержание прогестерона статистически значимо не отличалась от показателей контрольной группы. Концентрация кортикостерона у самок после овариэктомии была выше, чем в контрольной группе (табл. 1).

Таким образом, через 52 сут после хирургической кастрации у самок развивается посткастрационная менопауза, характеризующаяся низкой концентрацией эстрадиола и тестостерона на фоне высокого содержания кортикостерона в сыворотке крови.

Таблица 7.1.1

Содержание кортикостерона и половых стероидных гормонов в сыворотке крови у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии (Me; 25-75%)

Содержание гормонов	Контрольная группа (n=10)	Отдаленные сроки после овариэктомии (n=6)	Статистическая значимость различий (p)
Эстрадиол, пг/мл	149,3 (85,5-170,4)	39,7 (32,8-52,4)	0,001
Прогестерон, нг/мл	9,5 (7,4-14,1)	8,9 (5,9-14,8)	0,89
Тестостерон общий, нг/мл	0,23 (0,15-0,32)	0 (0-0,031)	0,0015
Тестостерон свободный, пг/мл	0,62 (0,24-0,96)	0,17 (0,17-0,17)	0,011
Кортикостерон, нг/мл	74,4 (54,6-78,8)	175,9 (142,3-183,9)	0,02

Морфологическая характеристика легких у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

Морфологических различий в легких у крыс контрольной и опытной групп не выявлено (рис. 7.1.1). Просветы альвеол воздушные, широкие, межальвеолярные перегородки тонкие. В стенках межальвеолярных перегородок макрофаги, единичные в поле зрения при ув. 400 нейтрофилы. Эпителий бронхов кубический, базальная пластинка тонкая, в просвете бронхов и бронхиол обнаружены единичные десквамированные эпителиальные клетки. Однако по данным морфометрического исследования в легких у крыс после овариэктомии наблюдалось статистически значимое увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (табл. 7.1.2).

Таким образом, в отдаленные сроки после овариэктомии морфологических изменений в легких не выявлено, за исключением небольшого повышения – в 1,4 раза, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках.

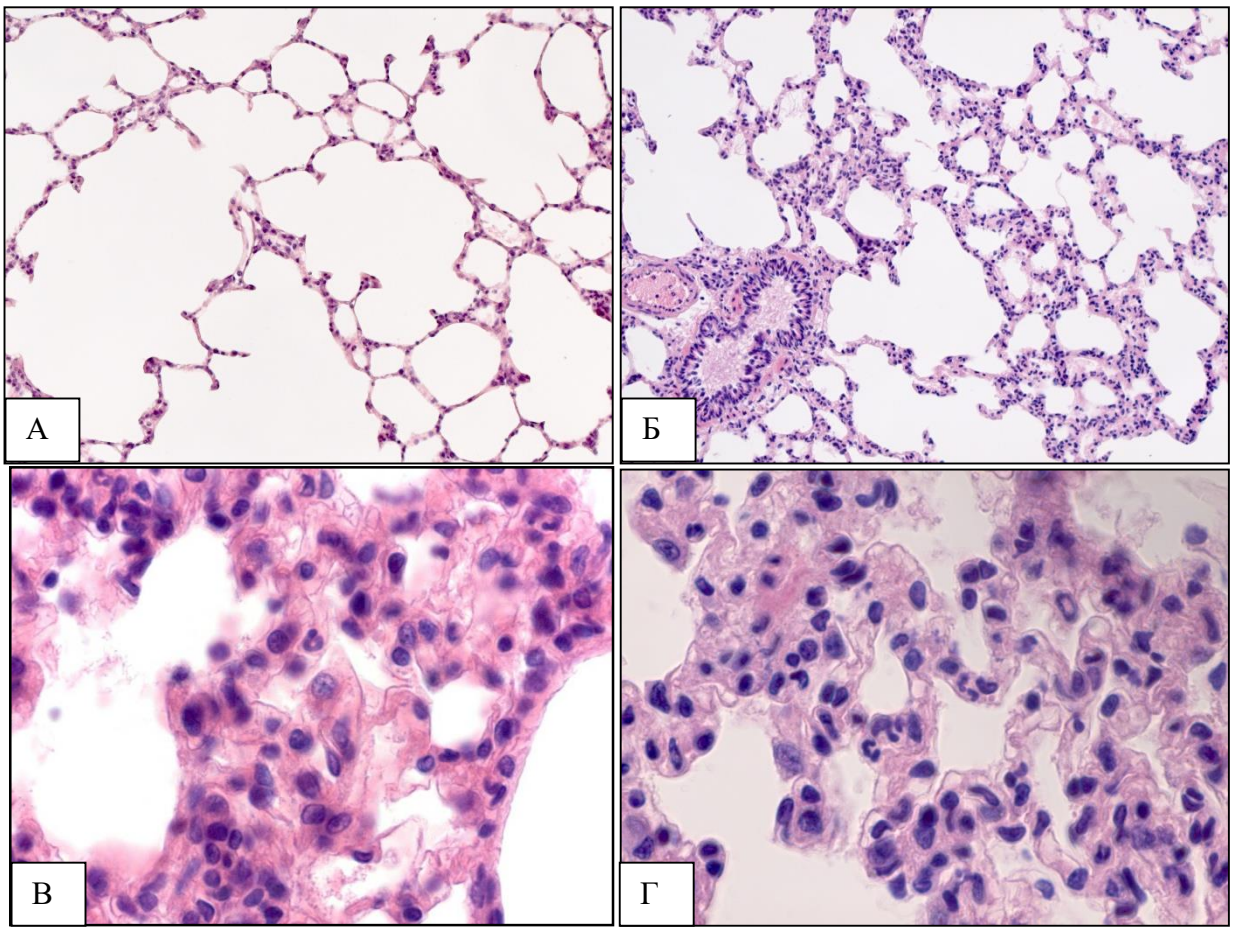


Рис. 7.1.1. Морфологическая характеристика легких крыс Вистар контрольной группы (А, В) и на 52-е сут после овариэктомии (Б, Г). А, Б – просветы альвеол воздушные, широкие, межальвеолярные перегородки тонкие. В, Г – в стенке межальвеолярных перегородок единичные нейтрофилы. Ув. А, Б 200; В, Г 1000

Таблица 7.1.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, уровень эндотоксина и активность АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии (Me; 25-75%)

		Контрольная группа (n=10)	Отдаленные сроки после овариэктомии (n=6)	Статистическая значимость различий (p)
Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких		1,42 (1,00-1,71)	2,00 (1,57-3,14)	0,019
Уровень эндотоксина, мЕ/мл		1,86 (0,73-2,77)	0,57 (0,19-1,0)	0,13
Уровень активности ферментов печени, Е/л	**АсАТ**	143 (142-180)	160 (140-174)	0,163
	АлАТ	57 (54-92)	69 (59-75)	0,174

Показатели уровня активности АлАТ и АсАТ и эндотоксина в сыворотке крови у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

Показатели уровня активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у кастрированных самок колебались в пределах нормы, и статистически значимо не отличались от значений в контрольной группе (табл. 7.1.2).

На 52-е сут после хирургической кастрации уровень эндотоксина в сыворотке крови у самок крыс Вистар не отличался от таковых у животных контрольной группы (табл. 7.1.2).

Морфологическая характеристика тимуса у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

На качественном уровне в тимусе по сравнению с некастрированными самками на 52-е сут после овариэктомии корковое вещество преобладало, границы между корковым и мозговым веществом были четкие (рис. 7.1.2Б). В корковом веществе тимуса у 2-х овариэктомированных самок из 5 в некоторых дольках обнаружены очаги с гибнущими тимоцитами – картина «звездного неба»: макрофаги, фагоцитирующие погибающие лимфоциты. Субкапсулярная зона тимуса у кастрированных самок была широкой и состояла из 6-10 рядов лимфобластов, среди которых выявлялись единичные митозы (рис. 7.1.2Г). В мозговом веществе тимуса определялись тимические тельца I-III фаз развития.

При морфометрическом исследовании в тимусе по сравнению с контрольной группой у кастрированных самок выявлялись реактивные изменения, характеризующиеся расширением субкапсулярной зоны. Объемная доля коркового вещества тимуса возрастала (табл. 7.1.3).

Таблица 7.1.3

Морфометрическая характеристика тимуса у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии (Me; 25-75%)

Морфометрические показатели тимуса	Контрольная группа (n=8)	Отдаленные сроки после овариоэктомии (n=6)	Статистическая значимость различий (p)
Объемная доля КВ, %	49,2 (46,2-54,0)	69,3 (66,8-72,3)	0,0003
Объемная доля МВ, %	50,8 (46,0-53,8)	30,7 (27,7-33,2)	0,0003
Индекс отношения объемной доли КВ к МВ, усл. ед.	1,0 (0,89-1,22)	2,3 (2,1-2,7)	0,0001
Ширина СКЗ, мкм	34,1 (31,3-37,2)	50,3 (44,7-50,6)	0,013

Условные обозначения: КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество; СКЗ – субкапсулярная зона

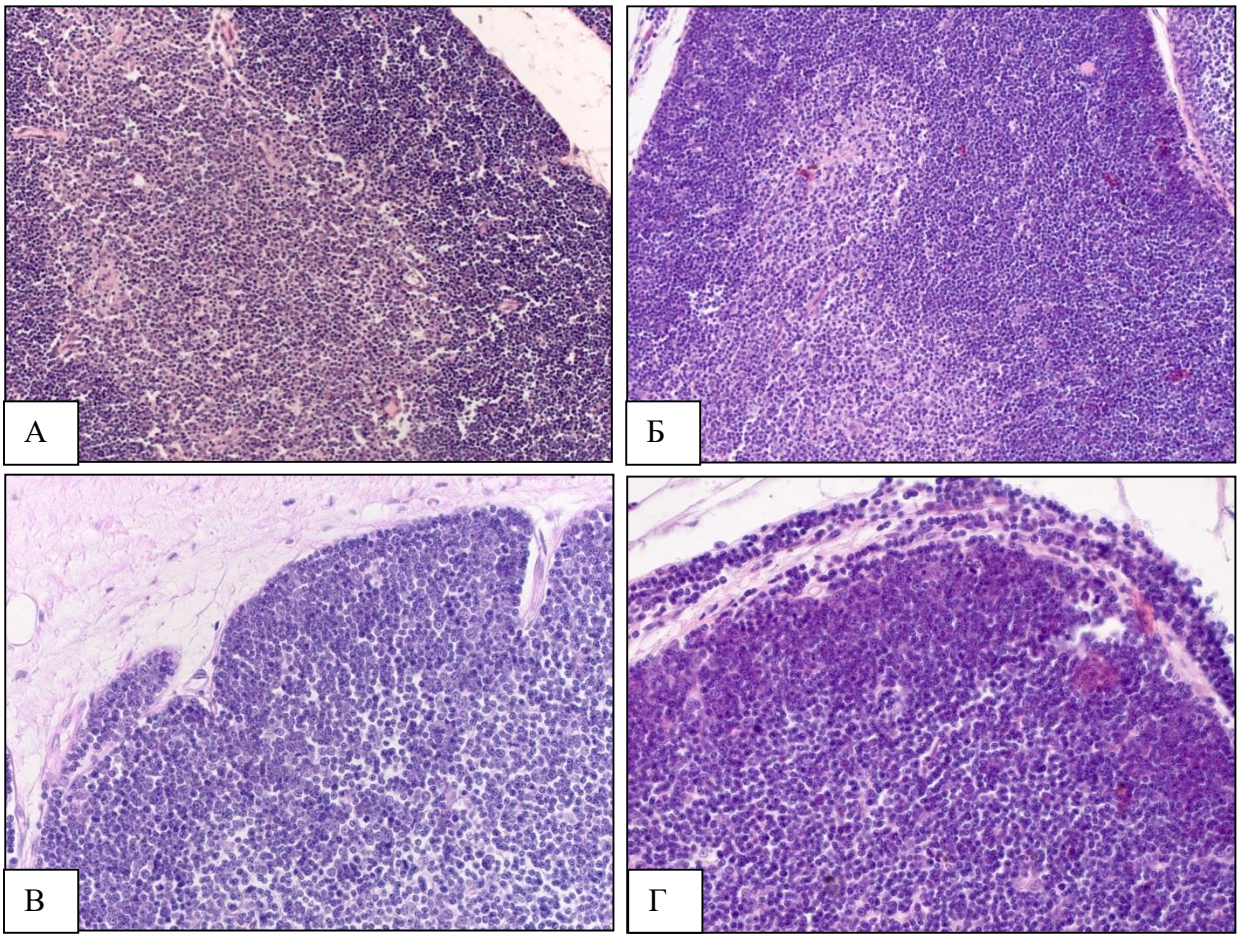


Рис. 7.1.2. Морфологические изменения в тимусе у крыс Вистар контрольной группы (А, В) и на 52-е сут после овариэктомии (Б, Г). *Контрольная группа:* А – границы между корковым и мозговым веществом четкие; корковое вещество тимуса представлено преимущественно лимфоидными клетками; В – субкапсулярная зона тимуса у крыс контрольной группы представлена 10-12 рядами лимфобластов. *На 52-е сут после овариэктомии*: Б – корковое вещество преобладает над мозговым; Г – субкапсулярная зона широкая и представлена 8-10 рядами лимфобластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А, В – 200; Б, Г – 400

Морфологическая характеристика селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

При морфологическом исследовании в селезенке у самок контрольной группы ПАЛМ-зона выражена, лимфоидные узелки с небольшими герминативными центрами (рис. 7.1.3А), в них среди лимфобластов выявлялись единичные митозы. В отдаленные сроки после овариэктомии в селезенке преобладала красная пульпа, а белая пульпа была представлена невыраженной ПАЛМ-зоной и небольшими лимфоидными узелками с герминативными центрами (рис. 7.1.3Б).

При морфометрическом исследовании гистологических препаратов селезенки у крыс в отдаленные сроки после овариэктомии наблюдалось снижение показателя объемной доли белой пульпы за счет уменьшения ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков (табл. 7.1.4). В лимфоидных узелках селезенки в отдаленные сроки после кастрации изменений показателей объемной доли маргинальной зоны и светлых центров по сравнению с контрольной группой не выявлено (табл. 7.1.4).

Таким образом, в отдаленные сроки после овариэктомии наблюдается опустошение белой пульпы селезенки за счет снижения объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков.

Таблица 7.1.4

Морфометрическая характеристика селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии (Me; 25-75%)

Морфометрические показатели селезенки		**Контрольная группа (n=8)**	**Отдаленные сроки после овариэктомии (n=6)**	**Статистическая значимость различий (p)**
Объемная доля, %	**ПАЛМ**	41,4 (35,8-43,6)	27,8 (23,6-28,6)	0,006
	ЛУз	27,0 (26,6-28,0)	12,6 (11,4-12,8)	0,0027
	Белая пульпа	68,4 (62,4-70,6)	40,6 (36,2-42,6)	0,003
	Индекс БП/КП	2,5 (1,6-2,7)	0,72 (0,59-0,77)	0,0027
	Маргинальная зона ЛУз	33,9 (29,5-35,4)	34,9 (26,2-50,2)	0,84
	Герминатив-ные центры ЛУз	22,2 (19,2-25,7)	20,2 (14,6-28,2)	0,84

Условные обозначения: ПАЛМ – периартериолярные лимфоидные муфты, ЛУз – лимфоидные узелки, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа

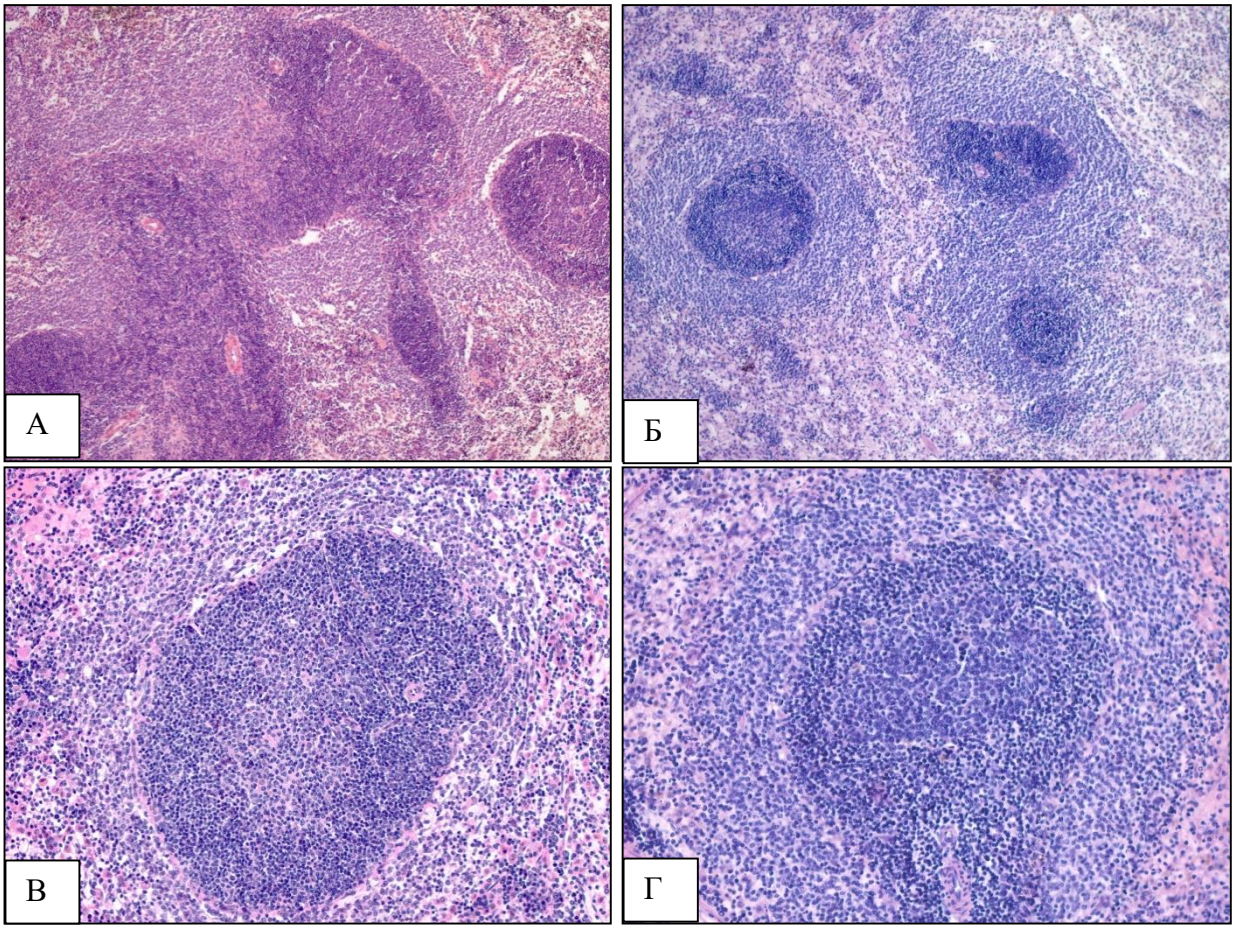


Рис. 7.1.5**.** Морфологические изменения селезенки у крыс Вистар контрольной группы (А, В) и на 52-е сут после овариэктомии (Б, Г). *Контрольная группа*: А, В – белая пульпа представлена выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками со светлыми центрами. *На 52-е сут после овариэктомии*: Б, Г – невыраженная ПАЛМ-зона, лимфоидные узелки небольших размеров, их герминативные центры широкие, в них рыхло расположенные лимфобласты. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А, Б – 100, В, Г – 400

Содержание цитокинов в культуральной жидкости активированных КонА клеток селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

В отдаленные сроки после овариэктомии в сыворотке крови у крыс Вистар выявлено снижение содержания неоптерина по сравнению с контрольной группой (табл. 7.1.5). Концентрация TGF-β в сыворотке крови у кастрированных самок по сравнению с контрольной группой не изменялось.

Анализ цитокинового профиля показал, что в отдаленные сроки после овариэктомии наблюдается повышение уровня продукции провоспалительного ИФН-γ и снижение опосредующего развитие иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу – ИЛ-12 (табл. 7.1.5).

Таблица 7.1.5

Концентрация неоптерина и TGF-β в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости активированных КонА клеток селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии (Me; 25-75%)

Среда	Цитокин	Контрольная группа	Отдаленные сроки после овариоэктомии	Статистическая значимость различий (p)
Сыворотка крови	**Неоптерин, нмоль/л**	6,0 (5,7-7,4)	3,3 (1,9-4,7)	0,003
	TGF-β, нг/мл	79,0 (63,2-81,9)	87,6 (74,7-89,1)	0,2
Культура клеток селезенки	**ИЛ-2, пг/мл**	144,5 (89,4-152,9)	102,4 (94,5-239,9)	0,62
	ИЛ-4, пг/мл	15,5 (11,9-28,6)	13,0 (11,6-20,8)	0,51
	ИЛ-12, пг/мл	79,0 (63,7-94,9)	22,1 (8,3-36,0)	0,02
	ИФН-γ, пг/мл	8,9 (0,0-13,4)	40,2 (31,3-40,2)	0,016
	ФНО-α, пг/мл	30,7 (13,8-33,7)	41,4 (30,7-44,5)	0,11
	ИЛ-6, пг/мл	7500 (5550-8100)	6200 (5500-6800)	0,25

Заключение

Таким образом, в отдаленные сроки после овариэктомии развивается состояние посткастрационной менопаузы, характеризующееся резким снижением в сыворотке крови содержания эстрадиола, общего и свободного тестостерона на фоне повышения концентрации кортикостерона. Количество прогестерона в сыворотке крови в эти сроки не изменяется (табл. 7). В отдаленные сроки после хирургической кастрации у самок крыс Вистар выявлены реактивные морфофункциональные изменения органов иммунной системы: расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны; снижение объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков селезенки; повышение уровня продукции ИФН-γ и снижение – ИЛ-12.

Морфофункциональные изменения легких в отдаленные сроки после овариэктомии характеризуются увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких (табл. 7.1.6). По сравнению с контрольной группой уровень эндотоксина в отдаленные сроки после овариэктомии не изменяется (табл. 7.1.6).

Таблица 7.1.6

Сравнительная характеристика морфофункционального состояния органов иммунной системы, легких, содержания половых стероидных гормонов, активность АсАТ в сыворотке крови и уровня продукции цитокинов клетками селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

Параметры	Показатели у кастрированных крыс Вистар по сравнению с самками контрольной группы
Уровень гормонов и эндотоксина	
Тестостерон общий	Ниже
Тестостерон свободный	Ниже
Эстрадиол	Ниже
Кортикостерон	Выше
Морфофункциональное состояние тимуса	
Объемная доля КВ	Выше
Ширина субкапсулярной зоны	Выше
Морфофункциональное состояние селезенки	
Объемная плотность ПАЛМ-зоны	Ниже
Объемная доля лимфоидных узелков	Ниже
Уровень продукции цитокинов	
ИФН-γ	Выше
ИЛ-12	Ниже
Неоптерин	Ниже
Морфофункциональное состояние легких	
Число НФ в межальвеолярных перегородках	Выше

7.2 Морфологические и иммунологические изменения при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии

СВО моделировали внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 1,5 мг/кг самкам крыс Вистар через 52 дня после хирургической кастрации. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Показатель гибели животных составил 15% (4 крысы из 27).

Сравнительная характеристика содержания половых гормонов в сыворотке крови у кастрированных и некастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови как у кастрированных, так и некастрированных самок наблюдалось увеличение содержания общего тестостерона и прогестерона (табл. 7.2.1, рис. 7.2.1). На 1-е сут развития СВО у овариэктомированных крыс концентрация эстрадиола статистически значимо не отличалась от значений соответствующей контрольной группы, тогда как у некастрированных самок в эти сроки его содержание снижалось (табл. 7.2.1, рис. 7.2.1).

На 7-е сут после введения ЛПС концентрация общего тестостерона в сыворотке крови у некастрированных самок нормализовалась и не отличалась от значений в контрольной группе, тогда как у некастрированных самок в эти сроки развития СВО содержание тестостерона снижалось и было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе (табл. 7.2.1, рис. 7.2.1). Содержание эстрадиола у кастрированных самок на 7-е сут СВО статистически значимо уменьшалось по сравнению с соответствующей контрольной группой, тогда как у животных без овариэктомии прослеживалась тенденция к нормализации концентрации эстрадиола (табл. 7.2.1, рис. 7.2.1).

Содержание эстрадиола и общего тестостерона в сыворотке крови у овариэктомированных самок как контрольной группы, так и в ответ на введение ЛПС была статистически значимо ниже по сравнению с некастрированными крысами соответствующих групп (табл. 7.2.1, рис. 7.2.1).

Таблица 7.2.1

Содержание стероидных половых гормонов в сыворотке крови у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл	Тестостерон общий, нг/мл
Без овариэктомии	**Контрольная**	134,5 (108,6-170,4)[1*]	9,50 (7,42-14,06)[1]	0,22 (0,15-0,32)[1]
	ЛПС 1-е сут	84,06 (80,22-91,15)[2]	45 (40,5-48)[2]	1,34 (0,56-1,62)[2]
	ЛПС 7-е сут	78,75 (76,97-140,1)[3]	18,94 (10,77-40,65)[3]	0,09 (0,06-0,12)[3]
Отдаленные сроки после овариэктомии	**Контрольная**	39,7 (32,8-52,4)[4]	7,8 (4,9-12,4)[4]	0,0 (0,0-0,03)[4]
	ЛПС 1-е сут	49,6 (47,1-62,9)[5]	18,6 (14,4-23,9)[5]	0,09 (0,04-0,2)[5]
	ЛПС 7-е сут	14,2 (13,9-20,2)[6]	15,6 (11,3-27,3)[6]	0,03 (0,0-0,08)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,0105^{1-2}$ $0,2733^{1-3}$ $0,8064^{2-3}$ $0,078^{4-5}$ $0,002^{4-6}$ $0,009^{5-6}$ $0,001^{1-4}$ $0,025^{2-5}$ $0,009^{3-6}$	$0,0082^{1-2}$ $0,0410^{1-3}$ $0,0759^{2-3}$ $0,0007^{4-5}$ $0,007^{4-6}$ $0,68^{5-6}$ $0,45^{1-4}$ $0,001^{2-5}$ $0,99^{3-6}$	$0,0006^{1-2}$ $0,0092^{1-3}$ $0,0005^{2-3}$ $0,009^{4-5}$ $0,17^{4-6}$ $0,10^{5-6}$ $0,0015^{1-4}$ $0,0027^{2-5}$ $0,049^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

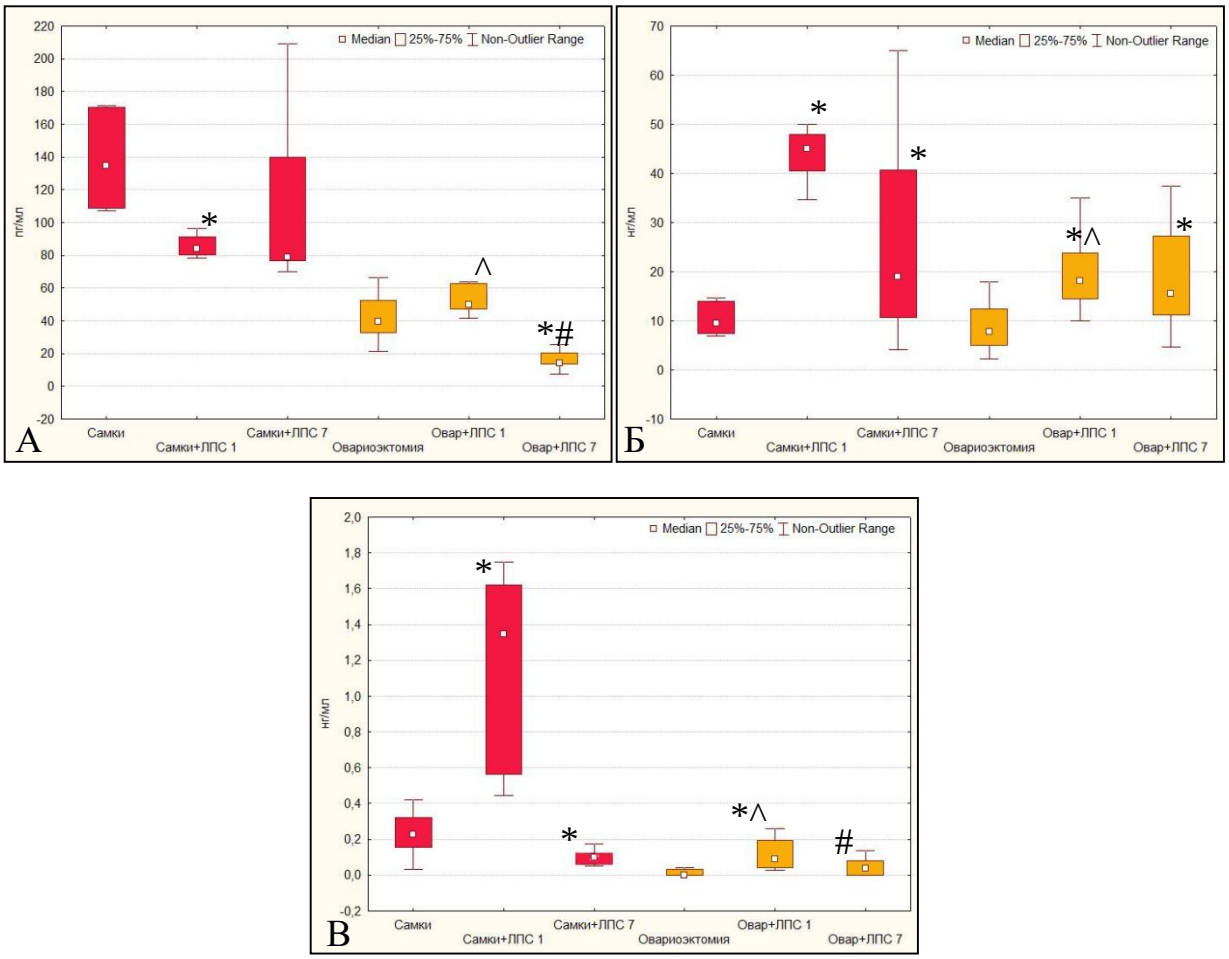


Рис.7.2.1. Изменение содержания эстрадиола (А), прогестерона (Б) и общего тестостерона (В) в сыворотке крови у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после орхиэктомии ( ) контрольной группы (Самки; Овариэктомия), на 1-е (Самки+ЛПС 1; Овар+ЛПС 1), и 7-е (Самки+ЛПС 7; Овар+ЛПС 7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой, ^ - группой некастрированных самок через сутки после введения ЛПС; # - группой некастрированных самок через 7 суток после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у кастрированных и некастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

Через сутки после введения ЛПС в легких у овариэктомированных самок, также как и у некастрированных крыс, в просветах бронхов выявлялось зернистое эозинофильное содержимое, частично заполняющее просвет, эпителий был очагово десквамирован. Межальвеолярные перегородки легких у овариэктомированных самок на 1-е сут развития СВО были очагово утолщены, в них выявлялось относительно большое число нейтрофилов (8-10 в поле зрения при ув. 400). Зоны с дистелектазами чередовались с зонами острой обструктивной эмфиземы. Периваскулярные лимфатические щели расширены. Отдельные альвеолы у 5 крыс из 12 были заполнены отечной жидкостью (рис. 7.2.2).

При морфологическом исследовании легких кастрированных самок на 7-е сут после введения ЛПС просветы отдельных бронхов заполнены эозинофильными массами, в которых

выявлялся десквамированный эпителий и нейтрофилы. Межальвеолярные перегородки диффузно очагово утолщены, в них умеренное число нейтрофилов (рис. 7.2.3). Отмечалось чередование очагов эмфиземы и дистелектазов. Периваскулярные лимфатические щели были расширены.

На 1-е сут после введения ЛПС у кастрированных самок показатель числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких был достоверно выше, чем в группе сравнения (табл. 7.2.2, рис. 7.2.4). На 7-е сут после введения ЛПС в обеих группах наблюдалось снижение числа нейтрофилов.

Таблица 7.2.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и альтеративные изменения в печени у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Легкие	Печень
		Число нейтрофилов, на ед. площади 25 тыс. мкм^2	**Показатель дистрофических и некротических изменений в печени, баллы**
Без овариэктомии	**Контрольная**	1,64 (1,43-1,86)^{1*}	1,50 (1,00-2,50)^{1}
	ЛПС 1-е сут	5,43 (4,71-7,57)^{2}	3,00 (2,00-3,00)^{2}
	ЛПС 7-е сут	2,85 (2,43-4,00)^{3}	2,00 (1,00-2,50)^{3}
Отдаленные сроки после овариэктомии	**Контрольная**	2,0 (1,57-3,14)^{4}	1,50 (1,00-2,00)^{4}
	ЛПС 1-е сут	8,71 (8,57-10,43)^{5}	3,00 (2,00-4,00)^{5}
	ЛПС 7-е сут	1,71 (1,29-2,14)^{6}	2,00 (2,00-3,00)^{6}
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}00008^{1-2}$ $0{,}00006^{1-3}$ $0{,}0087^{2-3}$ $0{,}0088^{4-5}$ $0{,}4^{4-6}$ $0{,}009^{5-6}$ $0{,}019^{1-4}$ $0{,}003^{2-5}$ $0{,}025^{3-6}$	$0{,}0032^{1-2}$ $0{,}2757^{1-3}$ $0{,}0376^{2-3}$ $0{,}0029^{4-5}$ $0{,}0232^{4-6}$ $0{,}044^{5-6}$ $0{,}5135^{1-4}$ $0{,}29^{2-5}$ $0{,}847^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

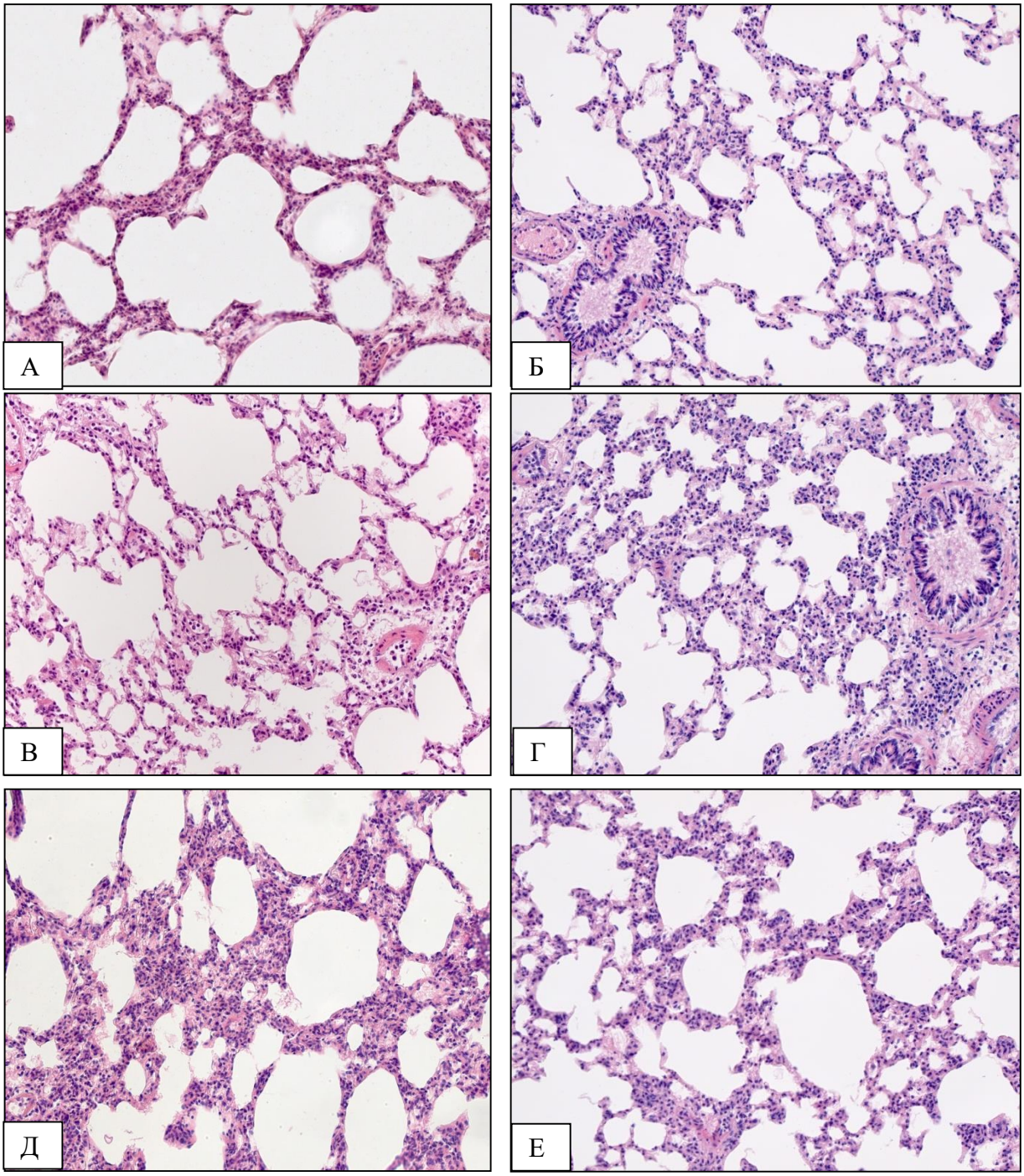


Рис. 7.2.2. Морфологические изменения легких в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа:* А, Б – тонкие межальвеолярные перегородки, просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (В) – в просветах альвеол гомогенное эозинофильное содержимое и эритроциты; в межальвеолярных перегородках очаговая воспалительная инфильтрация; *овариэктомированные самки* (Г) – утолщенные межальвеолярные перегородки, просвет бронха заполнен эозинофильным содержимым, диффузный интраальвеолярный отек, участки дистелектазов и острой эмфиземы. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (Д) – межальвеолярные перегородки утолщены, в них воспалительная инфильтрация; *овариэктомированные самки* (Е) – межальвеолярные перегородки очагово утолщены. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

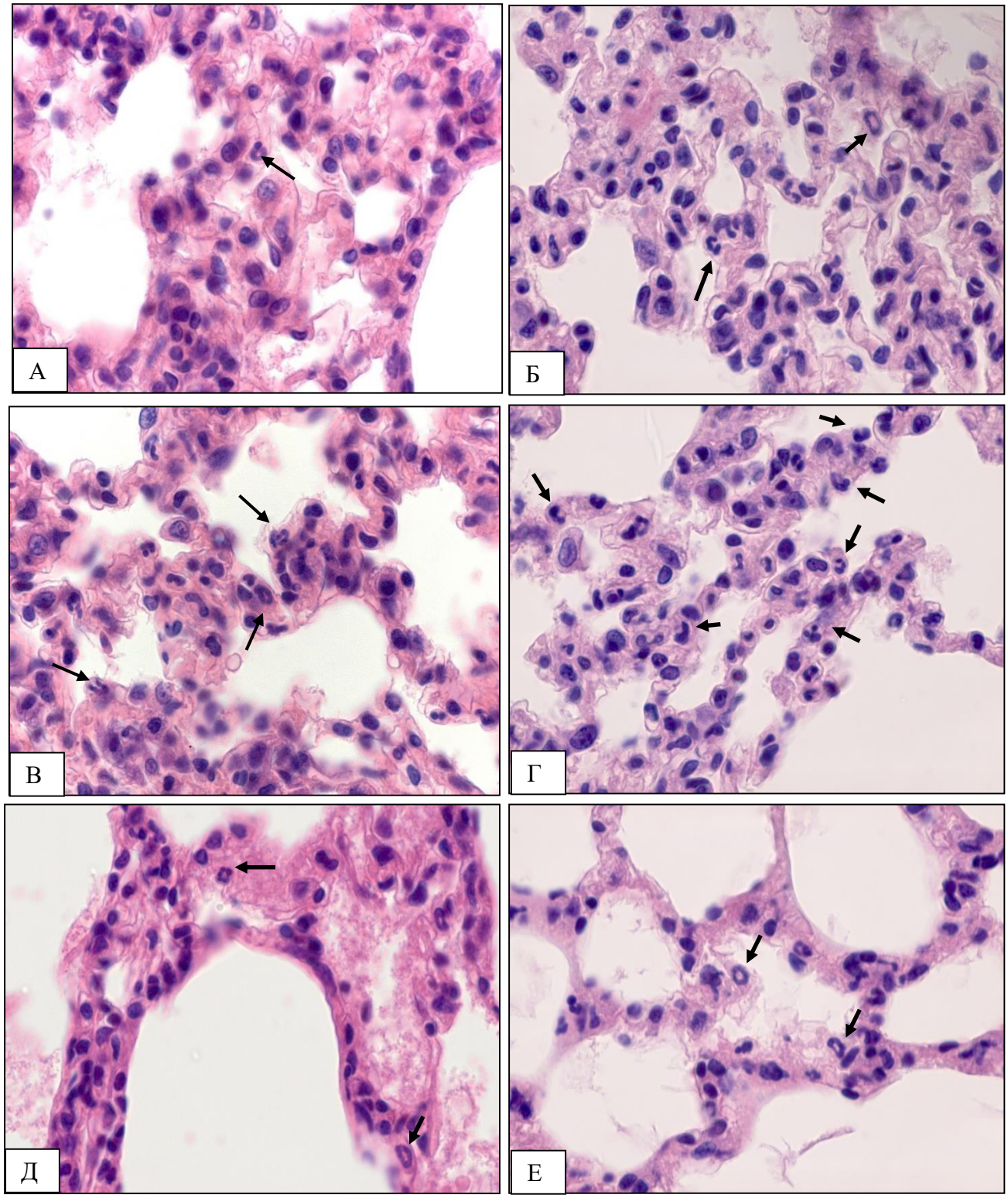


Рис. 7.2.3. Морфологические изменения легких в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа*: А, Б – единичные нейтрофилы в межальвеолярных перегородках легких. *Через сутки после введения ЛПС*: (В, Г) – увеличение количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. *На 7-е сут после введения ЛПС:* (Д, Е) – снижение числа нейтрофилов по сравнению с группой крыс, на 1-е сут после введения ЛПС. Стрелки указывают на нейтрофилы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: 1000

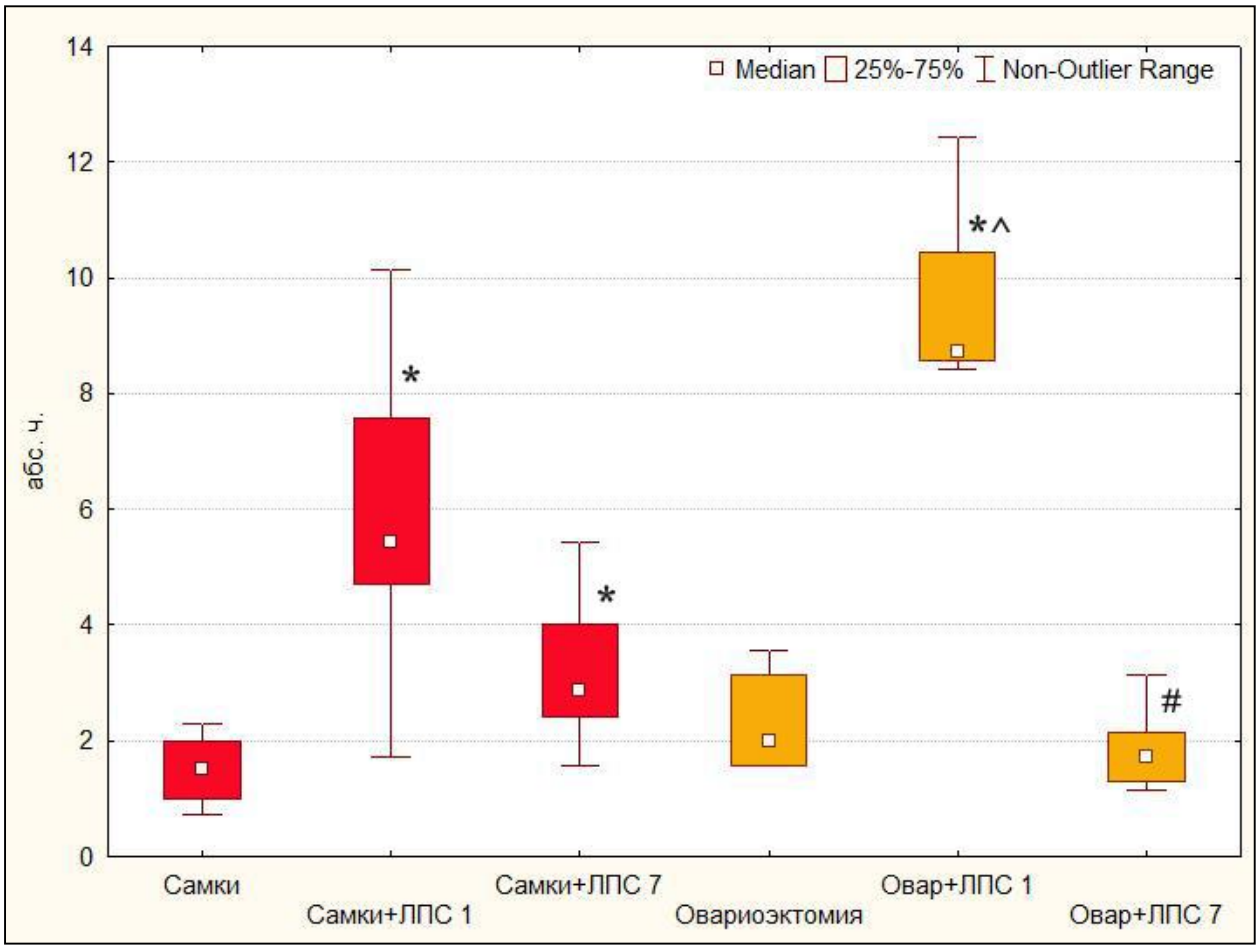


Рис. 7.2.4. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки; Овариэктомия), 1-е (Самки+ЛПС 1; Овар+ЛПС 1) и 7-е (Самки+ЛПС 7; Овар+ЛПС 7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой, ^ – некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС; # - некастрированными самками на 7-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений печени у кастрированных и некастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сутки после введения ЛПС в отдаленные сроки после овариэктомии у 4 животных из 12 в печени наблюдались ландшафтообразные и очаговые некрозы (рис. 7.2.6А), у остальных крыс – средне- и мелкокапельная дистрофия гепатоцитов, более выраженная в периферических отделах дольки (рис. 7.2.5Г). В эти сроки развития СВО у некастрированных самок дистрофические изменения гепатоцитов были менее выражены (рис. 7.2.5В), некрозы встречались реже (у 1 крысы из 7). В печени у кастрированных самок через сутки после введения ЛПС число неэпителиальных клеточных элементов, в том числе нейтрофилов, по ходу балок было увеличено. По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, выявляются

стазы и сладжи.

На 7-е сутки после введения ЛПС у некастрированных самок наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры печени, выраженность дистрофических изменений снижалась (рис. 7.2.5Д, Е, рис. 7.2.5В, Г). Вакуольная дистрофия была слабо выражена. Гепатоциты с дистрофическими изменениями локализовались преимущественно в периферических отделах долек.

По показателям патологических изменений в печени между кастрированными и некастрированными самками с СВО в разные сроки после введения ЛПС статистически значимых различий выявлено не было (табл. 7.2.2, рис. 7.2.7).

Сравнительная характеристика изменения уровня активности АлАТ и АсАТ, эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у некастрированных и кастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у некастрированных самок наблюдалось снижение уровня активности АлАТ и АсАТ, тогда как у кастрированных в эти сроки активность этих ферментов не изменялась по отношению к контрольной группе (табл. 7.2.3, рис. 7.2.8). На 7-е сут СВО активность АлАТ и АсАТ у некастрированных самок достигала контрольных значений, а у овариэктомированных животных не отличалась от показателей контрольной группы (табл. 7.2.3, рис. 7.2.8).

На 1-е сут развития СВО у овариэктомированных крыс Вистар выявлено увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови, и этот показатель был выше в 100 раз по сравнению с некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС (табл. 7.2.4, рис. 7.2.9А). На 7-е сут эксперимента в сыворотке крови некастрированных самок уровень эндотоксина не отличался от значений в контрольной группе, а в отдаленные сроки после овариэктомии наблюдалось снижение уровня эндотоксина по сравнению с 1-ми сут развития СВО (табл. 7.2.4, рис. 7.2.9А).

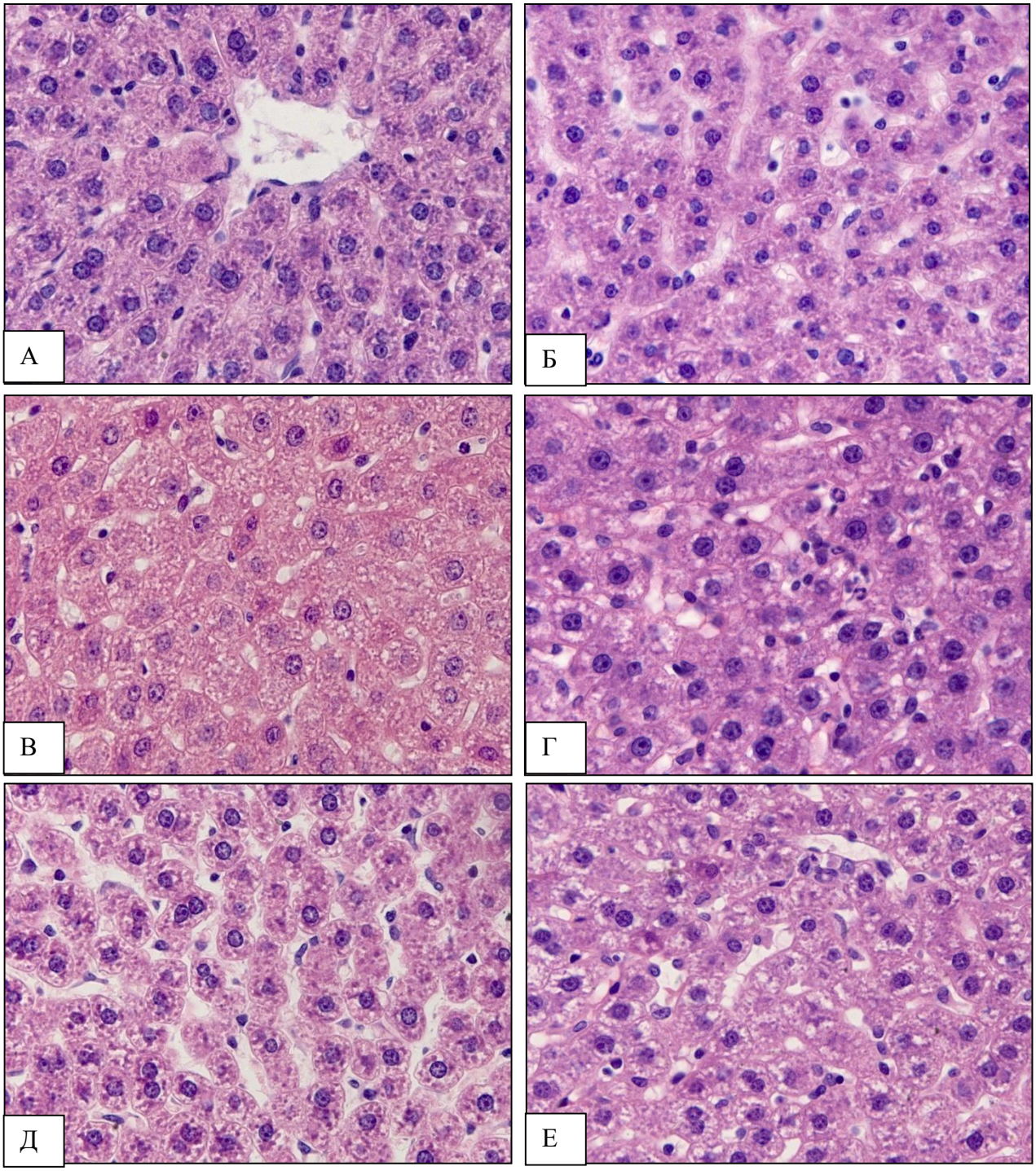


Рис. 7.2.5. Морфологические изменения печени в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа (А, Б):* в цитоплазме гепатоцитов базофильная зернистость, дистрофических изменений нет. *На 1-е сут после введения ЛПС*: *некастрированные самки* (В) – выраженная мелко- и средневакуольная дистрофия гепатоцитов; *овариэктомированные самки* (Г) – выраженная дистрофия гепатоцитов, диффузно рассеянные нейтрофилы. *На 7-е сут после введения ЛПС*: *некастрированные самки* (Д) – дистрофические изменения гепатоцитов минимально выражены; *овариэктомированные самки* (Е) – дистрофические изменения слабо выражены. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 640

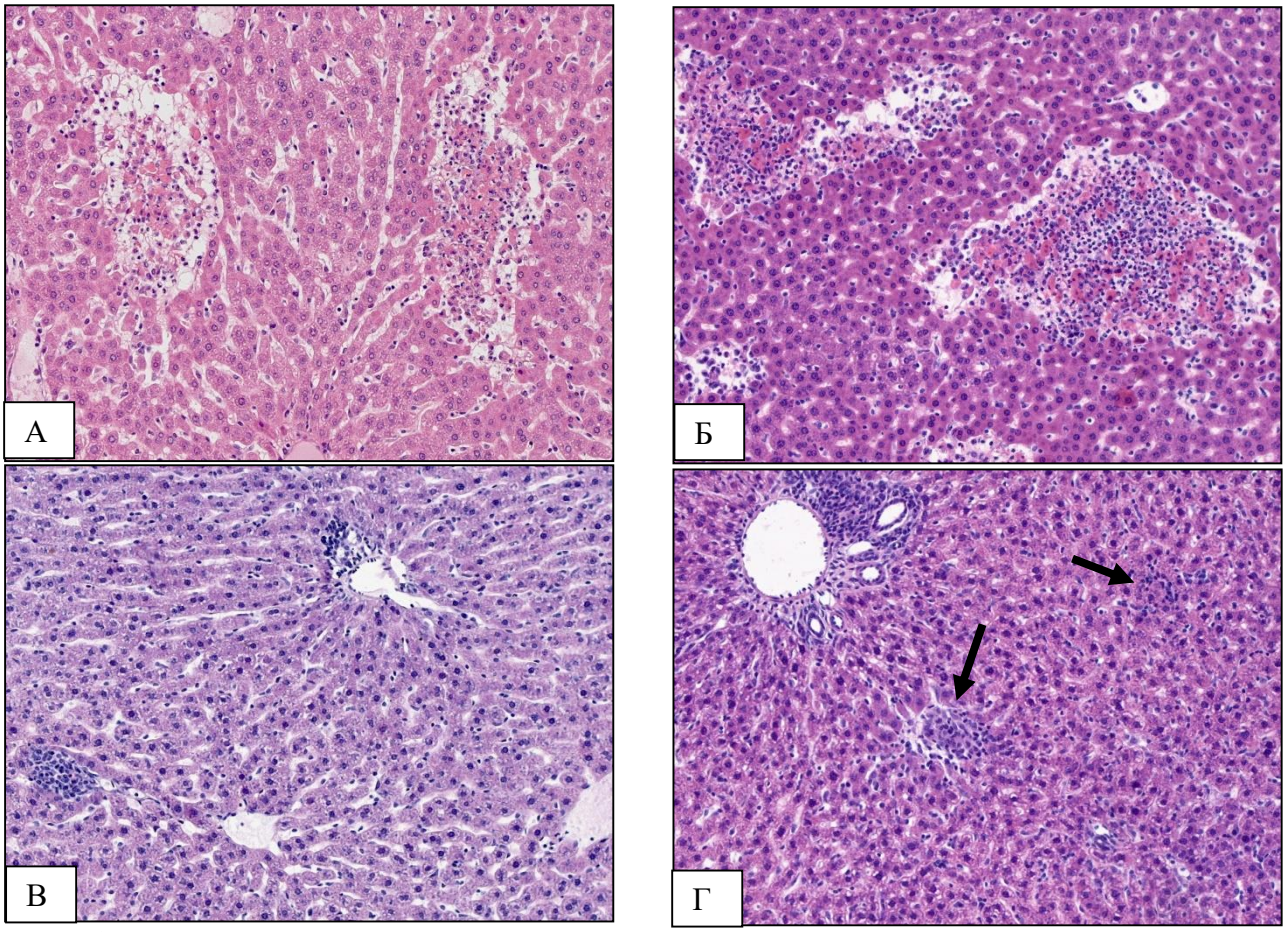


Рис. 7.2.6. Морфологические изменения печени в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *На 1-е сут после введения ЛПС:* некастрированные самки (А) – обширные некрозы, неравномерное полнокровие сосудов; овариэктомированные самки (Б) – очаговые некрозы. *На 7-е сут после введения ЛПС* (В, Г) – организация очагов некрозов (указаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. А, Б, В, Г, - ув. 200

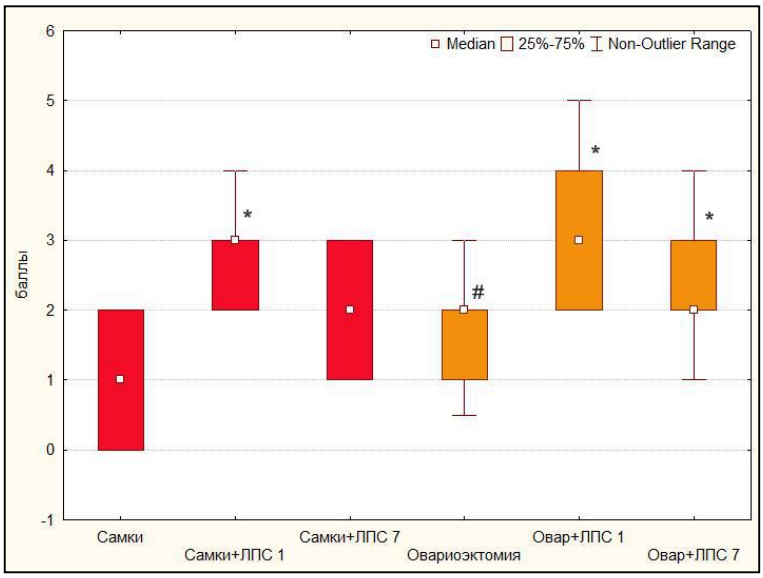


Рис. 7.2.7. Показатель альтеративных изменений в печени в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки; Овариэктомия), 1-е (Самки+ЛПС 1; Овар+ЛПС 1) и 7-е сут (Самки+ЛПС 7; Овар+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой, # - некастрированными самками

Таблица 7.2.3

Показатели уровня активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Ферменты печени, Е/л	
		АлАТ	АсАТ
Без овариэктомии	Контрольная	57 (54-92)[1*]	143 (142-180)[1]
	ЛПС 1-е сут	20 (16-31)[2]	39 (39-68)[2]
	ЛПС 7-е сут	47 (43-51)[3]	146 (136-151)[3]
Отдаленные сроки после овариэктомии	Контрольная	69 (59-75)[4]	160,5 (140-174)[4]
	ЛПС 1-е сут	54,5 (43-117)[5]	168,5(111-201)[5]
	ЛПС 7-е сут	69,5 (63-70)[6]	155 (140-163)[6]
Статистическая значимость различий (p)		0,0201[1-2] 0,1011[1-3] 0,0062[2-3] 0,91[4-5] 0,117[4-6] 0,605[5-6] 0,2252[1-4] 0,001[2-5] 0,168[3-6]	0,0201[1-2] 0,8815[1-3] 0,0062[2-3] 0,675[4-5] 0,05[4-6] 0,25[5-6] 0,159[1-4] 0,001[2-5] 0,2506[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

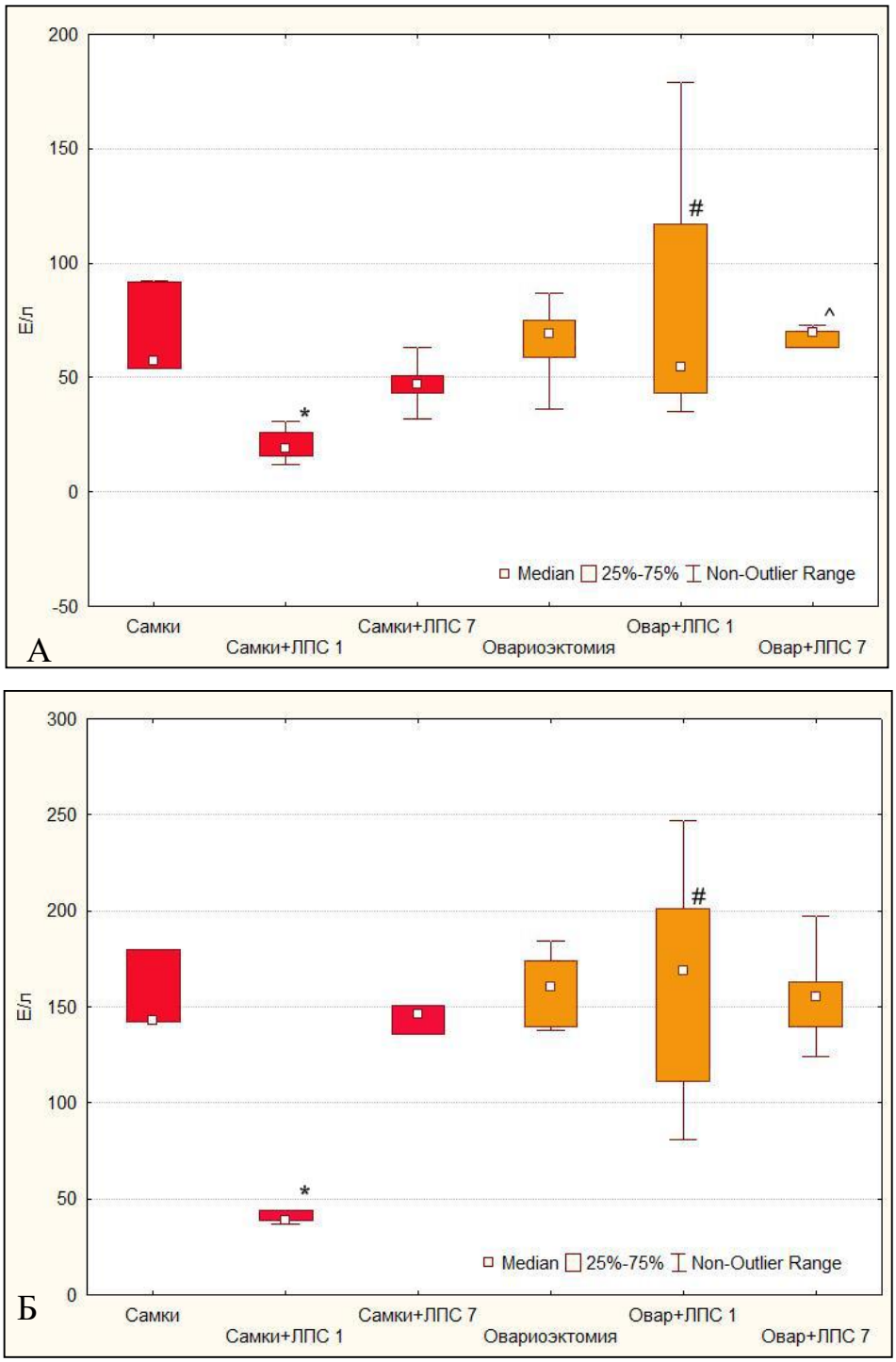


Рис. 7.2.8. Изменение уровня активности АлАТ (А) и АсАТ (Б) в сыворотке крови в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки; Овариэктомия), 1-е (Самки+ЛПС 1; Овар+ЛПС 1) и 7-е (Самки+ЛПС 7; Овар+ЛПС 7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; # - некастрированными самками через сутки после введения ЛПС; ^ - некастрированными самками на 7-е сут после введения ЛПС

Таблица 7.2.4

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
Без овариэктомии	**Контрольная**	3,14 (2,85-3,19)[1*]	64,47 (54,6-74,4)[1]
	ЛПС 1-е сут	3,48 (3,06-5,33)[2]	109,8 (107,3-140,3)[2]
	ЛПС 7-е сут	2,33 (1,69-3,36)[3]	71,22 (65,88-76,86)[3]
Отдаленные сроки после оавриоэктомии	**Контрольная**	0,58 (0,19-1,00)[4]	175,9 (142,3-183,9)[4]
	ЛПС 1-е сут	360 (110-440)[5]	189,1 (114,5-215,0)[5]
	ЛПС 7-е сут	0,32 (0,13-2,19)[6]	397,0 (371,5-417,5)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,3408^{1-2}$ $0,1090^{1-3}$ $0,0357^{2-3}$ $0,00001^{4-5}$ $0,91^{4-6}$ $0,0008^{5-6}$ $0,0001^{1-4}$ $0,0001^{2-5}$ $0,0003^{3-6}$	$0,0455^{1-2}$ $0,3613^{1-3}$ $0,0918^{2-3}$ $0,33^{4-5}$ $0,0038^{4-6}$ $0,0039^{5-6}$ $0,024^{1-4}$ $0,11^{2-5}$ $0,0007^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самок содержание кортикостерона в сыворотке крови было статистически значимо выше, чем в контрольной группе, тогда как у овариэктомированных крыс его концентрация не изменялась (табл. 7.2.4, рис. 7.2.9Б). На 7-е сут после введения ЛПС у некастрированных самок концентрация кортикостерона нормализовалась и не отличалась от значений соответствующей контрольной группы, а в отдаленные сроки после овариэктомии его содержание возрастало по сравнению с контрольной группой и на 1-е сут развития СВО (табл. 7.2.4 , рис. 7.2.9Б).

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у кастрированных и некастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у 9 из 12 овариэктомированных самок в тимусе выявлялась акцидентальная инволюция, которая проявлялась в виде картины «звездного неба» в корковом веществе. На 1-е сут развития СВО у всех кастрированных самок корковое вещество тимуса сужалось, в нем обнаружена картина «звездного неба» (рис. 7.2.10).

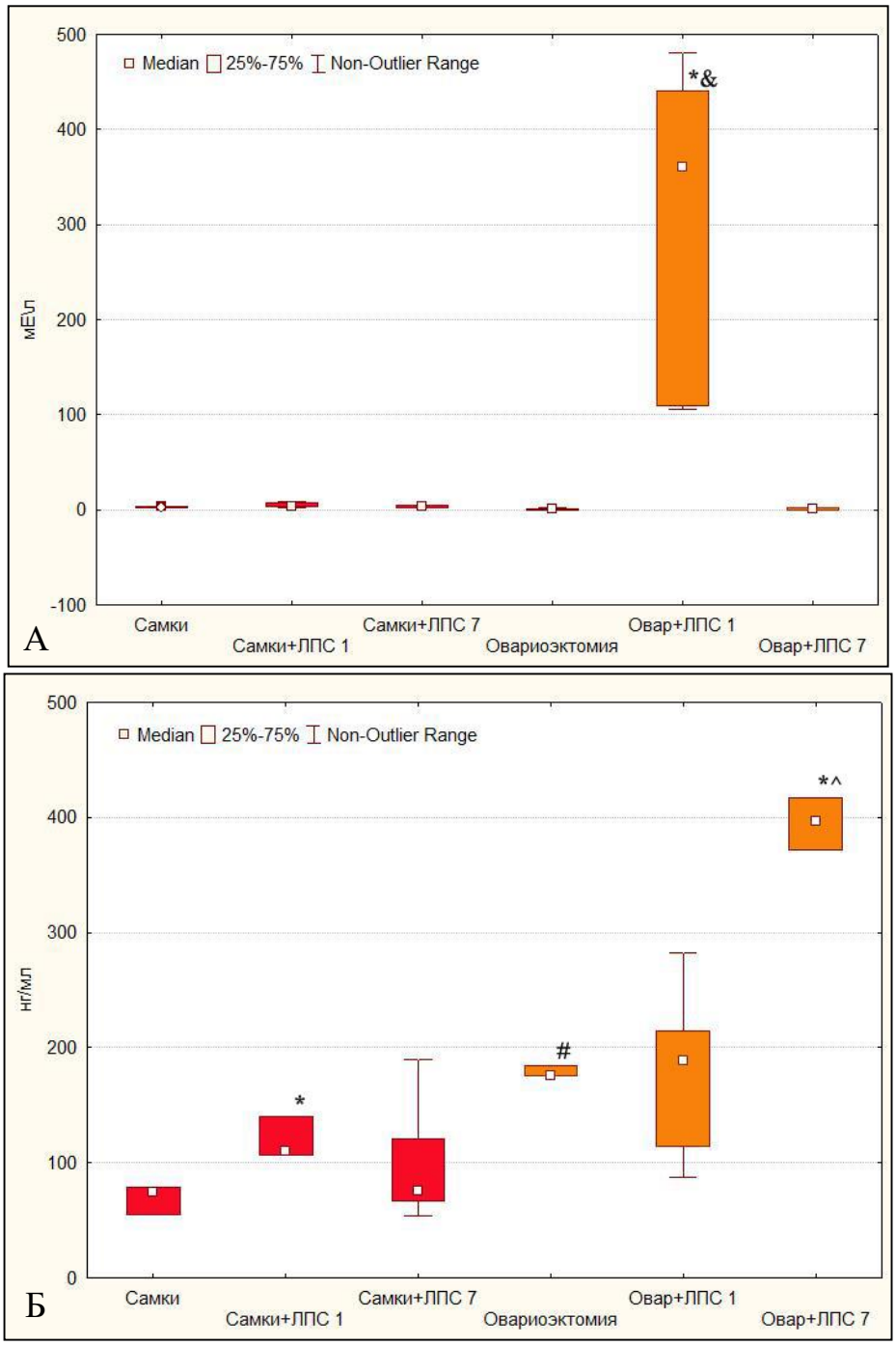


Рис. 7.2.9. Изменение уровня эндотоксина (А) и содержания кортикостерона (Б) в сыворотке крови в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки; Овариэктомия), 1-е (Самки+ЛПС 1, Овар+ЛПС 1) и 7-е сут (Самки+ЛПС 7, Овар+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой; # - некастрированными самками, & - некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС; ^ - некастрированными самками на 7-е сут после введения ЛПС

Субкапсулярная зона тимуса у кастрированных крыс Вистар на 1-е сут развития СВО была широкой и состояла из 8-10 рядов лимфобластов (рис. 7.2.11). В мозговом веществе тимуса у овариэктомированных крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС выявлялись тимические тельца I-II фаз развития.

На 7-е сут после введения ЛПС в тимусе у кастрированных самок обнаружено широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом были четкие (рис. 7.2.10). Субкапсулярная зона была широкой и состояла из 10-12 рядов лимфобластов (рис. 7.2.11).

По данным морфометрического анализа на 1-е сут после введения ЛПС показатели объемной доли коркового вещества тимуса и индекс отношения объемной доли коркового вещества к мозговому у овариэктомированных крыс Вистар было статистически значимо выше по сравнению с некастрированными самками (табл. 7.2.5, рис. 7.2.12А). На 1-е сут после введения ЛПС у кастрированных самок наблюдалось сужение коркового вещества тимуса относительно соответствующей контрольной группы, тогда как у самок без кастрации на 1-е сут развития СВО показатель объемной доли коркового вещества, наоборот, увеличивался. На 7-е сут эксперимента у некастрированных самок объемная доля коркового вещества тимуса не изменялась по сравнению с более ранними сроками эксперимента, тогда как у самок без овариэктомии этот показатель статистически значимо повышался (табл. 7.2.5, рис. 7.2.12А). Ширина субкапсулярной зоны как у овариэктомированных, так и у некастрированных самок на 1-е сут развития СВО была ниже показателей соответствующей контрольной группы, однако в отдаленные сроки после овариэктомии этот показатель был статистически значимо выше значений в группе крыс без кастрации (табл. 7.2.5, рис. 7.2.12Б). На 7-е сут после введения ЛПС показатели ширины субкапсулярной зоны тимуса как у кастрированных, так и некастрированных животных нормализовались (табл. 7.2.5, рис. 7.2.12Б).

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самок развивается акцидентальная инволюция тимуса I стадии, что сопровождается расширением объемной доли коркового вещества и сужением его субкапсулярной зоны. Развитие СВО в отдаленные сроки после орхиэктомии, напротив, характеризуется сужением коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны.

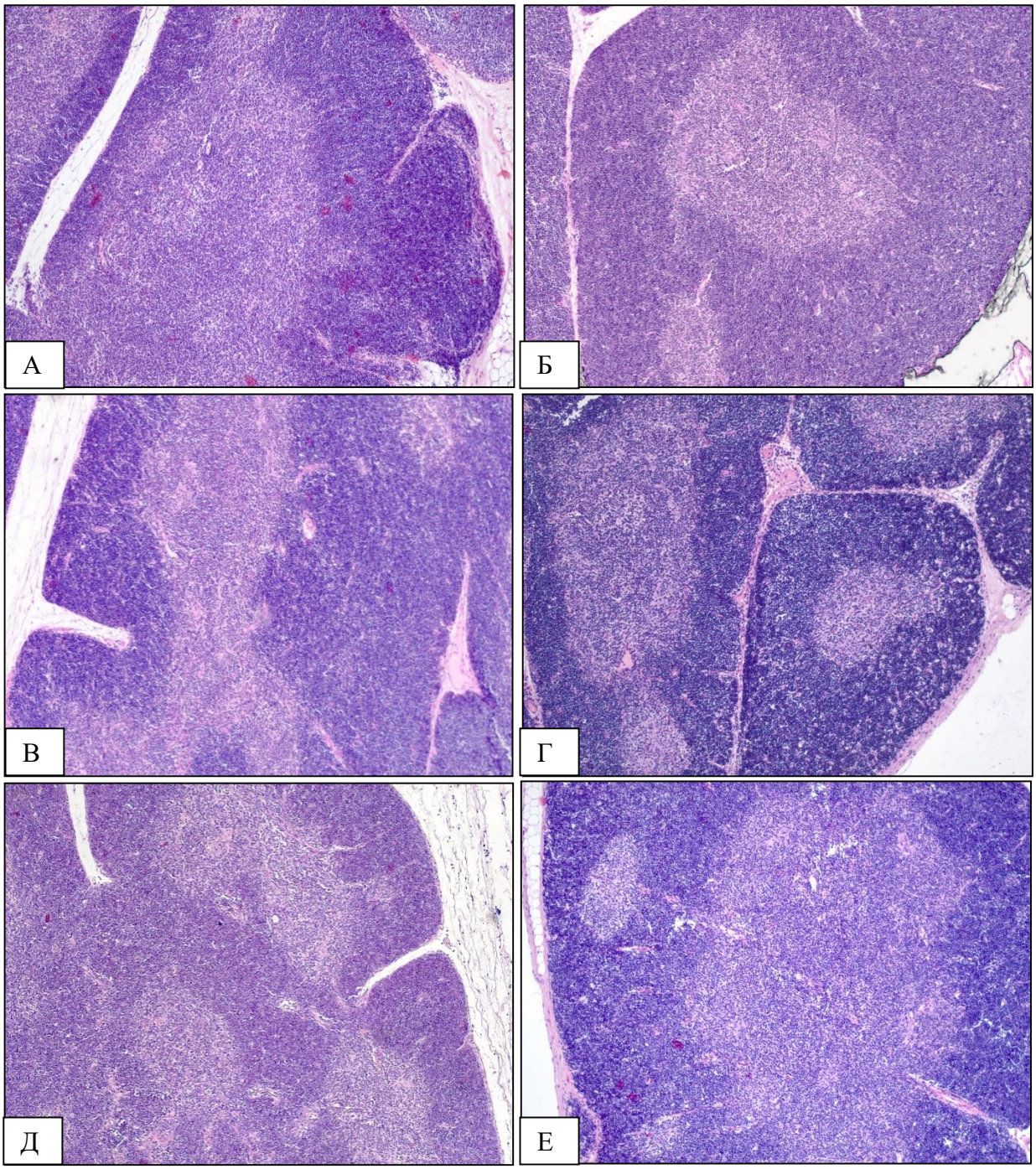


Рис. 7.2.10. Морфологические изменения тимуса в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа, некастрированные самки (А)* – корковое и мозговое вещество плотно «заселено» лимфоцитами, границы между корковым и мозговым веществом четкие; *отдаленные сроки после овариэктомии (Б)*: широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (В) – акцидентальная инволюция I стадии, широкое корковое вещество; *отдаленные сроки после овариэктомии (Г)* – картина «звездного неба» в корковом веществе. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (Д) – широкое корковое вещество тимуса, границы между корковым и мозговым веществом четкие; *отдаленные сроки после овариэктомии* (Е) – широкое корковое вещество тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

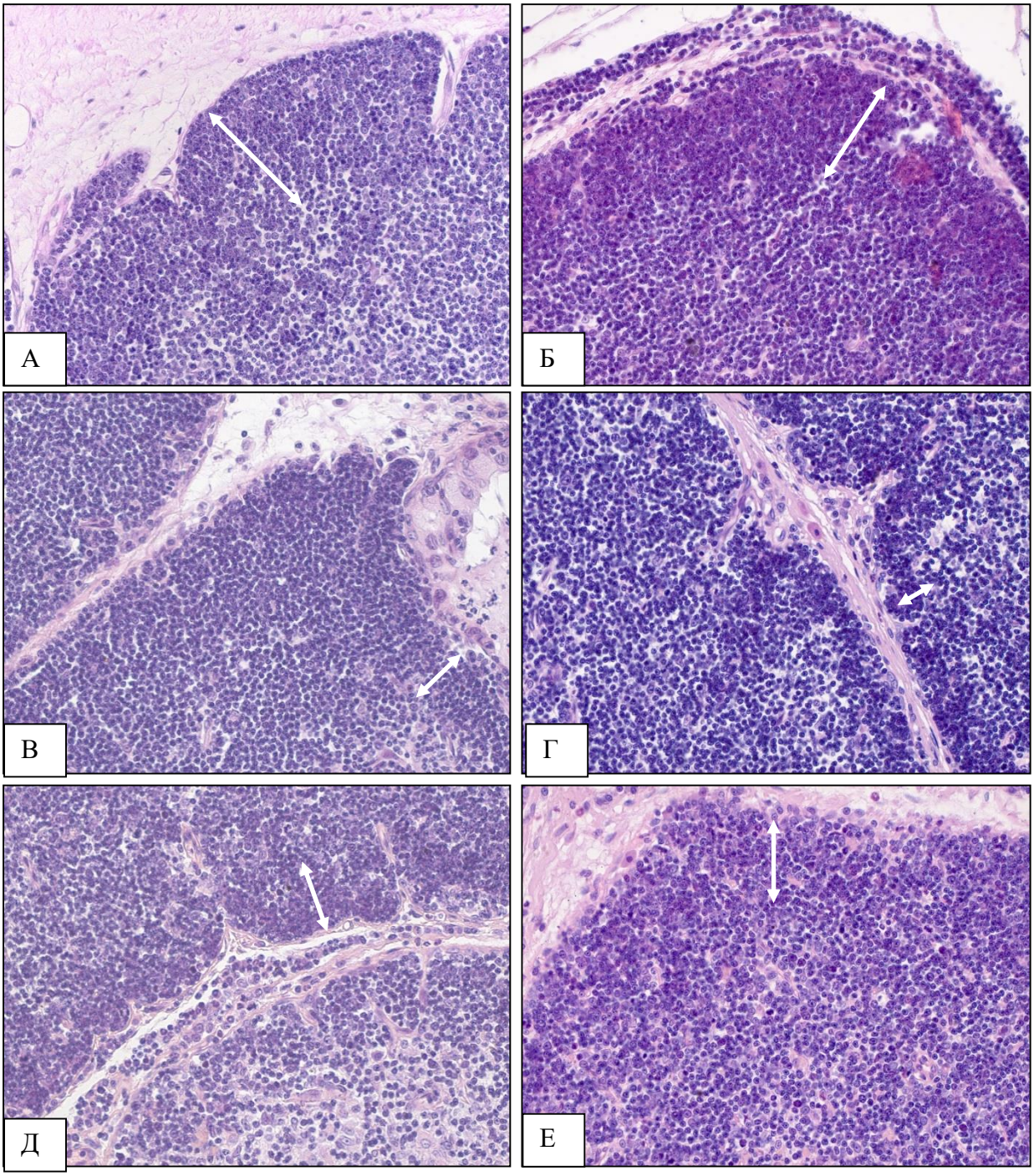


Рис. 7.2.11. Морфологические изменения тимуса в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа*: *некастрированные самки* (А) – субкапсулярная зона представлена 8-10 рядами лимфобластов; *овариэктомированные самки* (Б) – субкапсулярная зона широкая, представлена 10-14 рядами лимфобластов. *На 1-е сут после введения ЛПС*: *некастрированные самки* (В) – узкая субкапсулярная зона; *овариэктомированные самки* (Г) – субкапсулярная зона узкая, представлена 2-5 рядами лимфобластов. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (Д) – субкапсулярная зона представлена 6-8 рядами лимфобластов; *овариэктомированные самки* (Е) – субкапсулярная зона представлена 8-10 рядами лимфобластов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

Таблица 7.2.5

Морфометрическая характеристика тимуса у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина СКЗ, мкм
		КВ	МВ		
Без овариэктомии	Контрольная	49,17[1*] (46,17-54,00)	50,83[1] (46,0-53,8)	1,02[1] (0,89-1,22)	34,1[1] (31,3-37,2)
	ЛПС 1-е сут	58,18[2] (54,29-58,57)	41,82[2] (41,13-45,71)	1,46[2] (1,26-1,57)	25,2[2] (21,2-27,8)
	ЛПС 7-е сут	63,17[3] (61,40-63,40)	36,83[3] (36,60-38,60)	1,75[3] (1,63-1,76)	40,0[3] (38,9-42,0)
Отдаленные сроки после овариэктомии	Контрольная	69,30[4] (66,80-72,30)	30,70[4] (27,70-33,20)	2,32[4] (2,06-2,66)	50,3[4] (44,7-50,6)
	ЛПС 1-е сут	61,05[5] (59,96-63,27)	38,95[5] (36,73-40,04)	2,04[5] (1,65-2,08)	37,7[5] (37,7-39,5)
	ЛПС 7-е сут	62,57[6] (56,58-64,41)	37,43[6] (35,59-43,42)	1,80[6] (1,45-1,91)	51,5[6] (44,2-53,5)
Статистическая значимость различий (p)		$0,004^{1-2}$ $0,0009^{1-3}$ $0,01^{2-3}$ $0,002^{4-5}$ $0,003^{4-6}$ $0,81^{5-6}$ $0,0003^{1-4}$ $0,0028^{2-5}$ $0,83^{-6}$	$0,004^{1-2}$ $0,0009^{1-3}$ $0,01^{2-3}$ $0,002^{4-5}$ $0,003^{4-6}$ $0,81^{5-6}$ $0,0003^{1-4}$ $0,0028^{2-5}$ $0,83^{-6}$	$0,003^{2}$ $0,0009^{1-3}$ $0,02^{2-3}$ $0,0001^{4-5}$ $0,01^{4-6}$ $0,67^{5-6}$ $0,035^{-4}$ $0,005^{2-5}$ $0,32^{3-6}$	$0,0008^{1-2}$ $0,009^{1-3}$ $0,0027^{2-3}$ $0,11^{4-5}$ $0,14^{4-6}$ $0,14^{5-6}$ $0,004^{1-4}$ $0,004^{2-5}$ $0,62^{3-6}$

Условные обозначения: КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество, СКЗ – субкапсулярная зона; * - номер группы наблюдения

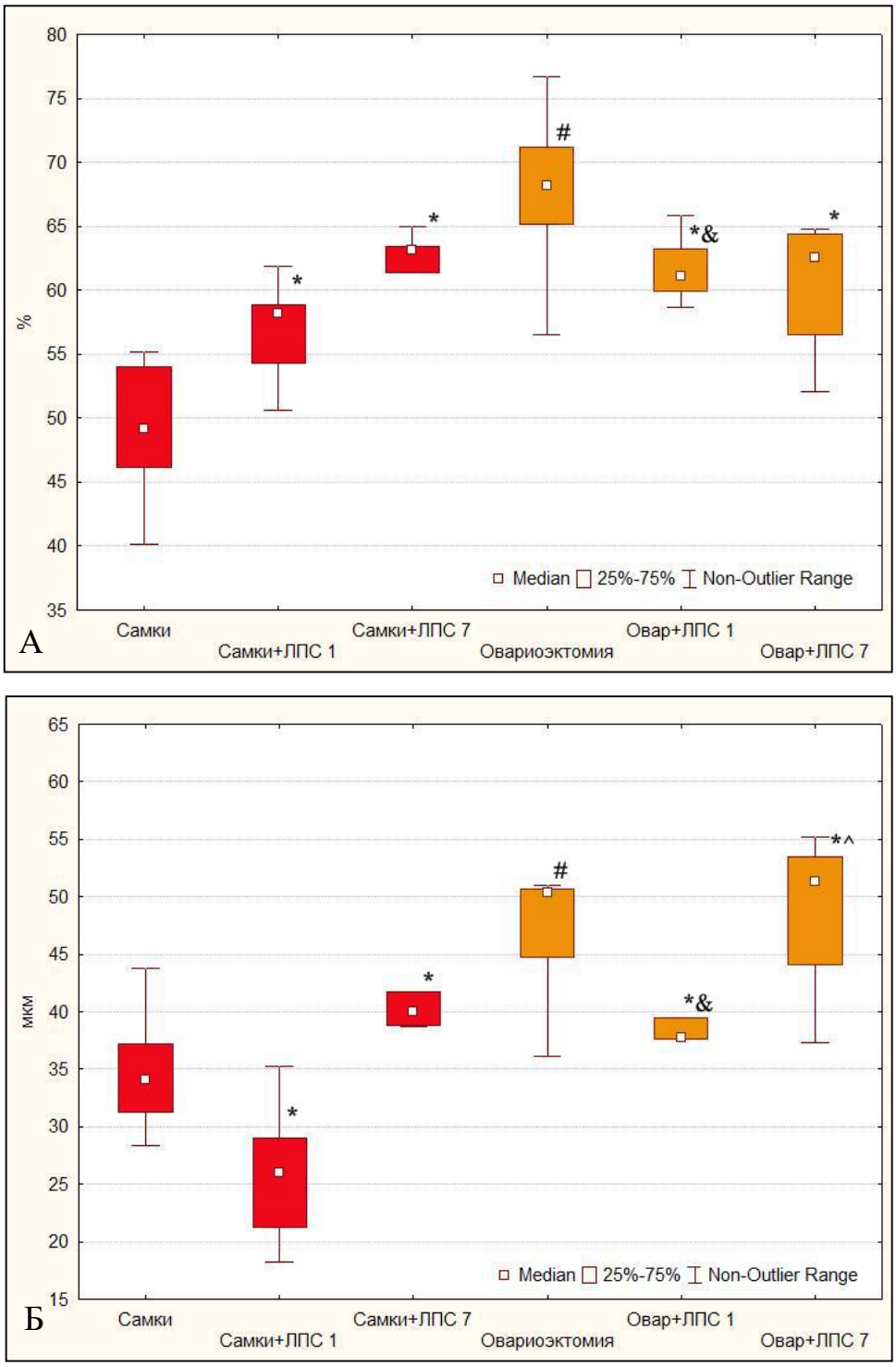


Рис. 7.2.12. Изменение объемной доли коркового вещества тимуса (А) и ширины субкапсулярной зоны (Б) в разные сроки развитии СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки; Овариэктомия), 1-е (Самки+ ЛПС 1; Овар+ЛПС 1) и 7-е (Самки+ ЛПС 7; Овар+ЛПС 7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; # - некастрированными самками; & - некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС; ^ - некастрированными самками на 7-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений селезенки у некастрированных и кастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у овариэктомированных крыс Вистар в селезенке структура белой пульпы не изменялась (рис. 7.2.13Г): показатель объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков не отличался от значений в контрольной группе. Тогда как у некастрированных самок на 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось «опустошение» белой пульпы селезенки за счет снижения объемной доли как лимфоидных узелков, так и ПАЛМ-зоны. В эти сроки у овариэктомированных самок наблюдалось сужение маргинальных зон и выраженное расширение герминативных центров лимфоидных узелков, в которых выявлялись единичные митозы, фрагменты ядер (рис. 7.2.14Г, табл. 7.2.6), тогда как у некастрированных самок обнаружено только расширение маргинальных зон (табл. 7.2.6).

По сравнению с контрольной группой и на 1-е сут развития СВО на 7-е сут у овариэктомированных крыс Вистар в селезенке изменений показателей объемной доли ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков не обнаружено (табл. 7.2.6. рис. 7.2.13Е). Показатели объемной доли маргинальных зон и светлых центров лимфоидных узелков у кастрированных самок в эти сроки нормализовались, и они не отличались от значений в контрольной группе (табл. 7.2.6, рис. 7.2.14Е). У некастрированных самок на 7-е сут после введения ЛПС обнаружено увеличение объемной доли белой пульпы селезенки и сужение герминативных центров лимфоидных узелков (рис. 7.2.13Д; рис. 7.2.14Д, рис. 7.2.15В).

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самок выявлено «опустошение» белой пульпы селезенки (рис. 7.2.15А, Б). При введении ЛПС в отдаленные сроки после овариэктомии изменений в выраженности белой пульпы селезенки не выявлено (рис. 7.2.15А, Б). По сравнению с некастрированными самками через сутки после введения ЛПС у овариэктомированных крыс выявлено более выраженное расширение герминативных центров лимфоидных узелков и сужение их маргинальных зон, что свидетельствует об активации процессов пролиферации и миграции В-лимфоцитов у кастрированных самок. На 7-е сут после введения ЛПС как у некастрированных, так и у кастрированных самок обнаруживается тенденция к нормализации структуры органа.

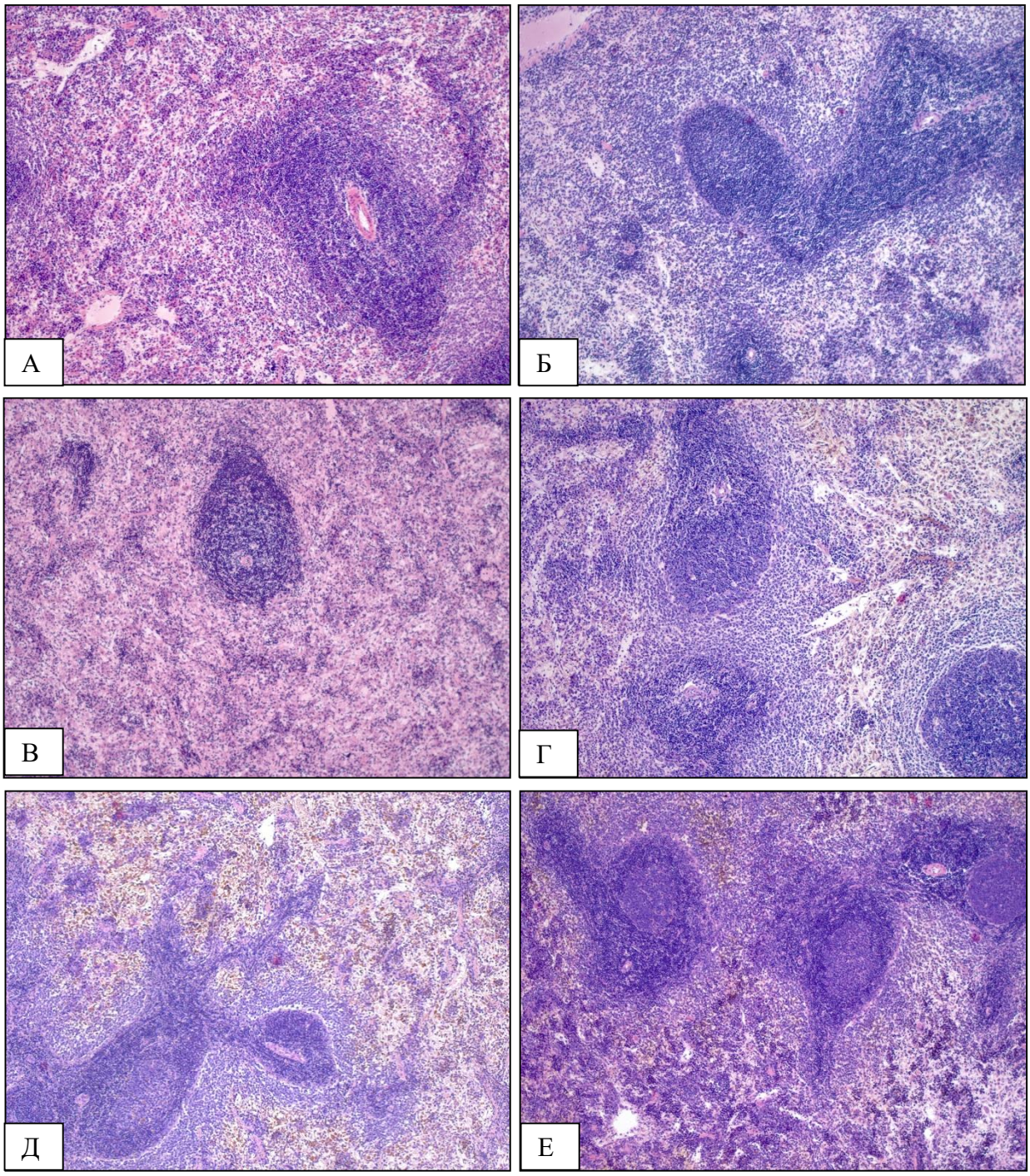


Рис. 7.2.13. Морфологические изменения селезенки в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа: некастрированные самки* (А) – выраженная ПАЛМ; *овариэктомированные самки* (Б) – ПАЛМ-зона выражена, лимфоидный узелок со светлым центром. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (В) – «опустошение» белой пульпы; *овариэктомированные самки* (Г) – широкая ПАЛМ-зона и крупные лимфоидные узелки с крупными светлыми центрами. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (Д) – гиперплазия белой пульпы, крупные герминативные центры лимфоидных узелков; *овариэктомированные самки* (Е) – широкая ПАЛМ-зона и крупные лимфоидные узелки с широкими светлыми центрами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

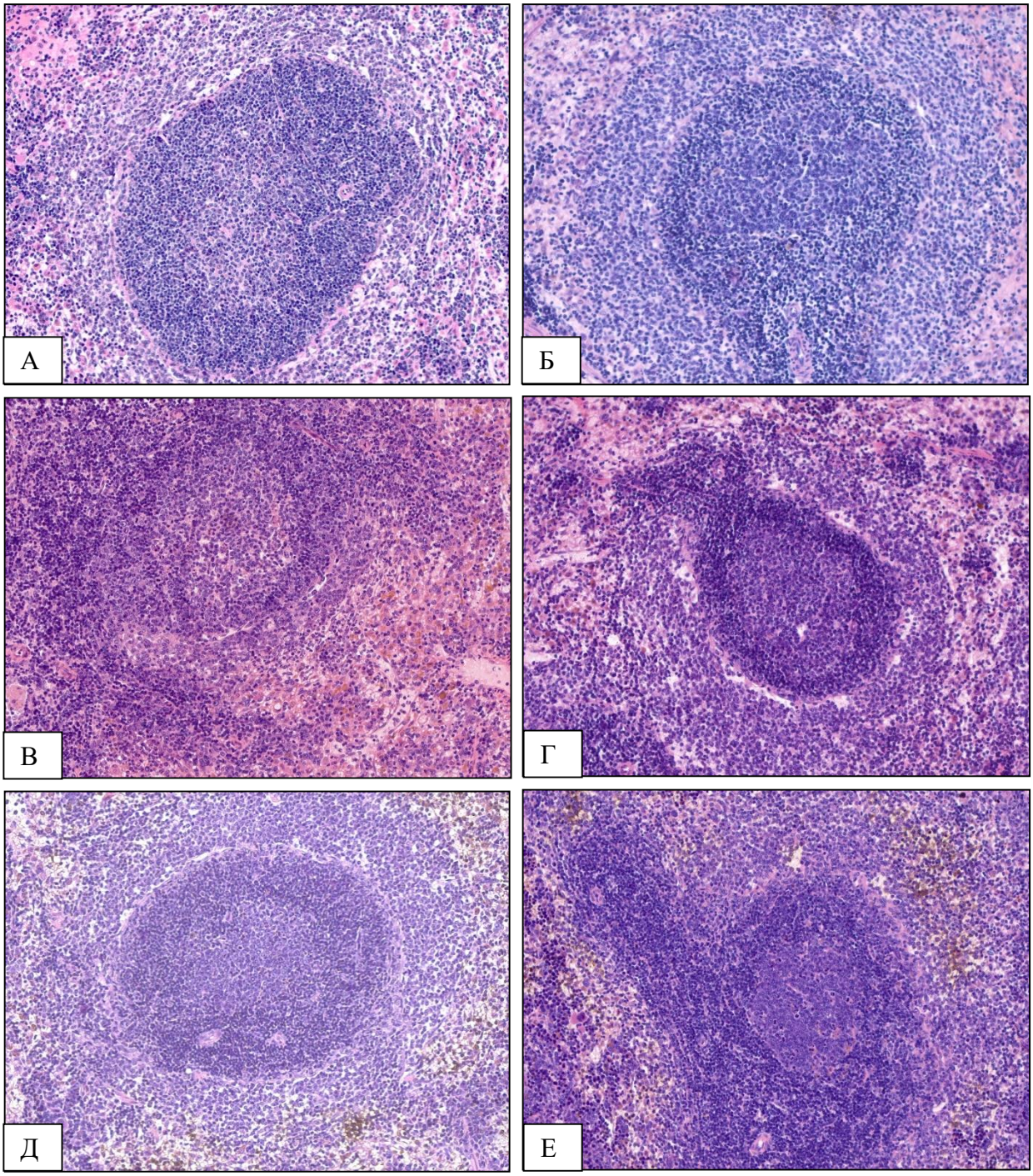


Рис. 7.2.14. Морфологические изменения лимфоидных узелков селезенки в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки (А, В, Д) и в отдаленные сроки после овариэктомии (Б, Г, Е). *Контрольная группа: некастрированные самки* (А) – лимфоидный узелок со светлым центром; *овариэктомированные самки* (Б) –лимфоидный узелок с широкой маргинальной зоной. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (В) – лимфоидный узелок с широким светлым центром; *овариэктомированные самки* (Г) – широкий светлый центр лимфоидного узелка. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самки* (Д) – лимфоидный узелок со светлым центром и широкой маргинальной зоной; *орхиэктомированные самки* (Е) – лимфоидный узелок со светлым центром и широкой маргинальной зоной. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

Таблица 7.2.6

Морфометрические показатели селезенки у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (m±M)

Группа наблюдения		Селезенка				Лимфоидные узелки селезенки	
		ПАЛМ, %	Лимфоидные узелки, %	БП, %	Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	МЗ, %	Герминативные центры, %
Без овариэктомии	Контрольная	41,4[1*] (35,8-43,6)	27,0[1] (26,6-28,0)	68,4[1] (62,4-70,6)	2,44[1] (1,68-2,67)	33,9[1] (29,5-35,4)	22,2[1] (19,2-25,7)
	ЛПС 1-е сут	23,2[2] (22,0-24,4)	14,2[2] (13,4-16,4)	37,2[2] (35,6-40,8)	0,59[2] (0,56-0,70)	41,6[2] (40,6-43,0)	25,6[2] (24,6-26,2)
	ЛПС 7-е сут	30,2[3] (29,8-31,0)	19,0[3] (18,2-19,4)	49,2[3] (48,8-50,4)	0,98[3] (0,96-1,03)	43,2[3] (41,6-44,6)	16,2[3] (14,6-17,4)
В отдаленные сроки после овариэктомии	Контрольная	27,8[4] (23,6-28,6)	12,6[4] (11,4-12,8)	40,6[4] (36,2-42,6)	0,72[4] (0,59-0,77)	34,9[4] (26,2-50,2)	20,2[4] (14,6-28,2)
	ЛПС 1-е сут	24,2[5] (23,0-25,4)	13,0[5] (11,0-18,6)	38,4[5] (34,0-45,4)	0,63[5] (0,54-0,89)	22,6[5] (22,6-23,3)	77,3[5] (76,7-77,4)
	ЛПС 7-е сут	28,2[6] (27,2-28,2)	17,6[6] (14,0-19,6)	47,6[6] (43,4-47,8)	0,91[6] (0,80-0,94)	38,9[6] (24,4-47,2)	22,0[6] (21,4-26,8)
Статистическая значимость различий (p)		0,00009[1-2] 0,003[3] 0,000007[2-3] 0,6[4-5] 0,6[4-6] 0,07[5-6] 0,006[1-4] 0,4[2-5] 0,048[3-6]	0,00009[1-2] 0,0005[1-3] 0,0002[2-3] 0,9[4-5] 0,3[4-6] 0,5[5-6] 0,0027[1-4] 0,55[2-5] 0,46[3-6]	0,00009[1-2] 0,0005[1-3] 0,000007[2-3] 0,9[-5] 0,17[4-6] 0,25[5-6] 0,002[1-4] 0,72[2-5] 0,004[3-6]	0,00009[1-2] 0,0005[1-3] 0,000007[2-3] 0,9[4-5] 0,11[4-6] 0,17[5-6] 0,0027[1-4] 0,73[2-5] 0,0042[3-6]	0,00009[1-2] 0,0005[1-3] 0,03[2-3] 0,12[4-5] 0,75[4-6] 0,04[5-6] 0,84[1-4] 0,001[2-5] 0,5[3-6]	0,05[1-2] 0,0003[1-3] 0,000007[2-3] 0,009[4-5] 0,91[4-6] 0,009[5-6] 0,84[1-4] 0,001[2-5] 0,049[3-6]

Условные обозначения: ПАЛМ – периартериолярные лимфоидные муфты, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона;
* - номер группы наблюдения

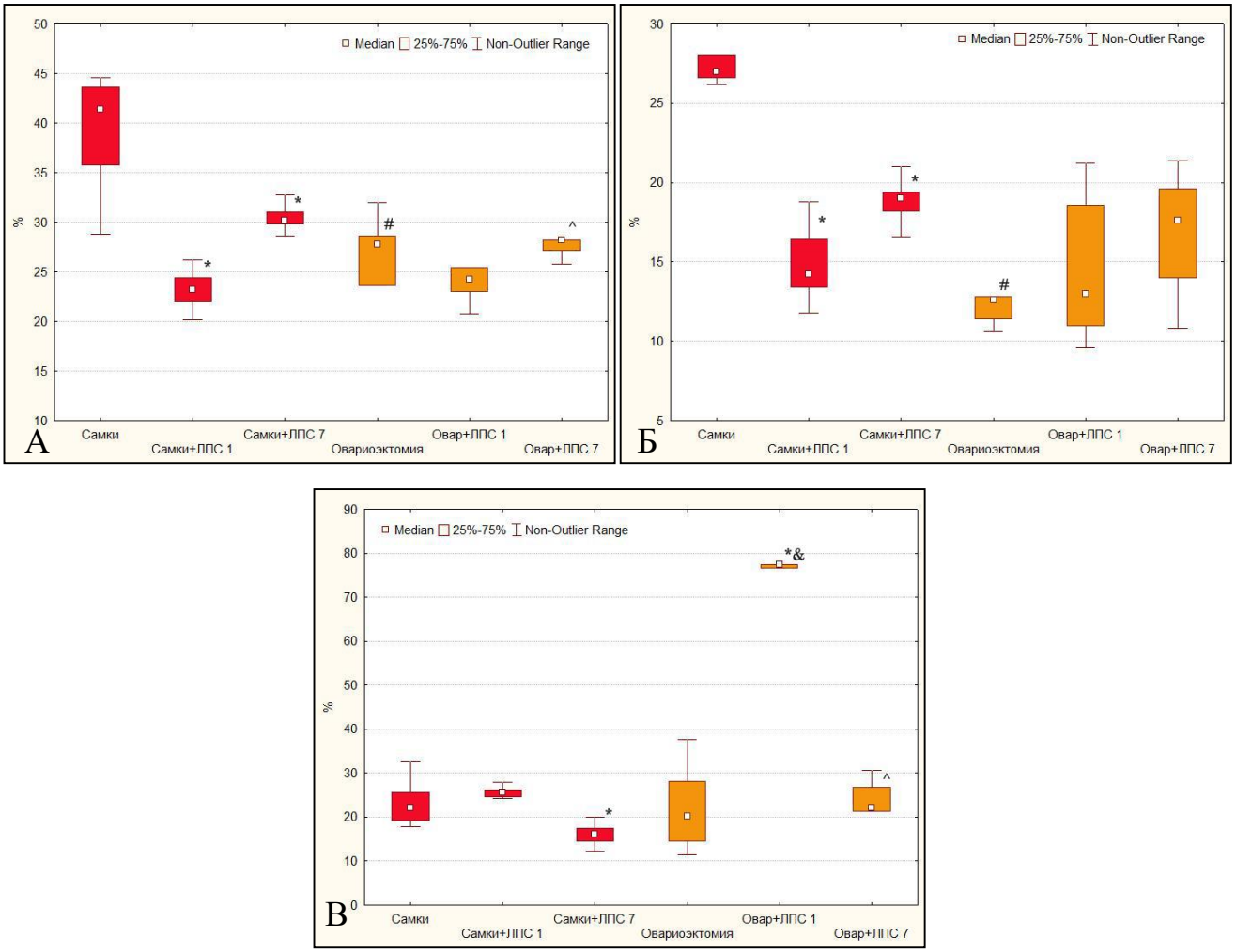


Рис. 7.2.15. Изменение объемной доли ПАЛМ-зоны (А), лимфоидных узелков селезенки (Б), и их светлых центров (В) в разные сроки развитии СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки; Овариэктомия), 1-е (Самки+ЛПС 1; Овар+ЛПС 1) и 7-е (Самки+ЛПС 7; Овар+ЛПС 7) сут после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; # - некастрированными самками, & - некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС; ^ - некастрированными самками на 7-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика содержания цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у кастрированных и некастрированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО концентрация неоптерина в сыворотке крови у кастрированных крыс Вистар не изменялась и не отличалась от значений в контрольной группе, тогда как у некастрированных самок – статистически значимо снижалась по сравнению с соответствующей контрольной группой. Содержание TGF-β в сыворотке крови в эти сроки развития СВО как у некастрированных, так и у овариэктомированных самок уменьшалось (табл. 7.2.7).

В эти сроки эксперимента в культуре клеток селезенки у некастрированных самок наблюдалось снижение уровня продукции ИЛ-2 и ИЛ-12, тогда как у овариэктомированных крыс Вистар показатели продукции этих цитокинов не отличались от контрольной группы. В ответ на

введение ЛПС у некастрированных самок в культуральной жидкости клеток селезенки выявлялось снижение провоспалительного ИЛ-6, уровень продукции которого у некастрированных животных, напротив, повышался (табл. 7.2.8, рис. 7.2.16). Продукция другого провоспалительного цитокина ФНО-α клетками селезенки у некастрированных крыс через сутки после введения ЛПС статистически значимо повышалась по сравнению с контрольной группой, а у овариэктомированных крыс – не изменялась (табл. 7.2.8, рис. 7.2.16). Содержание ИЛ-4 и ИФН-γ в культуральной жидкости клеток селезенки у некастрированных крыс в ответ на введение ЛПС не изменялось, а у некастрированных самок выявлено повышение уровня продукции ИФН-γ (табл. 7.2.8, рис. 7.2.16).

На 7-е сут развития СВО содержание неоптерина в сыворотке крови у кастрированных самок Вистар по сравнению с некастрированными было выше, а содержание TGF-β нормализовалось (табл. 7.2.7).

На 7-е сут после введения ЛПС в культуральной жидкости клеток селезенки у некастрированных уровень продукции ИЛ-2 и ИЛ-6 нормализовался, тогда как у кастрированных самок содержание этих цитокинов снижалось и было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе (табл. 7.2.8, рис. 7.2.16). Уровень продукции ИЛ-12 как у кастрированных, так и у некастрированных самок в эти сроки эксперимента оставался на низком уровне по сравнению с соответствующими контрольными группами (табл. 7.2.8, рис. 7.2.16). В культуральной жидкости у овариэктомированных самок на 7-е сут развития СВО выявлено снижение продукции ФНО-α и ИФН-γ, тогда как у некастрированных продукция ИФН-γ не отличалась от значений контрольной группы, а содержание ФНО-α – нормализовалось. Уровень продукции ИЛ-4 у некастрированных самок на 7-е сут после введения ЛПС статистически значимо был ниже, чем в контрольной группе, а у овариэктомированных крыс его показатели не изменялись ни в один из сроков эксперимента (табл. 7.2.8, рис. 7.2.16).

Таблица 7.2.7

Содержание TGF-β и неоптерина в сыворотке крови у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		TGF-β, нг/мл	Неоптерин, нмоль/л
Без овариэктомии	**Контрольная**	40,5 (33,8-42,7)[1*]	6,04 (5,71-7,41)[1]
	ЛПС 1-е сут	23,0 (13,04-25,7)[2]	3,10 (1,66-3,34)[2]
	ЛПС 7-е сут	-	2,56 (1,98-3,26)[3]
Отдаленные сроки после овариэктомии	**Контрольная**	41,7 (35,9-87,6)[3]	3,25 (1,99-4,69)[4]
	ЛПС 1-е сут	20,3 (1,9-27,1)[4]	4,62 (1,83-5,16)[5]
	ЛПС 7-е сут	66,5 (33,8-42,7)[5]	4,58 (2,52-4,95)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}0005^{1\text{-}2}$ $0{,}0002^{3\text{-}4}$ $0{,}45^{3\text{-}5}$ $0{,}0009^{4\text{-}5}$ $0{,}278^{1\text{-}3}$ $0{,}96^{2\text{-}4}$	$0{,}014^{1\text{-}2}$ $0{,}0007^{1\text{-}3}$ $0{,}69^{2\text{-}3}$ $0{,}84^{4\text{-}5}$ $0{,}46^{4\text{-}6}$ $0{,}91^{5\text{-}6}$ $0{,}0001^{1\text{-}4}$ $0{,}49^{2\text{-}5}$ $0{,}06^{\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таблица 7.2.8

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у овариэктомированных самок крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Уровень продукции цитокинов, пг/мл					
		ИЛ-2	**ИЛ-4**	**ИЛ-6**	**ИЛ-12**	**ИФН-γ**	**ФНО-α**
Без овариэктомии	**Контрольная**	144,5[1*] (89,4-152,9)	15,5[1] (11,9-28,6)	7500[1] (5500-8100)	62,6[1] (16,5-93,2)	8,94[1] (0,0-13,4)	31,4[1] (14,6-45,2)
	ЛПС 1-е сут	47,3[2] (27,6-97,3)	9,07[2] (6,11-25,12)	2758[2] (2239-3445)	0,0[2] (0,0-5,5)	8,95[2] (0,0-51,9)	79,3[2] (75,1-92,3)
	ЛПС 7-е сут	74,8[3] (31,5-102,4)	8,74[3] (3,44-9,78)	7450[3] (7250-8950)	0,0[3] (0,0-36,0)	26,80[3] (8,94-35,8)	18,4[3] (0,0-47,5)
Отдаленные сроки после овариэктомии	**Контрольная**	102,4[4] (94,5-239,9)	13,0[4] (11,6-20,8)	6200[4] (5500-6800)	27,5[4] (16,5-44,5)[4]	40,2[4] (31,3-40,2)	41,4[4] (30,7-44,5)
	ЛПС 1-е сут	118,1[5] (102,4-229,9)	11,2[5] (7,9-12,2)	8540[5] (7900-9800)	0,0[5] (0,0-31,2)	86,0[5] (86,0-105,5)	33,7[5] (33,7-49,1)
	ЛПС 7-е сут	31,5[6] (31,5-55,1)	9,2[6] (4,9-9,9)	3133[6] (2150-4300)	0,0[6] (0,0-0,0)	17,9[6] (17,9-22,4)	24,5[6] (15,3-24,5)
Статистическая значимость различий (p)		0,045[1-2] 0,14[1-3] 0,62[2-3] 0,83[4-5] 0,03[4-6] 0,009[5-6] 0,6[1-4] 0,046[2-5] 0,48[3-6]	0,28[1-2] 0,01[1-3] 0,85[2-3] 0,34[4-5] 0,14[4-6] 0,25[5-6] 0,58[1-4] 0,08[2-5] 0,62[3-6]	0,027[1-2] 0,68[1-3] 0,014[2-3] 0,02[4-5] 0,049[4-6] 0,009[5-6] 0,25[1-4] 0,0048[2-5] 0,0047[3-6]	0,029[1-2] 0,04[1-3] 0,77[2-3] 0,39[4-5] 0,03[4-6] 0,36[5-6] 0,49[1-4] 0,82[2-5] 0,31[3-6]	0,740[1-2] 0,14[1-3] 0,44[2-3] 0,045[4-5] 0,008[4-6] 0,008[5-6] 0,01[1-4] 0,006[2-5] 0,26[3-6]	0,016[1-2] 0,52[1-3] 0,016[2-3] 0,92[4-5] 0,03[4-6] 0,03[5-6] 0,31[1-4] 0,01[2-5] 0,45[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

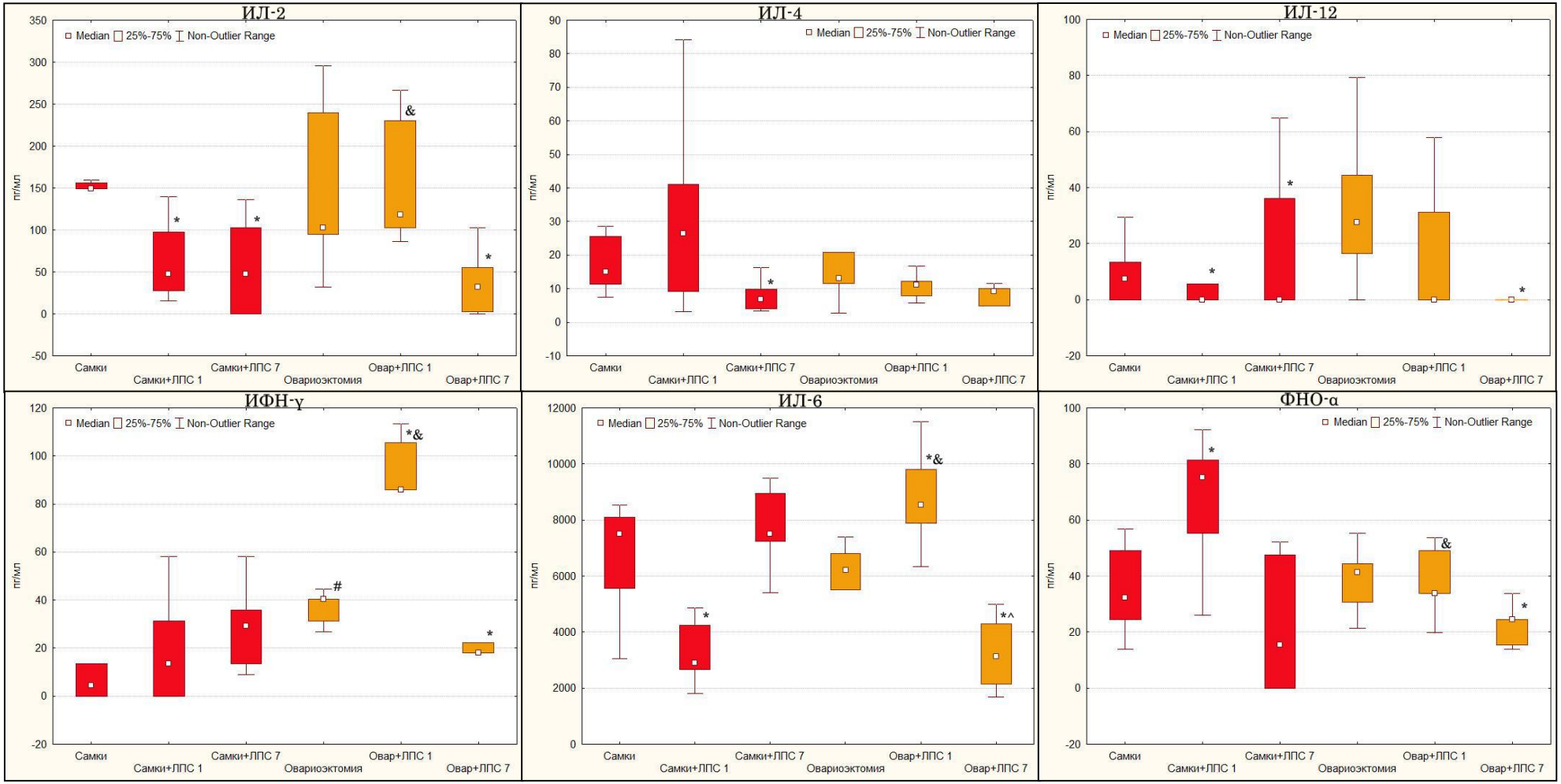


Рис. 7.2.16. Изменение содержания цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки в разные сроки развития СВО у крыс Вистар: некастрированные самки ( ) и в отдаленные сроки после овариэктомии ( ). Группы наблюдения: контрольная (Самки, Овариэктомия), 1-е (Самки+ЛПС1, Овар+ЛПС1) и 7-е сут (Самки+ЛПС7, Овар+ЛПС7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой, # - некастрированными самками; & - некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС; ^ - некастрированными самками на 7-е сут после введения ЛПС

Заключение

Таким образом, по сравнению с половозрелыми некастрированными самками у крыс Вистар развитие СВО в отдаленные сроки после овариэктомии характеризуется многократным повышением уровня эндотоксина. При СВО у кастрированных самок крыс Вистар по сравнению с некастрированными животными выявляется более выраженная воспалительная реакция в легких, характеризующаяся повышением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. На 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных крыс выявляется опустошение белой пульпы селезенки и акцидентальная инволюция тимуса I стадии с уменьшением объемной доли коркового вещества и расширением его субкапсулярной зоны. У кастрированных крыс, напротив, изменений объемной доли белой пульпы селезенки не выявляется, а в тимусе наблюдается акцидентальная инволюция II стадии, которая характеризуется картиной «звездного неба», сужением коркового вещества и его субкапсулярной зоны. По сравнению с некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС у овариэктомированных крыс Вистар наблюдается повышение уровня продукции провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, и ИФН-γ, и снижение – ФНО-α.

Оценка информативности статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение ЛПС некастрированным и кастрированным самкам крыс Вистар

Через сутки после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг количество статистически значимо изменяющихся показателей у некастрированных самок составило 23, а на 7-е сут развития СВО – 12; у кастрированных крыс в оба срока эксперимента количество изменяющихся показателей было 11. Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей было проведено вычисление информативности каждого признака по формуле Кульбака (табл. 7.2.9, табл. 7.2.10). В каждой группе были получены значения информативности и отобраны первые пять показателей, которые были максимальными (табл. 7.2.9). На 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самок выявлена максимальная значимость следующих параметров: содержания апоптотически гибнущих тимоцитов, концентрации эстрадиола и уровня активности АсАТ в сыворотке крови, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и содержания общего тестостерона в крови (табл. 7.2.9, рис. 7.2.17).

Через сутки после введения ЛПС кастрированным самкам максимально выраженными показателями информативности были – уровень эндотоксина в сыворотке крови, объемная доля светлых центров лимфоидных узелков селезенки, число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, уровень продукции ИФН-γ в культуре клеток селезенки и содержание тестостерона в сыворотке крови (табл. 7.2.9, рис. 7.2.17).

Таким образом, через сутки после введения ЛПС некастрированным самкам наиболее значимыми в механизмах развития СВО были – активация апоптотической гибели тимоцитов, а также изменения содержания эстрадиола. При введении ЛПС в отдаленные сроки после овариэктомии изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови имеет наибольшую патогенетическую значимость наряду с патологическими изменениями в легких, доминируя над гормональными и иммунологическими нарушениями, которые не являются определяющими в патогенезе СВО у кастрированных самок.

На 7-е сут после введения ЛПС у некастрированных самок максимальная диагностическая значимость была выявлена для следующих параметров: содержания прогестерона в сыворотке крови, объемной доли коркового вещества тимуса и ширины его субкапсулярной зоны, концентрации неоптерина в крови и объемной доли белой пульпы селезенки (табл. 7.2.10, рис. 7.2.17). На 7-е сут после введения ЛПС кастрированным самкам высоко информативными были показатели уровня продукции Тх1-цитокинов: ИЛ-12, ИЛ-2 и ИФН-γ клетками селезенки, а также содержание эстрадиола и кортикостерона в сыворотке крови (табл. 7.2.10, рис. 7.2.17).

Таким образом, на 7-е сут развития СВО у некастрированных самок наиболее значимыми в механизмах развития СВО были иммунологические нарушения – изменения структурно-функциональных зон тимуса и селезенки, а также содержания прогестерона и неоптерина в сыворотке крови. На 7-е сут после введения ЛПС в отдаленные сроки после овариэктомии изменение уровня продукции Тх1-цитокинов клетками селезенки имеет наибольшую патогенетическую значимость наряду с гормональными изменениями – эстрадиола и кортикостерона.

Таблица 7.2.9

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей через сутки после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг некастрированным самкам и в отдаленные сроки после овариэктомии крыс Вистар

Некастрированные самки			Кастрированные самки		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**
Апоптоз тимоцитов	**↑ в 3,2**	**1062**	**Эндотоксин**	**↑ в 631**	**260257**
Эстрадиол	**↓ в 1,6**	**141,9**	**%ГЦ**	**↑ в 3,5**	**220**
АсАТ	**↓ в 2,9**	**125**	**НФ в легких**	**↑ в 4,5**	**89,5**
НФ в легких	**↑ в 3,6**	**109**	**ИФН-γ**	**↑ в 2,4**	**66,7**
Тестостерон	**↑ в 5,8**	**85,4**	**Тестостерон**	**↑ в 9**	**61,1**
%ГЦ	↑ в 2,1	66,7	%КВ	↓ в 1,1	22,9
Кортикостерон	↑ в 1,7	66,6	TGF-β	↓ в 2	17,4
АлАТ	↓ в 3,7	64	Прогестерон	↑ в 2,3	10,03
НК	↑ в 4,5	61,5	ИЛ-6	↑ в 1,6	5,6
СКЗ	↑ в 1,3	35,2	Баллы печень	↑ в 2	5,1
TGF-β	↓ в 1,8	23,9	СКЗ	↓ в 1,2	2,9
ФНО-α	↑ в 2,5	18,2			
Неоптерин	↓ в 2	16,5			
ИЛ-6	↓ в 2,7	16,2			
%МЗ	↓ в 1,4	13,1			
%ПАЛМ	↓ в 1,4	11,1			
Баллы печень	↑ в 2	10,3			
%БП	↓ в 1,3	9,9			
ИЛ-2	↓ в 3	9,1			
%КВ	↑ в 1,2	7,5			
ИЛ-12	↓ в 13	5,4			

Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

Таблица 7.2.10

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 7-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг некастрированным самкам и в отдаленные сроки после овариэктомии крыс Вистар

Некастрированные самки			Кастрированные самки		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**
Прогестерон	**↑ в 2**	**66**	**ИЛ-12**	**↓ в 275**	**195**
СКЗ	**↑ в 1,2**	**49,9**	**Кортикостерон**	**↑ в 2,3**	**23,7**
%КВ	**↑ в 1,3**	**46,7**	**Эстрадиол**	**↓ в 2,8**	**21**
Неоптерин	**↓ в 2,3**	**43,2**	**ИФН-γ**	**↓ в 2,2**	**20,2**
%БП	**↓ в 1,4**	**37,5**	**ИЛ-2**	**↓ в 3,2**	**17**
НФ в легких	↑ в 1,7	27,6	Тестостерон	↑ в 3	11
Тестостерон	↓ в 2,4	22	Прогестерон	↑ в 2	8,6
ИЛ-4	↓ в 2	21,2	ФНО-α	↓ в 1,7	7,1
%ПАЛМ	↓ в 1,7	15,2	ИЛ-6	↓ в 2	5,1
%ГЦ	↓ в 1,4	12,1	%КВ	↓ в 1,1	2,1
%МЗ	↑ в 1,2	9,1	Баллы в печени	↑ в 1,3	1,1
ИЛ-12	↓ в 626	5,4			

Примечания: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

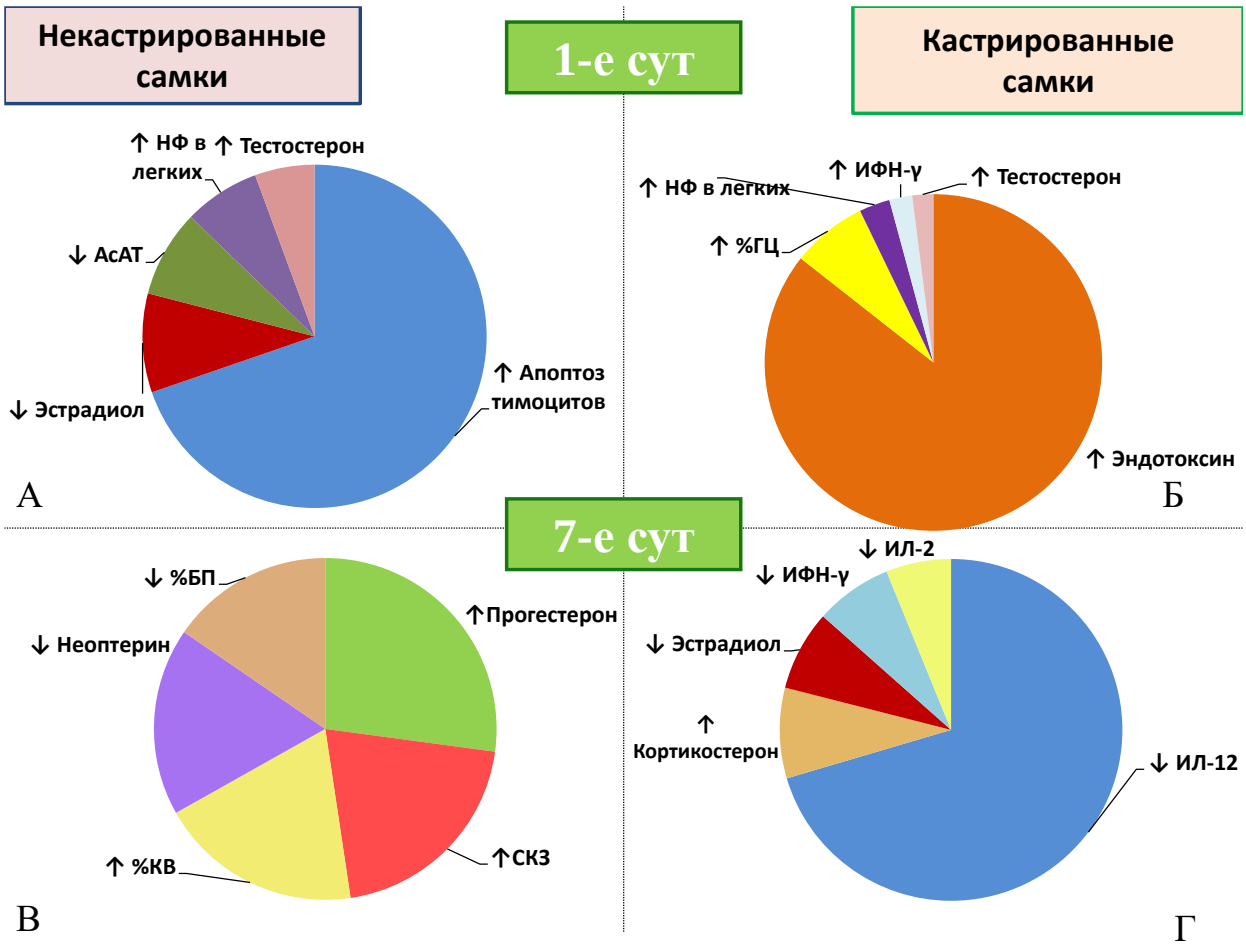


Рис. 7.2.17. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е (А, Б) и 7-е (В, Г) сутки после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг некастрированным самкам (А, В) и в отдаленные сроки после овариэктомии крыс Вистар (Б, Г)

7.3 Обсуждение

По данным клинических исследований по сравнению с мужчинами у женщин реже развивается острый сепсис (Martin G.S. et al., 2003; Adrie C. et al., 2007), что, по-видимому, связано с уровнем половых стероидов и полиморфизмом генов, сцепленных с Х-хромосомой, модулирующими развитие иммунного ответа (Klein S.L., Roberts C.W. 2010). Повышение уровня смертности от септических осложнений у лиц старше 50 лет исследователи связывают со снижением содержания эстрогенов и андрогенов в крови (Adrie C. et al., 2007). У женщин в этом возрасте наступает менопауза, сопровождающаяся изменением баланса половых гормонов (Hickey M. et al., 2010), что коррелирует с повышением числа септических осложнений и показателей смертности от инфекционно-воспалительных заболеваний по сравнению с женщинами репродуктивного возраста (Beery T.A., 2003). В эксперименте показано, что после овариэктомии – широко используемой модели посткастрационной менопаузы, увеличивается показатель смертности от сепсиса у мышей и крыс по сравнению с самками с физиологическим уровнем эстрогенов (Merkel S.M. et al., 2001; Tsuyuguchi K. et al., 2001). На моделях *in vitro* установлено влияние половых гормонов на продукцию активированными ЛПС моноцитами

крови провоспалительных цитокинов - ФНО-α, ИЛ-1β и ИЛ-6 (Moxley G. et al., 2004). В связи с тем, что данные литературы по этому вопросу фрагментарны, мы провели комплексную оценку морфологических и иммунологических изменений при СВО у самок Вистар в отдаленные сроки после кастрации.

По сравнению с некастрированными у кастрированных самок в сыворотке крови была снижена концентрация эстрадиола и тестостерона, тогда как содержание прогестерона статистически значимо не различалось. Хотя в результате хирургической кастрации содержание эстрадиола в сыворотке крови снижалось, однако его содержание оставалось детектируемым. Основным источником эстрадиола в репродуктивном периоде у самок являются яичники. После наступления менопаузы у женщин поддержание концентрации эстрадиола в крови обеспечивают, главным образом, клетки жировой ткани, которые продуцируют практически весь эстрадиол (Meseguer A. et al., 2002; Monteiro R. et al., 2014).

Как у некастрированных, так и у овариэктомированных самок на 1-е сут после введения ЛПС наблюдалось увеличение концентрации тестостерона в сыворотке крови, а на 7-е – его снижение. Содержание эстрадиола в сыворотке крови у некастрированных самок снижалось на 1-е сут развития СВО, а у кастрированных – только на 7-е. Подобная особенность была характерна и для изменения концентрации прогестерона: в сыворотке крови у некастрированных самок содержание прогестерона повышалось на 1-е сут после введения ЛПС, а у кастрированных – оставалась выше значений в контрольной группе как на 1-е, так и на 7-е сут эксперимента. Следует отметить, что концентрация женских половых стероидов в сыворотке крови у всех исследуемых групп кастрированных самок была ниже, чем у некастрированных.

В отдаленные сроки после хирургической кастрации в сыворотке крови у самок крыс Вистар содержание кортикостерона выше, чем у некастрированных крыс. J.V. Seale и соавт. (2004) показали снижение уровня кортикостерона и АКТГ у овариэктомированных самок крыс Спрейг-Доули. Так как авторы исследовали содержание глюкокортикоидов уже на 5-й день после кастрации, то, по-видимому, выявленные ими изменения отражают влияние не только посткастрационного синдрома, но и постоперационного стресса. Показано, что эстрадиол ингибирует экспрессию 11β-гидроксистероид дегидрогеназы I типа (11βHSD I) – фермента, инициирующего превращение неактивной формы кортикостерона – 11 дегидрокортизона в непосредственно кортикостерон (Andersson T. et al., 2010; Pereira C.D. et al., 2012; Chapman K.E. et al., 2013). Следовательно, овариэктомия и, как следствие, низкое содержание эстрадиола в сыворотке крови может привести к повышению концентрации кортикостерона. На 1-е сут после введения ЛПС содержание кортикостерона в сыворотке крови у некастрированных самок снижалось, а к 7-м сут эксперимента нормализовалось, тогда как у кастрированных самок повышение этого показателя наблюдалось только на 7-е сут. По данным литературы повышение

концентрации кортизола в сыворотке крови у больных сепсисом свидетельствует о неблагоприятном прогнозе течения заболевания (Boonen E. et al., 2013). Однако у таких больных выявлен низкий уровень синтеза кортизола надпочечниками (Annane D. et al., 2006). По мнению авторов, высокая концентрация кортизола в сыворотке крови больных сепсисом объясняется сниженным клиренсом его из крови и замедленным поступлением в печень, где затруднена инактивация кортизола поврежденными гепатоцитами, и как следствие, – его метаболизм (Boonen E. et al., 2013; Annane D., 2016).

По сравнению с некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС в отдаленные сроки после овариэктомии наблюдалась выраженная эндотокиснемия: у кастрированных самок с СВО уровень эндотоксина в сыворотке крови был в 100 раз выше, чем у некастрированных животных. Повышенный уровень эндотоксина объясняет высокие показатели смертности от системного воспалительного ответа и сепсиса овариэктомированных животных в работах ряда исследователей (Merkel S. et al., 2001; Tsuyuguchi K. et al., 2001).

При СВО у кастрированных самок крыс Вистар по сравнению с некастрированными животными выявляется более выраженная воспалительная реакция в легких, характеризующаяся повышением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Показано, что на моделях воспалительных заболеваний легких эстрадиол оказывает противовоспалительное действие, снижая выраженность воспалительной инфильтрации в легких (Speyer C.L. et al., 2005; Card J.W. et al., 2006). M. Frink и соавт. (2007) установлено, что эстрадиол оказывает супрессорное действие на экспрессию хемокина CXCL1, что, в свою очередь, приводит к подавлению миграции нейтрофилов в очаг воспаления, в частности, легкие.

Гистологическое исследование печени у овариэктомированных самок выявило более распространенную мелкокапельную дистрофию гепатоцитов по сравнению с крысами контрольной группы. По данным H. Dursun и соавт. (2010) в результате овариэктомии в печени у беспородных крыс снижается число гепатоцитов, наблюдается дилатация синусоидов, центральных и портальных вен, выявляется вакуольная дистрофия гепатоцитов, увеличивается гистиоцитарная инфильтрация, нарушается структура печеночных балок. По-видимому, более распространенные дистрофические изменения печени у овариэктомированных самок связаны со снижением уровня окисления липидов в печении и активацией липогенеза, что приводит к накоплению липидов в гепатоцитах (Paquette A, et al, 2008). Различий в выраженности альтеративных изменений в печени печени при СВО у овариэктомированных крыс Вистар и у некастрированных самок нами не выявлено. По данным T. Ishii и соавт. (2006) овариэктомия приводит к увеличению уровня мРНК в норме не синтезируемых в печени самок изоформ цитохрома P450 (2C11 и 3A2), что, по-видимому, активирует процессы детоксикации как эндогенных стероидов, так и ксенобиотиков, в частности ЛПС и эндотоксина, у кастрированных

самок с СВО. Однако показано, что у кастрированных самок с СВО как на 1-е, так и на 7-е сут после введения ЛПС уровень активности ферментов печени в сыворотке крови выше, чем у некастрированных животных, что свидетельствует о более выраженных нарушениях печени при СВО в отдаленные сроки после кастрации.

В результате кастрации у самок крыс Вистар наблюдается расширение коркового вещества тимуса и его субкапсулярной зоны. По данным литературы увеличение массы тимуса у самок в овариэктомии происходит за счет повышения количества всех субпопуляций тимоцитов (Hince M. et al., 2008), которые представлены в корковом веществе тимуса и его субкапсулярной зоне.

Динамика реактивных изменений тимуса в ответ на введение ЛПС у овариэктомированных самок и крыс с физиологическим уровнем половых гормонов была сходной. Однако более выраженные реактивные изменения тимуса наблюдались у кастрированных самок с СВО, которые проявлялись акцидентальной инволюцией II стадии, наличием картины «звездного неба» в корковом веществе и макрофагов, фагоцитирующих погибающие клетки. Более выраженная акцидентальная инволюция тимуса у кастрированных самок с СВО, по-видимому, связано с низкой концентрацией эстрадиола, который активирует пролиферацию, дифференцировку и миграцию тимоцитов, а также супрессирует апоптотическую гибель $CD4^+CD8^+$-лимфоцитов (Erlandsson M. C. et al., 2001).

По сравнению с некастрированными самками в селезенке у овариэктомированных крыс развитие СВО отличалась только реакцией герминативных центров лимфоидных узелков, характеризующейся их многократным расширением.

Исследование уровня продукции ряда цитокинов показало, что развитие СВО на фоне овариэктомии сопровождается нехарактерным для некастрированных крыс подавлением секреции Тх1-цитокина ИЛ-2, Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного ФНО-α, что свидетельствует о супрессии иммунного ответа. По сравнению с некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС у овариэктомированных крыс Вистар наблюдается повышение уровня продукции провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, и ИФН-γ, и снижение – ФНО-α. Согласно данным литературы, у женщин в постменопаузе и у грызунов после овариэктомии развитие сепсиса характеризуется повышением уровня провоспалительных цитокинов, в частности ФНО-α (Majetschak M. et al., 2000; Moxley G. et al., 2004), что, по мнению авторов, приводит к увеличению показателя смертности от септических осложнений. Однако, в нашей работе показано, что уровень продукции ФНО-α у кастрированных крыс с СВО не только не повышается, а наоборот снижается, поэтому определение уровня ФНО-α не всегда может быть использовано в качестве прогностического маркера тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний. Выявленное нами уменьшение содержания как ИЛ-2, так и ИЛ-4 у

овариэктомированных крыс в ответ на введение ЛПС, а также увеличение уровня продукции провоспалительного ИЛ-6 по сравнению с самками с физиологическим уровнем половых гормонов, отражает нарушение в системе продукции про- и противовоспалительных цитокинов. По-видимому, это является причиной высокой частоты встречаемости сепсиса и инфекционно-воспалительных заболеваний у женщин в пострепродуктивном возрасте (Beery T.A., 2003).

Таким образом, по сравнению с самками с физиологическим уровнем эстрадиола развитие СВО в отдаленные сроки после овариэктомии характеризуется более выраженной эндотоксинемией, воспалительными изменениями в легких, патологическими – в печени, более выраженной активацией иммунной системы, что проявлялось в более поздних стадиях акцидентальной инволюции тимуса и активации продукции провоспалительных цитокинов клетками селезенки.

Глава 8 МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС ВИСТАР В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОРХИЭКТОМИИ

8.1 Морфологические и иммунологические изменения у самцов крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

С целью создания модели гипоандрогенемии проводили хирургическую билатеральную орхиэктомию половозрелых крыс Вистар. Операцию осуществляли под эфирным наркозом. По данным литературы в отдаленные сроки после орхиэктомии – более 50 сут, развиваются устойчивые адаптивные морфологические изменения в передней доле гипофиза – увеличивается число и размеры гонадотрофных базофилов, в них появляются крупные вакуоли диаметром 200-400 нм (Алешин Б.В., 1971; Purves H., Griesbach W., 1957). В эти сроки после хирургической кастрации в сыворотке крови снижается концентрация тестостерона. При этом по механизму обратной связи снижение содержания тестостерона приводит к увеличению выработки гипоталамусом ЛГ-рилизинг гормона, который активирует секрецию лютеинизирующего гормона базофильными аденоцитами гипофиза (Caraty A., Locatelli A., 1988; Resko J.A. et al., 2000). В отдаленные сроки после орхиэктомии, когда наблюдается устойчивое состояние гипоандрогенемии моделировали СВО путем внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг кастрированным самцам крыс Вистар. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС.

Содержание стероидных гормонов в сыворотке крови в отдаленные сроки после орхиэктомии

По сравнению с контрольной группой в отдаленные сроки после орхиэктомии наблюдалось снижение концентрации свободного и общего тестостерона (табл. 8.1.1). На 52-е сут после кастрации у самцов крыс Вистар концентрация эстрадиола, прогестерона и кортикостерона статистически значимо не отличалась от показателей контрольной группы (табл. 8.1.1).

Таким образом, через 52 сут после хирургической кастрации развивается устойчивое состояние гипоандрогенемии.

Таблица 8.1.1

Содержание половых стероидных гормонов и кортикостерона в сыворотке крови у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии (Me; 25-75%)

Содержание гормонов	Контрольная группа	Отдаленные сроки после орхиэктомии	Статистическая значимость различий (p)
Тестостерон общий, нг/мл	3,39 (2,65-4,13)	0 (0-0,013)	0,0001
Тестостерон свободный, пг/мл	2,40 (2,12-3,42)	0 (0-0,17)	0,0001
Эстрадиол, пг/мл	67,38 (59,08-76,59)	63,87 (59,82-96,68)	0,806
Прогестерон, нг/мл	12,68 (7,63-13,74)	13,72 (12,27-14,01)	1,00
Кортикостерон, нг/мл	35,91 (19,01-59,01)	41,63 (38,02-54,76)	0,513

Морфологическая характеристика легких у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

При микроскопическом исследовании морфологических различий легких у крыс контрольной и опытной групп не выявлено (рис. 8.1.1). Просветы альвеол воздушные, широкие, межальвеолярные перегородки тонкие. В стенках межальвеолярных перегородок макрофаги, единичные в поле зрения при ув. 400 нейтрофилы. Эпителий бронхов кубический, базальная пластинка тонкая, в просвете бронхов и бронхиол единичные клетки десквамированного эпителия.

По данным морфометрического исследования в легких у крыс после орхиэктомии наблюдалось статистически значимое увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (табл. 8.1.2).

Таким образом, в отдаленные сроки после орхиэктомии морфологических изменений в легких не выявлено, за исключением небольшого повышения числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках.

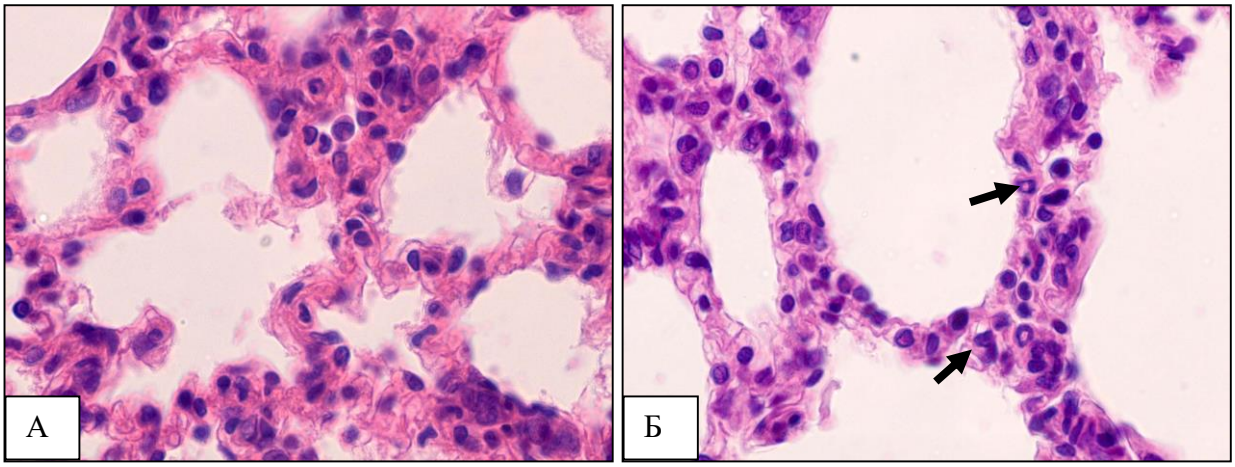


Рис. 8.1.1. Морфологическая характеристика легких крыс Вистар контрольной группы (А) и на 52-е сут после орхиэктомии (Б). Просветы альвеол воздушные, широкие, межальвеолярные перегородки тонкие. В стенках межальвеолярных перегородок единичные нейтрофилы (указаны стрелками). Ув. 1000

Показатели уровня активности АлАТ и АсАТ и эндотоксина в сыворотке крови у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

Показатели активности АсАТ в сыворотке крови у кастрированных крыс колебались в пределах нормы, но были статистически значимо выше, чем у животных контрольной группы (табл. 8.1.2). Показатели активности АлАТ у крыс контрольной группы и в отдаленные сроки после орхиэктомии статистически значимо не различались.

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у крыс контрольной группы был низким и колебался от 0,012 до 1,9 мЕ/мл. На 52-е сут после хирургической кастрации уровень эндотоксина в сыворотке крови у крыс Вистар не отличался от таковых у животных контрольной группы (табл. 8.1.2).

Таблица 8.1.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, уровень эндотоксина и активность АлАТ и АсАТ в сыворотке крови у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии (M±m; Me; 25-75%)

		Контрольная группа	Отдаленные сроки после орхиэктомии	Статистическая значимость различий (p)
Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких		1,06±0,17	2,29±0,33	0,047
Содержание эндотоксина, мЕ/мл		0,66±0,17	0,80±0,20	0,173
Уровень активности ферментов печени, Е/л	**АсАТ**	116 (113-116)	134 (126-136)	0,0163
	АлАТ	93 (88-94)	81 (75-85)	0,174

Морфологическая характеристика тимуса у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

В тимусе при морфологическом исследовании у самцов контрольной группы преобладало корковое вещество, и оно было представлено равномерно распределенными лимфоидными и эпителиальными ретикулярными клетками. Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 8.1.2А). Субкапсулярная зона тимуса была представлена 2-6 рядами лимфобластов (рис. 8.1.2В). При ув. 400 в поле зрения среди лимфобластов субкапсулярной зоны тимуса у животных контрольной группы выявлялись единичные митозы. В мозговом веществе тимуса обнаружены тимические тельца I–II фаз развития, состоящие из 4–5 эпителиальных ретикулярных клеток.

На качественном уровне в тимусе у самцов на 52-е сут после орхиэктомии также, как и у крыс контрольной группы, преобладало корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом четкие (рис. 8.1.2Б). В корковом веществе тимуса у всех животных этой группы обнаруживалась картина «звездного неба» – макрофаги, фагоцитирующие погибающие лимфоциты. Субкапсулярная зона тимуса у орхиэктомированных самцов была широкой и состояла из 4-10 рядов лимфобластов, среди которых выявлялись единичные митозы (рис. 8.1.2Г). В мозговом веществе тимуса определялись тимические тельца I-III фаз развития.

При морфометрическом исследовании в тимусе по сравнению с контрольной группой у кастрированных самцов выявлялись реактивные изменения, характеризующиеся расширением субкапсулярной зоны. Объемная доля коркового вещества тимуса статистически значимо не изменялась (табл. 8.1.3).

Таблица 8.1.3

Морфометрическая характеристика тимуса у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии (M±m)

Морфометрические показатели тимуса	Контрольная группа	Отдаленные сроки после орхиэктомии	Статистическая значимость различий (p)
Объемная доля КВ, %	54,98±1,01	56,38±2,16	0,627
Объемная доля МВ, %	45,02±1,20	43,62±2,16	0,627
Индекс отношения объемной доли КВ к МВ, усл. ед.	1,27±0,06	1,51±0,13	0,627
Ширина СКЗ, мкм	25,28±1,32	62,55±4,29	0,013

Условные обозначения: КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество, СКЗ – субкапсулярная зона

Таким образом, в отдаленные сроки после орхиэктомии в тимусе выявлены реактивные изменения – расширение субкапсулярной зоны тимуса.

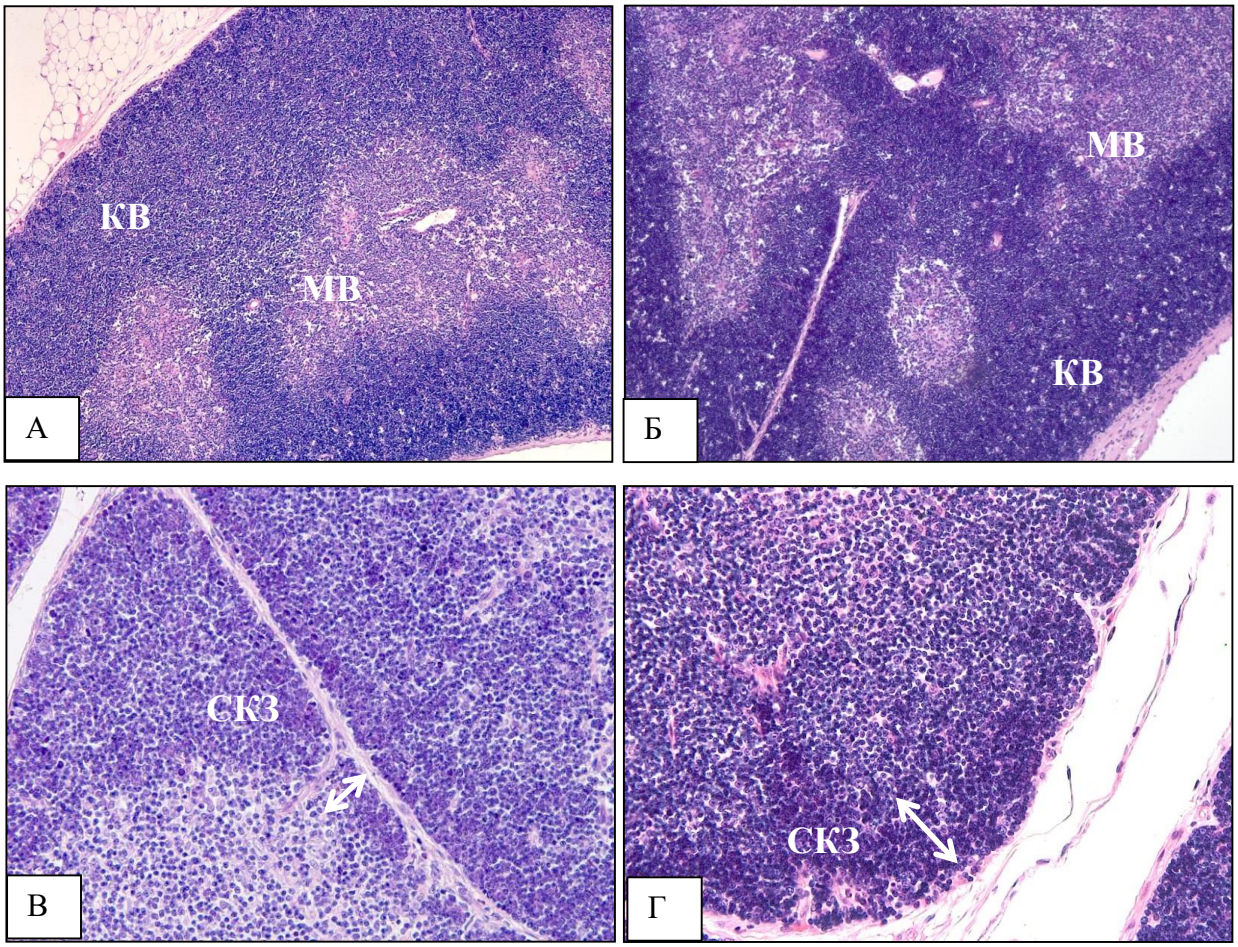


Рис. 8.1.2. Морфологические изменения в тимусе у крыс Вистар контрольной группы (А, В) и на 52-е сут после орхиэктомии (Б, Г). *Контрольная группа:* А – границы между корковым и мозговым веществом четкие; корковое вещество тимуса представлено преимущественно лимфоидными клетками; В – субкапсулярная зона тимуса у крыс контрольной группы представлена 2-6 рядами лимфобластов. *На 52-е сут после орхиэктомии*: Б – картина «звездного неба» в корковом веществе; Г – субкапсулярная зона широкая и представлена 4-10 рядами лимфобластов. КВ – корковое вещество; МВ – мозговое вещество; СКЗ – субкапсулярная зона. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А, В – 80; Б, Г – 320

Морфологическая характеристика селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

При морфологическом исследовании в селезенке у самцов контрольной группы ПАЛМ-зона выражена, лимфоидные узелки с узкими герминативными центрами (рис. 8.1.3А), в них среди лимфобластов выявлялись единичные митозы. В группе животных в отдаленные сроки после орхиэктомии в селезенке преобладала красная пульпа, а белая пульпа была представлена невыраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с широкими герминативными центрами (рис. 8.1.3Б).

При морфометрическом исследовании гистологических препаратов селезенки у крыс в отдаленные сроки после орхиэктомии наблюдалось снижение показателя объемной доли белой пульпы за счет уменьшения ПАЛМ-зоны (табл. 8.1.4). В лимфоидных узелках селезенки в отдаленные сроки после кастрации было выявлено сужение маргинальной зоны и расширение герминативных центров лимфоидных узелков по сравнению с контрольной группой (табл. 8.1.4).

Таким образом, в отдаленные сроки после орхиэктомии наблюдается опустошение белой пульпы селезенки за счет снижения объемной доли ПАЛМ-зоны, а также расширение герминативных центров лимфоидных узелков и сужение их маргинальной зоны.

Таблица 8.1.4

Морфометрическая характеристика селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии (M±m)

Морфометрические показатели селезенки		**Контрольная группа**	**Отдаленные сроки после орхиэктомии**	**Статистическая значимость различий (p)**
Объемная доля, %	**ПАЛМ**	27,42±1,65	17,44±1,70	0,0005
	ЛУз	14,82±1,61	16,47±1,83	0,566
	Белая пульпа	42,24±1,58	33,91±1,65	0,0004
	Маргинальная зона ЛУз	44,70±1,92	27,32±2,91	0,0003
	Герминативные центры ЛУз	22,18±1,93	26,83±0,98	0,009

Условные обозначения: ПАЛМ – периартериолярные лимфоидные муфты, ЛУз – лимфоидные узелки

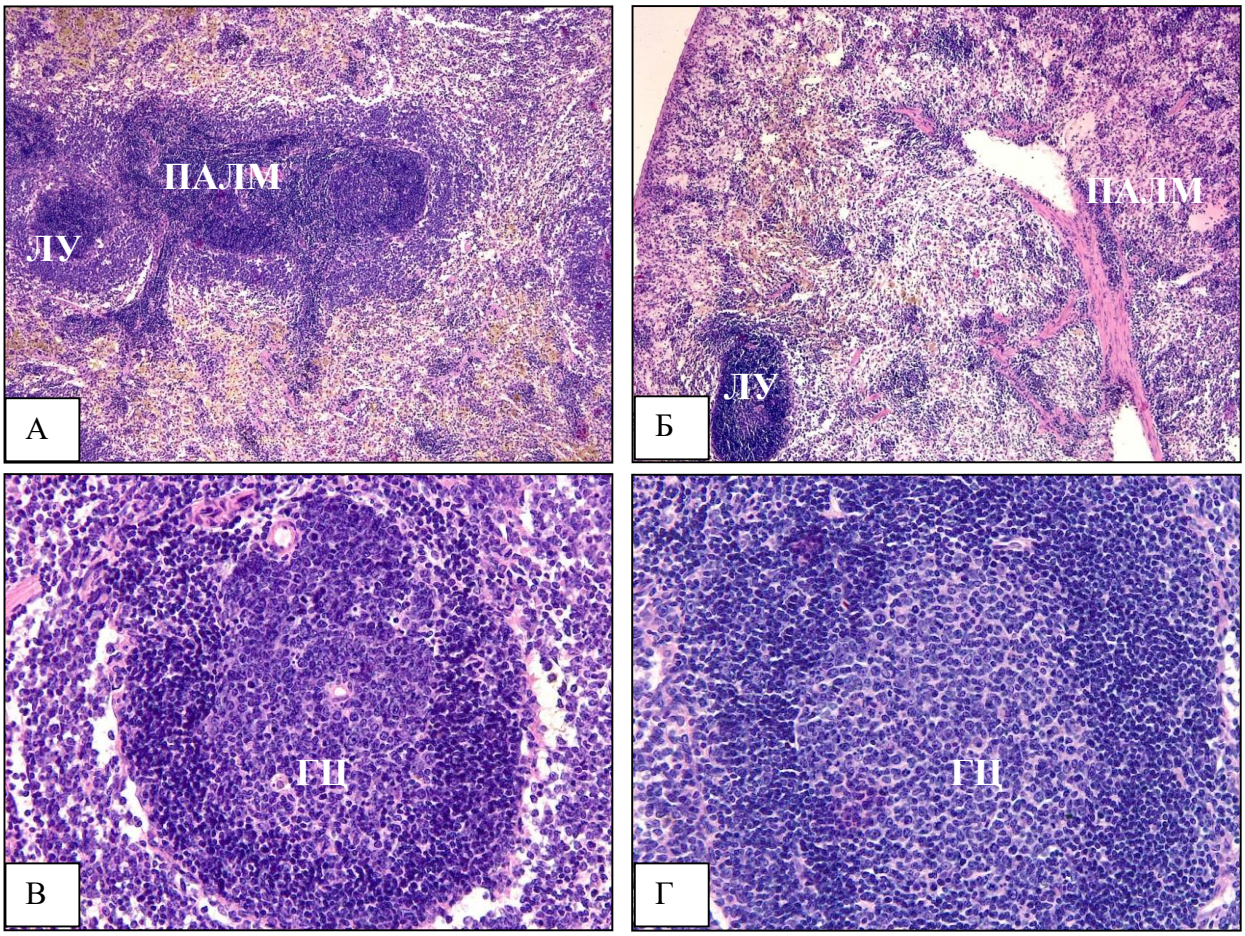


Рис. 8.1.3**.** Морфологические изменения селезенки у крыс Вистар контрольной группы (А, В) и на 52-е сут после орхиэктомии (Б, Г). *Контрольная группа*: А, В – белая пульпа представлена выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с герминативными центрами и хорошо выраженной маргинальной зоной. *На 52-е сут после орхиэктомии*: Б, Г – невыраженная ПАЛМ-зона, лимфоидные узелки небольших размеров, их герминативные центры широкие, в них рыхло расположенные лимфобласты, маргинальная зона не выражена. ЛУ – лимфоидные узелки; ПАЛМ – периартериолярные муфты. ГЦ – герминативный центр лимфоидного узелка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А, Б – 80, В, Г – 320

Содержание цитокинов в культуральной жидкости активированных КонА клеток селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

В отдаленные сроки после орхиэктомии в сыворотке крови у крыс Вистар содержание TGF-β было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе (табл. 8.1.5). Содержание неоптерина в сыворотке крови у кастрированных самцов крыс Вистар по сравнению с контрольной группой не изменялось.

Анализ цитокинового профиля показал, что в отдаленные сроки после орхиэктомии наблюдается повышение уровня продукции провоспалительного ИЛ-6 и опосредующего развитие иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу – ИЛ-12 (табл. 8.1.5).

Таблица 8.1.5

Концентрация неоптерина и TGF-β в сыворотке крови и содержание цитокинов в культуральной жидкости активированных КонА клеток селезенки у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии (Me; 25-75%)

Среда	Цитокин	Контрольная группа	Отдаленные сроки после орхиэктомии	Статистическая значимость различий (p)
Сыворотка крови	**Неоптерин, нмоль/л**	0,84 (0,15 – 1,26)	1,02 (0,7 – 1,18)	0,917
	TGF-β, нг/мл	50,8 (43,0-64,0)	33,2 (1,3-41,0)	0,02
Культура клеток селезенки	**ИЛ-2, пг/мл**	127,89 (47,25 - 386,69)	86,63 (29,54 – 235,90)	0,464
	ИЛ-12, пг/мл	38,42 (22,94 – 55,36)	51,73 (40,87 – 129,08)	0,049
	ИФН-γ, пг/мл	44,71 (39,12 – 59,25)	53,66 (51,42 – 63,70)	0,403
	ФНО-α, пг/мл	37,66 (33,62 – 42,76)	49,07 (28,75 – 62,10)	0,689
	ИЛ-6, пг/мл	547,60 (432,30 – 836,25)	1126,20 (892,90 – 1244,20)	0,0057

Заключение

Таким образом, в отдаленные сроки после орхиэктомии у самцов крыс Вистар развивается устойчивое состояние гипоандрогенемии, характеризующееся резким снижением в сыворотке крови содержания общего и свободного тестостерона. Концентрация эстрадиола, прогестерона и кортикостерона в сыворотке крови в эти сроки не изменяется (табл. 8.1.6).

Морфофункциональные изменения легких в отдаленные сроки после орхиэктомии характеризуются увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. В сыворотке крови наблюдается повышение в пределах нормальных значений показателя активности АсАТ в сыворотке крови (табл. 8.1.6).

В отдаленные сроки после хирургической кастрации у самцов крыс Вистар выявлены реактивные морфофункциональные изменения органов иммунной системы: расширение субкапсулярной зоны в тимусе; снижение объемной доли ПАЛМ-зоны и маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки на фоне увеличения размеров их герминативных центров; повышение уровня продукции ИЛ-12 и ИЛ-6. По сравнению с контрольной группой уровень эндотоксина в отдаленные сроки после орхиэктомии не изменяется (табл. 8.1.6).

Таблица 8.1.6

Сравнительная характеристика морфофункционального состояния органов иммунной системы, легких, содержания половых стероидных гормонов, активность АсАТ в сыворотке крови и уровня продукции цитокинов у крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

Параметры	Показатели у кастрированных крыс Вистар по сравнению с самцами контрольной группы
Уровень гормонов и эндотоксина	
Тестостерон общий	Ниже
Тестостерон свободный	Ниже
АсАТ	Выше
Морфофункциональное состояние тимуса	
Ширина субкапсулярной зоны	Выше
Морфофункциональное состояние селезенки	
Объемная плотность ПАЛМ-зоны	Ниже
Объемная доля маргинальной зоны лимфоидных узелков	Ниже
Уровень продукции цитокинов	
ИЛ-6	Выше
ИЛ-12	Выше
TGF-β	Ниже
Морфофункциональное состояние легких	
Число НФ в межальвеолярных перегородках	Выше

8.2 Морфологические изменения и иммунологические нарушения при системном воспалительном ответе у половозрелых крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии

Проведено исследование морфологических изменений и иммунологических нарушений при СВО у крыс Вистар через 52 дня после хирургической кастрации. СВО моделировали внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 1,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Показатель гибели животных составил 10% (3 крысы из 30), а в группе сравнения – 40% (4 крысы из 10).

Сравнительная характеристика содержания половых гормонов в сыворотке крови у кастрированных и некастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови у кастрированных самцов наблюдалось увеличение содержания общего и свободного тестостерона, тогда как у некастрированных крыс эти показатели, наоборот, снижались (табл. 8.2.1, рис. 8.2.1). На 1-е сут развития СВО у орхиэктомированных крыс концентрация прогестерона была статистически значимо выше, чем в контрольной группе, тогда как у некастрированных самцов в эти сроки содержание этого полового гормона не изменялось по сравнению с соответствующей контрольной группой (табл. 8.2.1, рис. 8.2.1). Содержание эстрадиола как у крыс без орхиэктомии, так и в отдаленные сроки после орхиэктомии в ответ на введение ЛПС через сутки статистически значимо не изменялось (табл. 8.2.1, рис. 8.2.1).

На 7-е сут после введения ЛПС концентрация общего и свободного тестостерона, и прогестерона в сыворотке крови у кастрированных крыс нормализовалась (табл. 8.2.1, рис. 8.2.1). Содержание эстрадиола у кастрированных самцов на 7-е сут СВО не отличалось от значений в соответствующей контрольной группе, тогда как у животных без орхиэктомии концентрация эстрадиола увеличивалась по сравнению с контрольной группой и 1-ми сут эксперимента (табл. 8.2.1, рис. 8.2.1).

Таблица 8.2.1

Содержание стероидных половых гормонов в сыворотке крови у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Тестостерон общий, нг/мл	Тестостерон свободный, пг/мл	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл
Без орхиэктомии	**Контрольная**	3,39 (2,65-4,13)[1*]	2,40 (2,12-3,42)[1]	67,38 (59,08-76,59)[1]	12,68 (7,63-13,74)[1]
	ЛПС 1-е сут	0,06 (0,042-0,078)[2]	1,07 (0,61-1,21)[2]	77,88 (72,72-78,25)[2]	6,12 (5,29-9,06)[2]
	ЛПС 7-е сут	0,51 (0,19-0,79)[3]	2,19 (2,00-2,57)[3]	86,91 (82,68-92,44)[3]	7,94 (3,16-15,29)[3]
Отдаленные сроки после орхиэктомии	**Контрольная**	0 (0-0,013)[4]	0 (0-0,17)[4]	63,87 (59,82-96,68)[4]	13,72 (12,27-14,01)[4]
	ЛПС 1-е сут	0,04 (0,02-0,08)[5]	0,27 (0,13-0,68)[5]	106,23 (94,66-121,78)[5]	21,99 (13,09-32,93)[5]
	ЛПС 7-е сут	0,01 (0,004-0,05)[6]	0,12 (0,09-0,25)[6]	62,40 (53,18-64,61)[6]	17,76 (12,47-18,12)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}00002^{1\text{-}2}$ $0{,}0068^{1\text{-}3}$ $0{,}00002^{2\text{-}3}$ $0{,}0115^{4\text{-}5}$ $0{,}5734^{4\text{-}6}$ $0{,}4685^{5\text{-}6}$ $0{,}00001^{1\text{-}4}$ $0{,}27751^{2\text{-}5}$ $0{,}00001^{3\text{-}6}$	$0{,}0001^{1\text{-}2}$ $0{,}5288^{1\text{-}3}$ $0{,}0010^{2\text{-}3}$ $0{,}0021^{4\text{-}5}$ $0{,}2867^{4\text{-}6}$ $0{,}1119^{5\text{-}6}$ $0{,}00001^{1\text{-}4}$ $0{,}0101^{2\text{-}5}$ $0{,}00002^{3\text{-}6}$	$0{,}4127^{1\text{-}2}$ $0{,}0286^{1\text{-}3}$ $0{,}1905^{2\text{-}3}$ $0{,}2857^{4\text{-}5}$ $0{,}4206^{4\text{-}6}$ $0{,}0159^{5\text{-}6}$ $0{,}9048^{1\text{-}4}$ $0{,}0635^{2\text{-}5}$ $0{,}0159^{3\text{-}6}$	$0{,}6216^{1\text{-}2}$ $0{,}9433^{1\text{-}3}$ $0{,}9168^{2\text{-}3}$ $0{,}0061^{4\text{-}5}$ $0{,}0303^{4\text{-}6}$ $0{,}9048^{5\text{-}6}$ $0{,}6943^{1\text{-}4}$ $0{,}0635^{2\text{-}5}$ $0{,}3095^{3\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

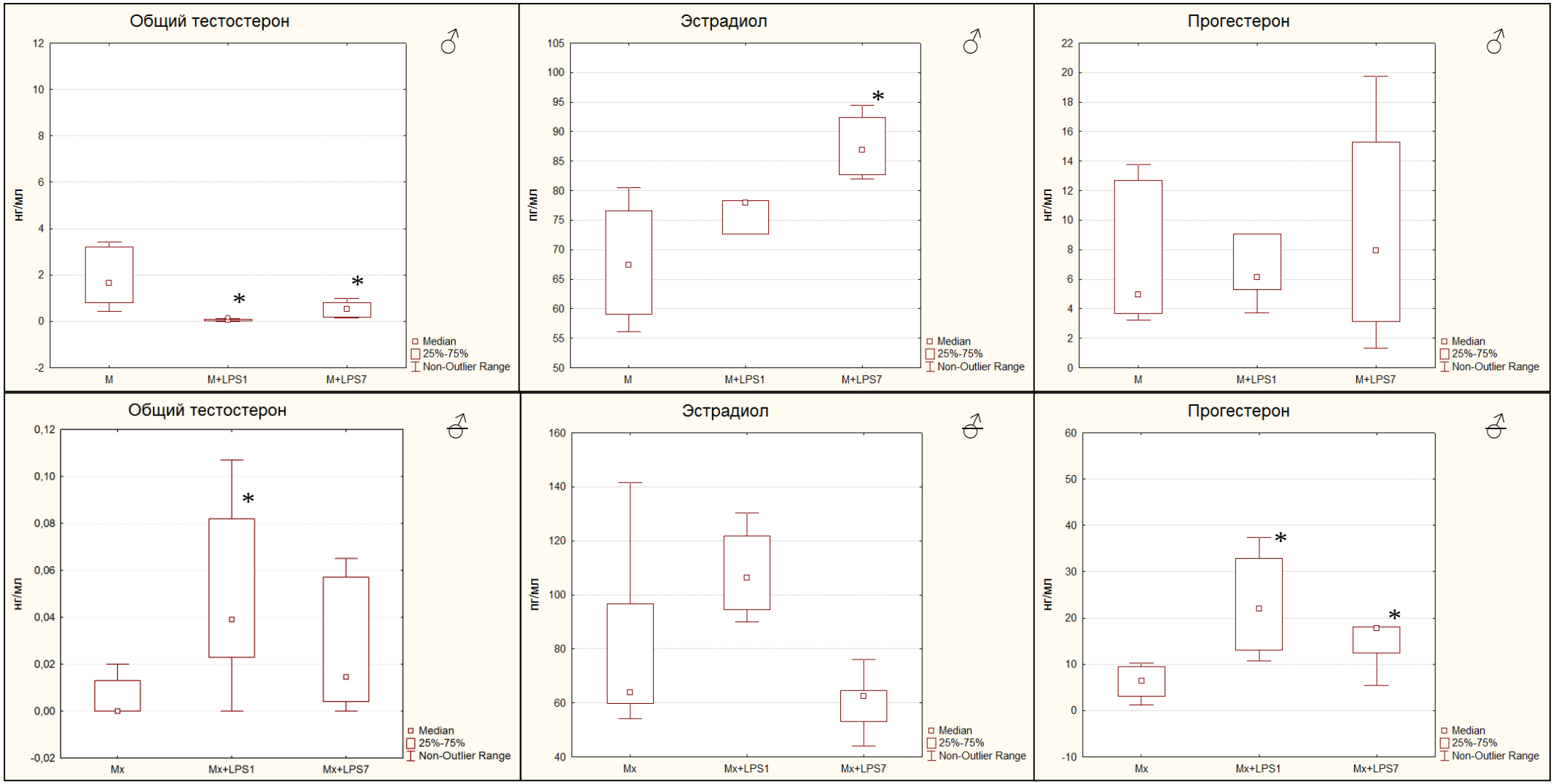


Рис.8.2.1. Изменение содержания общего тестостерона, эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови у некастрированных самцов (верхний ряд) и в отдаленные сроки после орхиэктомии (нижний ряд) контрольной группы (M, Mx), на 1-е (M+LPS1, Mx+LPS1), и 7-е (M+LPS7, Mx+LPS7) сут после введения ЛПС. ♂ - некастрированные самцы, ⚲ - кастрированные самцы

Сравнительная характеристика морфологических изменений легких у кастрированных и некастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут СВО в легких у орхиэктомированных самцов в просветах бронхов выявлялось зернистое эозинофильное содержимое, частично заполняющее просвет, эпителий был очагово десквамирован. Межальвеолярные перегородки очагово утолщены, в них большое количество нейтрофилов (10-15 в поле зрения при ув. 400). Зоны с дистелектазами чередовались с зонами острой обструктивной эмфиземы. Периваскулярные лимфатические щели расширены. Отдельные альвеолы у 4 крыс из 10 были заполнены отечной жидкостью (рис. 8.2.2).

При морфологическом исследовании легких кастрированных крыс на 7-е сут после введения ЛПС просветы отдельных бронхов заполнены эозинофильными массами, в которых выявлялся десквамированный эпителий и нейтрофилы. Межальвеолярные перегородки диффузно очагово утолщены, в них умеренное число нейтрофилов. Отмечалось чередование очагов эмфиземы и дистелектазов. Периваскулярные лимфатические щели были расширены.

На 1-е сут после введения ЛПС у кастрированных самцов показатель числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких был достоверно выше, чем в группе сравнения (табл. 8.2.2, рис. 8.2.3). На 7-е сут после введения ЛПС в обеих группах наблюдалось снижение числа нейтрофилов, а показатели не отличались от контрольных групп (рис. 8.2.4).

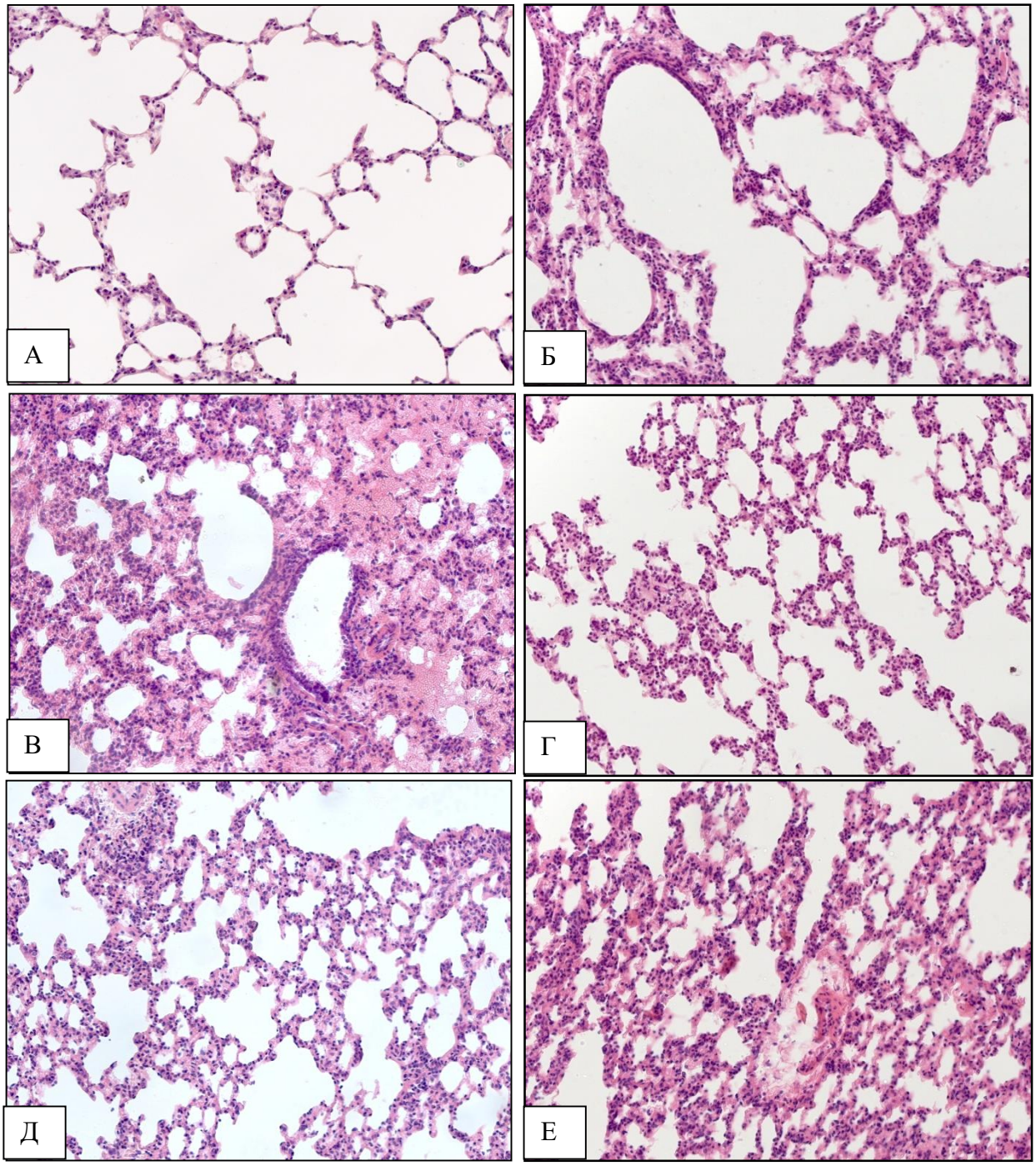


Рис. 8.2.2. Морфологические изменения легких у некастрированных самцов (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (Б, Г, Е) контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сутки (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа:* А, Б – тонкие межальвеолярные перегородки. Просветы альвеол и альвеолярных ходов равномерно воздушные. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (В) – в просветах альвеол гомогенное эозинофильное содержимое и эритроциты; в межальвеолярных перегородках очаговая воспалительная инфильтрация; *орхиэктомированные самцы* (Г) – в просветах некоторых альвеол и альвеолярных ходов гомогенное эозинофильное содержимое. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (Д) – межальвеолярные перегородки утолщены, в межальвеолярных перегородках воспалительная инфильтрация; *орхиэктомированные самцы* (Е) – неравномерное полнокровие кровеносных сосудов, межальвеолярные перегородки утолщены. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

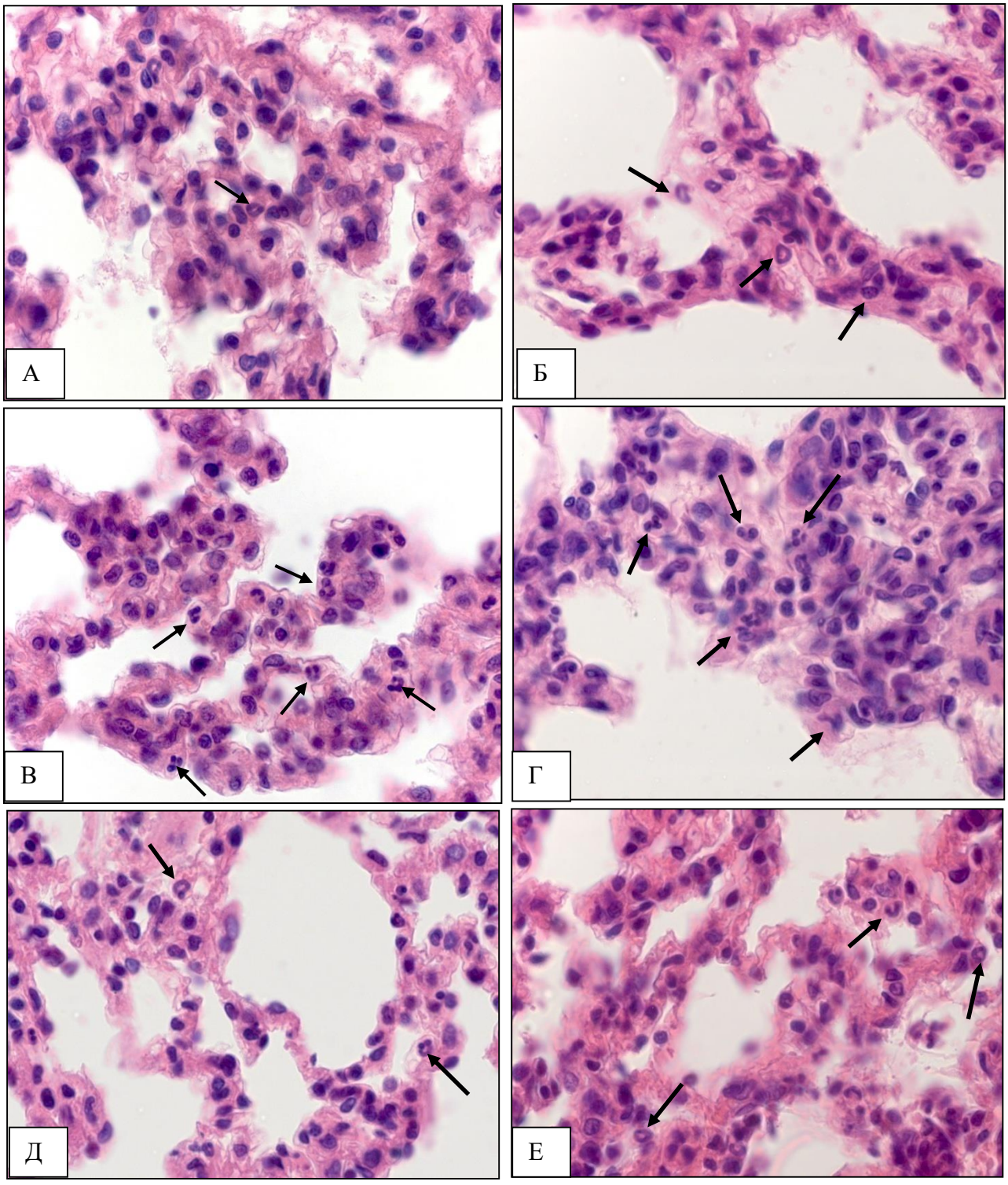


Рис 8.2.3. Морфологические изменения легких у некастрированных самцов (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (Б, Г, Е) контрольной группы (А, Б), на 1-е (В, Г) и 7-е сутки (Д, Е) после введения ЛПС. *Контрольная группа*: А, Б – единичные нейтрофилы в межальвеолярных перегородках легких. *Через сутки после введения ЛПС*: (В, Г) – увеличение количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. *На 7-е сут после введения ЛПС:* (Д, Е) – снижение числа нейтрофилов по сравнению с группой крыс, на 1-е сут после введения ЛПС. Стрелки указывают на нейтрофилы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: 1000

Таблица 8.2.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и альтеративные изменения в печени у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Легкие	Печень
		Число нейтрофилов, на ед. площади 25 тыс. мкм^2	Показатель дистрофических и некротических изменений в печени, баллы
Без орхиэктомии	Контрольная	1,43 (1,43-2,00)^{1*}	1,00 (0,50-1,00)^{1}
	ЛПС 1-е сут	10,29 (8,14-13,86)^{2}	2,00 (2,00-2,00)^{2}
	ЛПС 7-е сут	3,43 (3,14-4,29)^{3}	1,00 (0,00-2,00)^{3}
Отдаленные сроки после орхиэктомии	Контрольная	2,57 (1,57-2,86)^{4}	0,25 (0,00-1,00)^{4}
	ЛПС 1-е сут	24,71 (13,71-34,71)^{5}	4,00 (4,00-4,00)^{5}
	ЛПС 7-е сут	2,07 (1,29-2,43)^{6}	2,00 (1,00-3,00)^{6}
Статистическая значимость различий (p)		0,0027$^{1-2}$ 0,0027$^{1-3}$ 0,0003$^{2-3}$ 0,0025$^{4-5}$ 0,5941$^{4-6}$ 0,0001$^{5-6}$ 0,1508$^{1-4}$ 0,0079$^{2-5}$ 0,0007$^{3-6}$	0,0079$^{1-2}$ 0,7972$^{1-3}$ 0,0599$^{2-3}$ 0,0029$^{4-5}$ 0,0232$^{4-6}$ 0,2474$^{5-6}$ 0,5135$^{1-4}$ 0,0079$^{2-5}$ 0,0947$^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

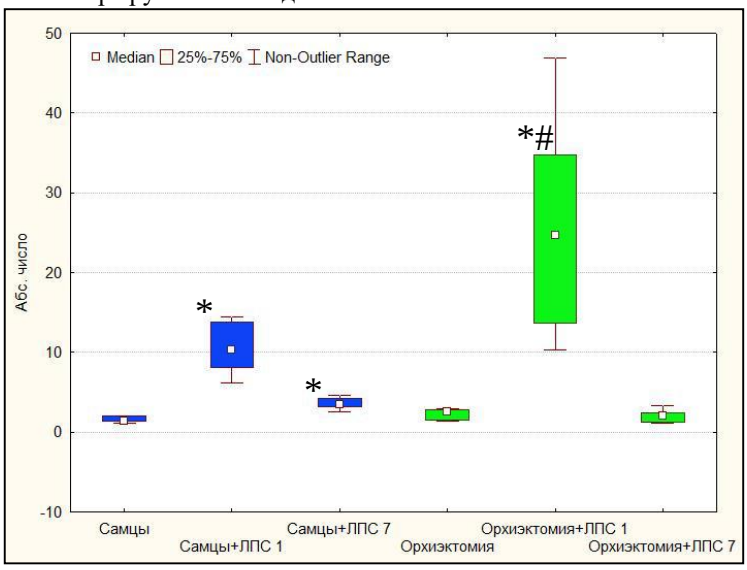


Рис. 8.2.4. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у некастрированных самцов крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Орхиэктомия), на 1-е (Самцы+ЛПС 1, Орхиэктомия+ЛПС 1) и 7-е сут (Самцы+ЛПС 7, Орхиэктомия+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой, # - некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений печени у кастрированных и некастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сутки после введения ЛПС в отдаленные сроки после орхиэктомии у 6 животных из 10 в печени наблюдались ландшафтообразные некрозы (рис. 8.2.6А), у остальных крыс – средне- и мелкокапельная дистрофия гепатоцитов, более выраженная в периферических отделах дольки (рис. 8.2.5Г). В эти сроки развития СВО у некастрированных самцов дистрофические изменения гепатоцитов были менее выражены (рис. 8.2.5В), некрозы встречались реже (у 1 крысы из 7). В печени некастрированных и кастрированных самцов через сутки после введения ЛПС число неэпителиальных клеточных элементов, в том числе нейтрофилов, по ходу балок было увеличено. По ходу триад была слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, выявляются стазы и сладжи.

На 7-е сутки после введения ЛПС у некастрированных самцов наблюдалась тенденция к восстановлению нормальной структуры печени, выраженность дистрофических изменений снижалась (рис. 8.2.5Д, Е, рис. 8.2.6В, Г). Вакуольная дистрофия была слабо выражена. Гепатоциты с дистрофическими изменениями локализовались преимущественно в периферических отделах долек.

При СВО, вызванном ЛПС в отдаленные сроки после орхиэктомии, по сравнению с некастрированными самцами, дистрофические изменения в печени были более выраженными. На 1-е сут развития СВО у крыс в отдаленные сроки после орхиэктомии показатель дистрофических и некротических изменений в печени был статистически значимо выше (табл. 8.2.2, рис. 8.2.7). На 7-е сут значимых различий по исследуемому показателю между опытными группами крыс выявлено не было (табл. 8.2.2, рис. 8.2.7).

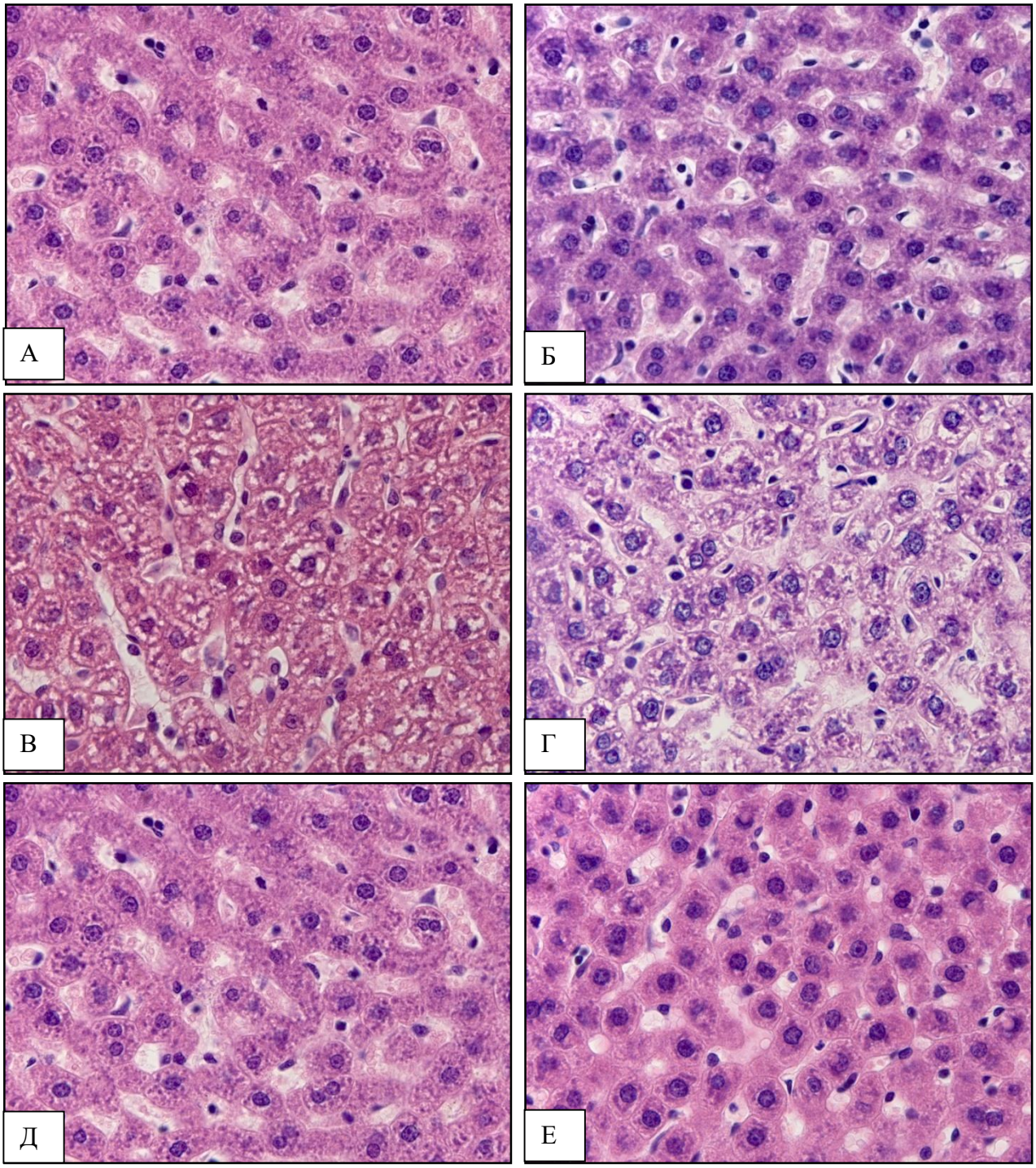


Рис. 8.2.5. Морфологические изменения печени у некастрированных самцов (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Б, Г, Е) крыс Вистар контрольной группы (А, Б) и на 1-е (В, Г) и 7-е (Д, Е) сутки после введения ЛПС. *Контрольная группа (А, Б):* в цитоплазме гепатоцитов базофильная зернистость, дистрофических изменений нет. *На 1-е сут после введения ЛПС*: *некастрированные самцы* (В) – выраженная мелко- и средневакуольная дистрофия гепатоцитов; *орхиэктомированные самцы* (Г) – выраженная дистрофия гепатоцитов. *На 7-е сут после введения ЛПС*: *некастрированные самцы* (Д) – дистрофические изменения гепатоцитов минимально выражены; *орхиэктомированные самцы* (Е) – дистрофических изменений нет. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 640

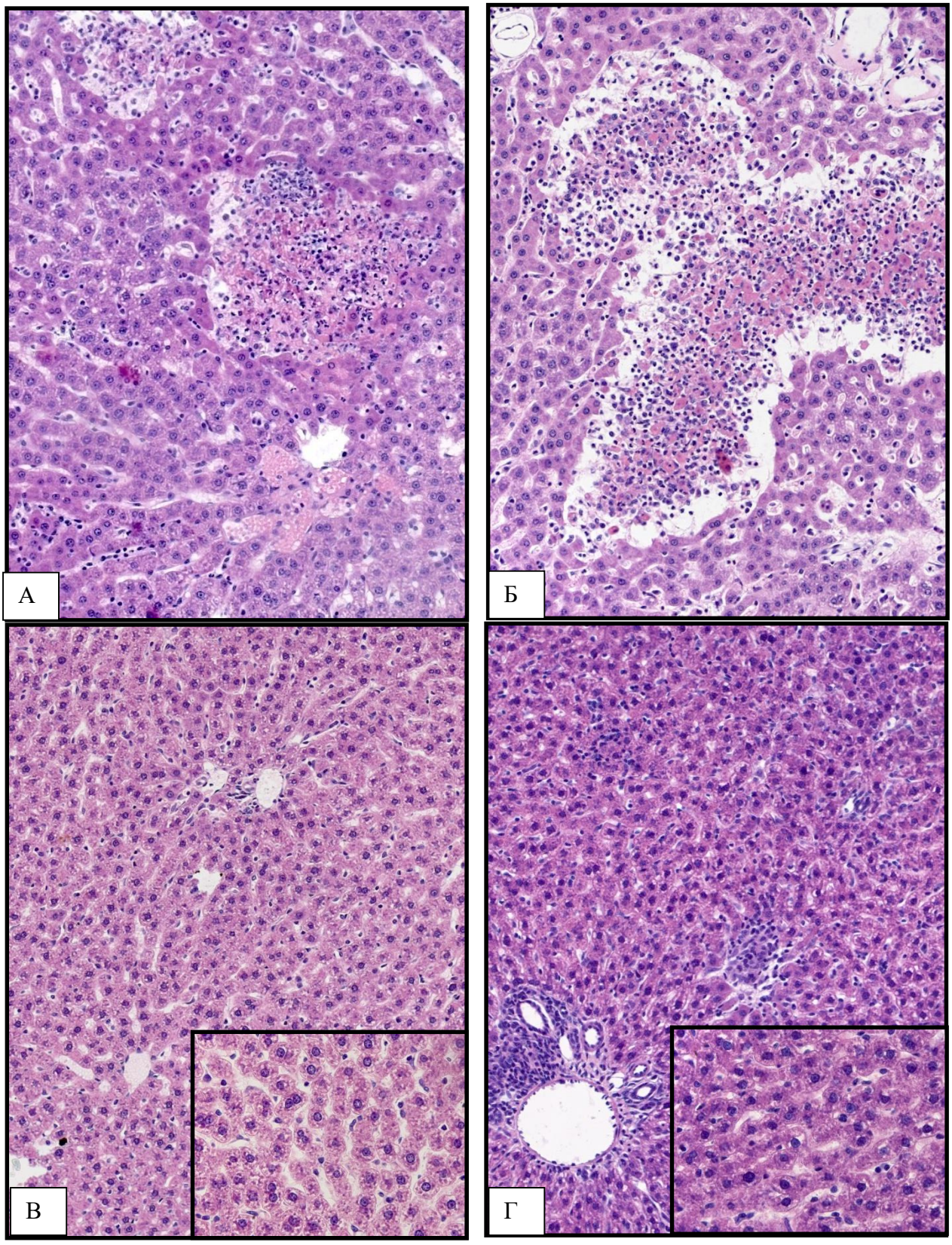


Рис. 8.2.6. Морфологические изменения печени у некастрированных самцов (А, В) и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Б, Г) крыс Вистар на 1-е (А, Б) и 7-е (В, Г) сутки после введения ЛПС. *На 1-е сут после введения ЛПС:* некастрированные самцы (А) – обширные некрозы, неравномерное полнокровие сосудов; орхиэктомированные самцы (Б) – ландшафтообразные некрозы. *На 7-е сут после введения ЛПС:* некастрированные самцы (В) – дистрофические изменения гепатоцитов минимально выражены; орхиэктомированные самцы (Г) – дистрофические изменения слабо выражены, очаговая гистиоцитарная инфильтрация на месте некрозов. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б, В, Г, - ув. 200; вставки – ув. 640

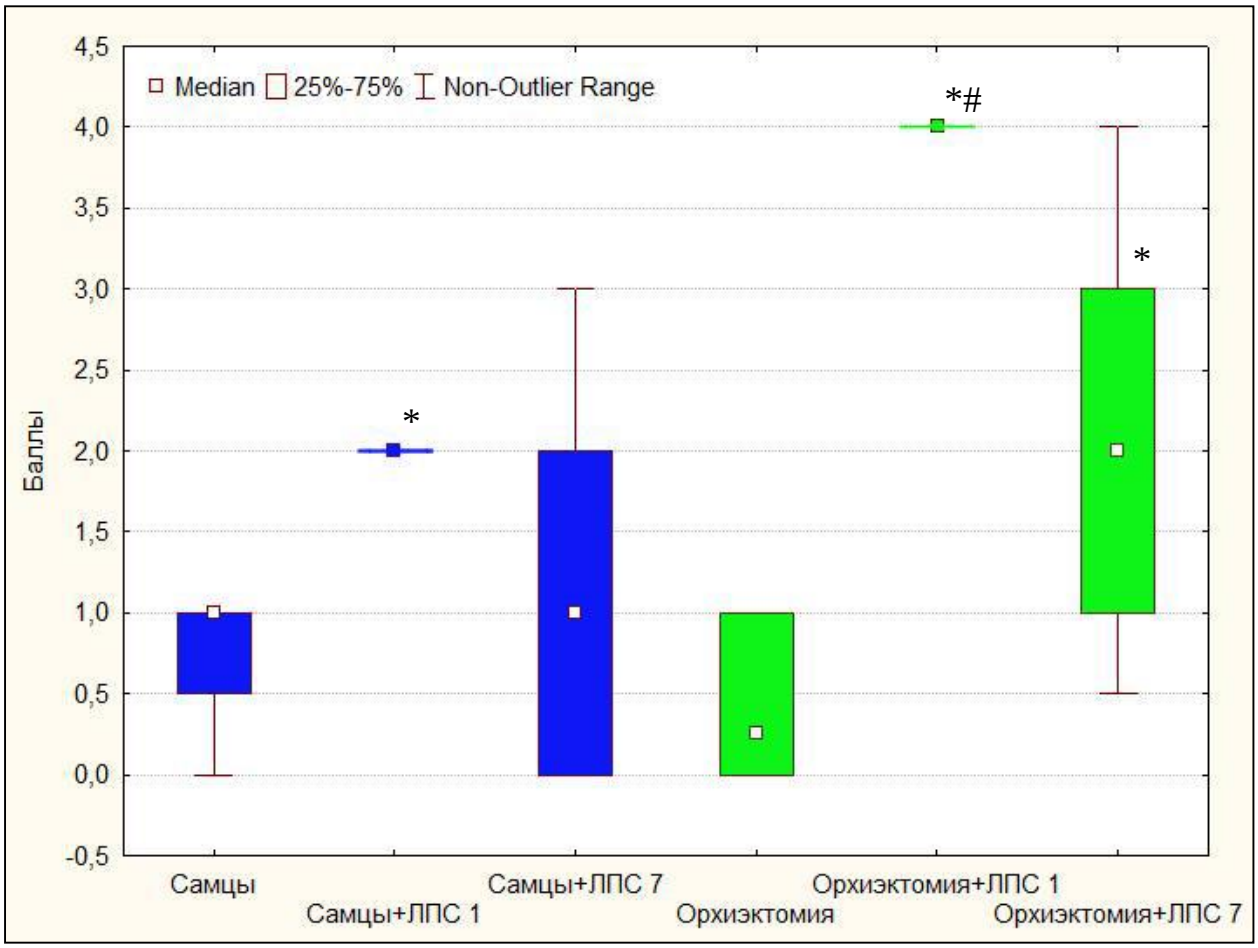


Рис. 8.2.7. Показатель альтеративных изменений в печени у некастрированных самцов крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Орхиэктомия), на 1-е (Самцы+ЛПС 1, Орхиэктомия+ЛПС1) и 7-е сут (Самцы+ЛПС 7, Орхиэктомия+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой, # - некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика изменения уровня активности АлАТ и АсАТ, эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови у некастрированных и кастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС в сыворотке крови некастрированных самцов наблюдалось снижение уровня активности АлАТ, тогда как у кастрированных крыс Вистар в эти сроки активность АлАТ не изменялась по отношению к контрольной группе (табл. 8.2.3, рис. 8.2.8). На 7-е сут СВО активность АлАТ у некастрированных самцов достигала контрольных значений, а у орхиэктомированных животных превышала показатели контрольной группы (табл. 8.2.3, рис. 8.2.8).

Таблица 8.2.3

Показатели уровня активности ферментов АлАТ и АсАТ в сыворотке у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Ферменты печени, Е/л	
		АлАТ	АсАТ
Без орхиэктомии	Контрольная	93 (88-94)[1*]	116 (113-116)[1]
	ЛПС 1-е сут	51 (51-56)[2]	116,5 (115,5-120)[2]
	ЛПС 7-е сут	96 (95-105)[3]	147 (146-159)[3]
Отдаленные сроки после орхиэктомии	Контрольная	81 (75-85)[4]	134 (126-136)[4]
	ЛПС 1-е сут	80 (58-108)[5]	142 (117-147)[5]
	ЛПС 7-е сут	106 (93-107)[6]	177 (167-193)[6]
Статистическая значимость различий (p)		0,0079[1-2] 0,0556[1-3] 0,0079[2-3] 0,9168[4-5] 0,1508[4-6] 0,6905[5-6] 0,2222[1-4] 0,1508[2-5] 0,9168[3-6]	0,4127[1-2] 0,0079[1-3] 0,0159[2-3] 0,2703[4-5] 0,0556[4-6] 0,0556[5-6] 0,0159[1-4] 0,0571[2-5] 0,2506[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 1-е сут развития СВО у орхиэктомированных крыс Вистар выявлялось 10-кратное увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови, и этот показатель был выше в 7,5 раз по сравнению с некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС (табл. 8.2.4, рис. 8.2.8А). На 7-е сут эксперимента в сыворотке крови некастрированных самцов уровень эндотоксина снижался и не превышал контрольные значения, а в отдаленные сроки после орхиэктомии – был статистически значимо выше контрольной группы (табл. 8.2.4, рис. 8.2.8А).

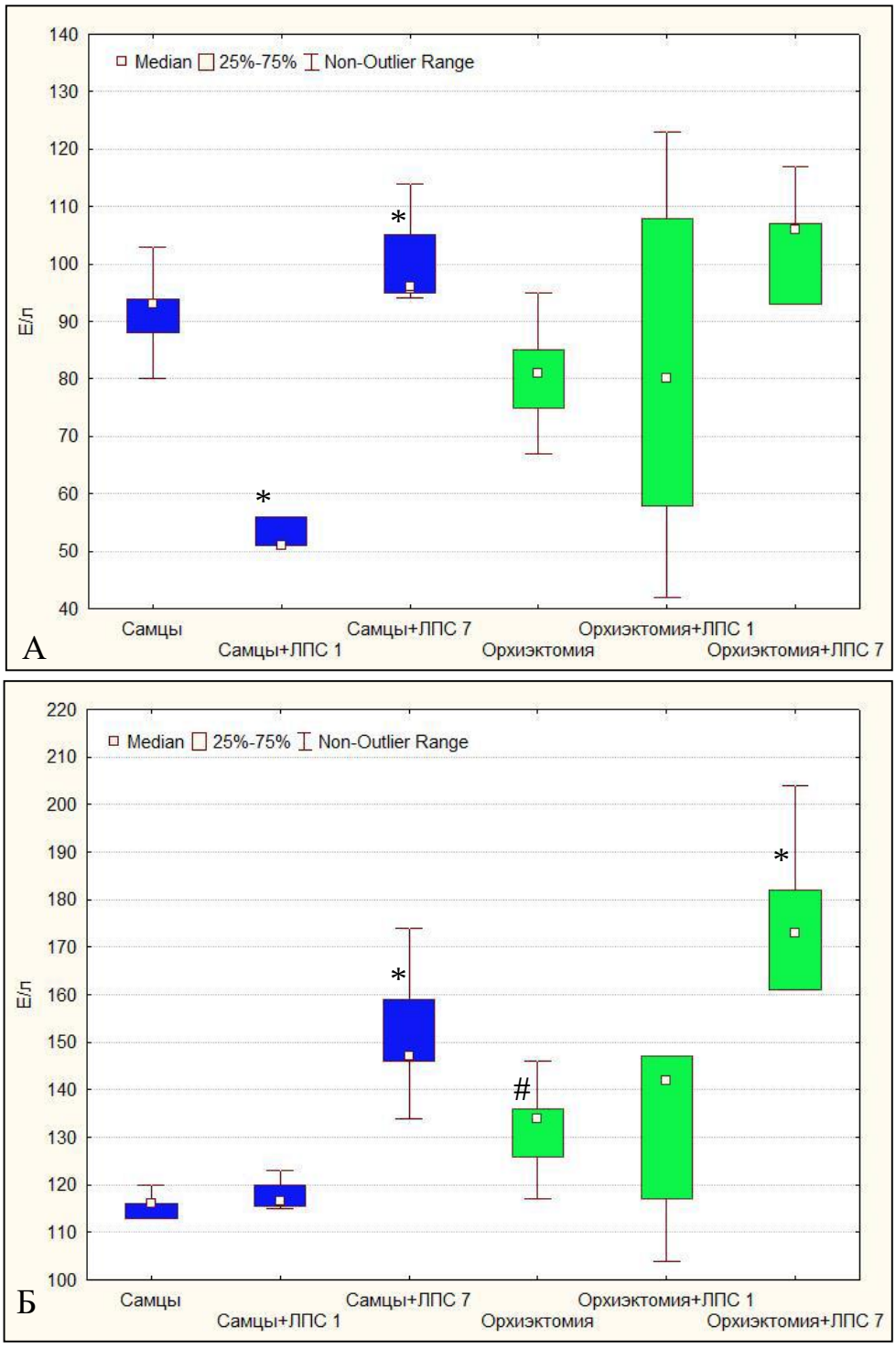


Рис. 8.2.8. Изменение уровня активности АлАТ (А) и АсАТ (Б) в сыворотке крови у некастрированных самцов крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Орхиэктомия), на 1-е (Самцы+ЛПС 1, Орхиэктомия+ЛПС 1) и 7-е сут (Самцы+ЛПС 7, Орхиэктомия+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; # - с некастрированными самцами

Таблица 8.2.4

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Эндотоксин, МЕ/мл	Кортикостерон, нг/мл
Без орхиэктомии	**Контрольная**	3,25 (2,95-3,81)[1*]	37,88 (34,80-41,00)[1]
	ЛПС 1-е сут	7,94 (1,68-9,69)[2]	25,95 (20,44-30,04)[2]
	ЛПС 7-е сут	0,77 (0,65-1,00)[3]	35,24 (17,20-41,00)[3]
Отдаленные сроки после орхиэктомии	**Контрольная**	0,65 (0,50-1,20)[4]	41,63 (38,02-54,76)[4]
	ЛПС 1-е сут	59,96 (9,20-144,96)[5]	11,24 (9,94-75,49)[5]
	ЛПС 7-е сут	8,50 (5,00-13,50)[6]	94,38 (40,01-98,13)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,3173^{1-2}$ $0,0095^{1-3}$ $0,0047^{2-3}$ $0,0007^{4-5}$ $0,00001^{4-6}$ $0,2475^{5-6}$ $0,0001^{1-4}$ $0,0197^{2-5}$ $0,0003^{3-6}$	$0,004^{1-2}$ $0,29^{1-3}$ $0,17^{2-3}$ $0,1651^{4-5}$ $0,0247^{4-6}$ $0,0821^{5-6}$ $0,5956^{1-4}$ $0,1551^{2-5}$ $0,0312^{3-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

На 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов содержание кортикостерона в сыворотке крови снижалось, тогда как у орхиэктомированных крыс – не изменялось (табл. 8.2.4, рис. 8.2.9Б). На 7-е сут после введения ЛПС содержание кортикостерона в сыворотке крови у некастрированных самцов нормализовалось, а в отдаленные сроки после орхиэктомии - этот показатель был выше, чем в контрольной группе (табл. 8.2.4, рис. 8.2.9Б).

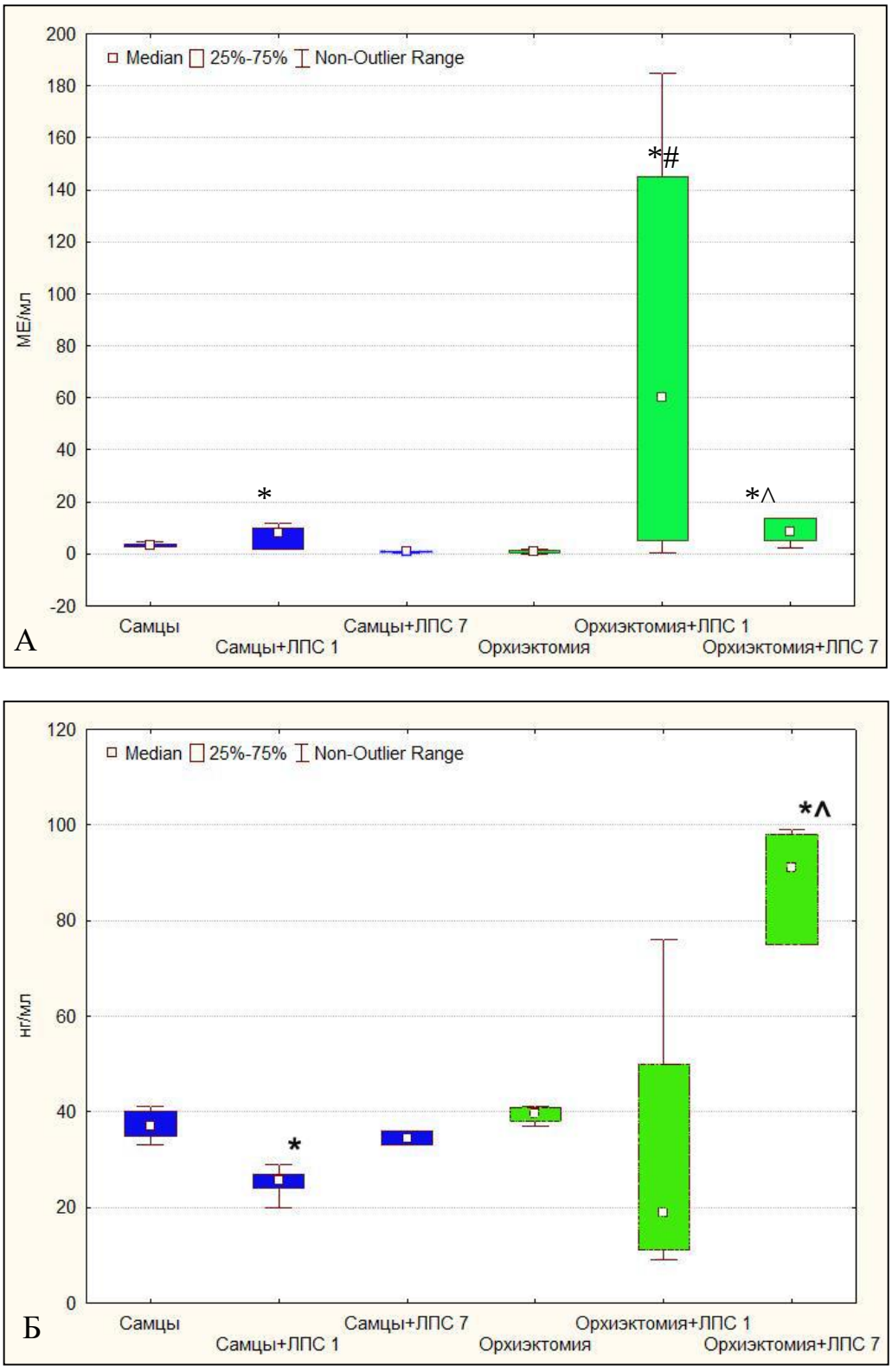


Рис. 8.2.9. Изменение уровня эндотоксина (А) и содержания кортикостерона (Б) в сыворотке крови у некастрированных самцов крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Орхиэктомия), на 1-е (Самцы+ЛПС 1, Орхиэктомия+ЛПС 1) и 7-е сут (Самцы+ЛПС 7, Орхиэктомия+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой; # - некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС, ^ - некастрированными самцами на 7-е сут после введения ЛПС

Сравнительная характеристика морфологических изменений тимуса у кастрированных и некастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в тимусе выявлялась акцидентальная инволюция II стадии. На 1-е сут развития СВО у всех кастрированных крыс в корковом веществе тимуса обнаружена картина «звездного неба» (рис. 8.2.10). Субкапсулярная зона тимуса у кастрированных крыс Вистар на 1-е сут развития СВО была узкая и состояла из 2-4 рядов лимфобластов (рис. 8.2.11). В мозговом веществе тимуса у орхиэктомированных крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС выявлялись тимические тельца I-II фаз развития.

На 7-е сут после введения ЛПС в тимусе у кастрированных самцов обнаружено широкое корковое вещество, границы между корковым и мозговым веществом были четкие (рис. 8.2.10). Субкапсулярная зона узкая, она состояла из 2-6 рядов лимфобластов (рис. 8.2.11).

По данным морфометрического анализа на 1-е сут после введения ЛПС показатели объемной доли коркового вещества тимуса и индекс отношения объемной доли коркового вещества к мозговому у орхиэктомированных крыс Вистар было статистически значимо выше по сравнению с некастрированными самцами (табл. 8.2.5, рис. 8.2.12). Ширина субкапсулярной зоны у орхиэктомированных самцов в эти сроки развития СВО была ниже показателей соответствующей контрольной группы, а у животных без орхиэктомии – наоборот выше (табл. 8.2.5, рис. 8.2.12Б). На 7-е сут после введения ЛПС ширина субкапсулярной зоны тимуса у кастрированных самцов была ниже, чем у некастрированных (табл. 8.2.5, рис. 8.2.12Б). По остальным показателям различий между опытными группами выявлено не было.

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов развивается акцидентальная инволюция тимуса II стадии, что сопровождается уменьшением объемной доли коркового вещества и расширением его субкапсулярной зоны. Развитие СВО в отдаленные сроки после орхиэктомии, напротив, характеризуется расширением коркового вещества тимуса и сужением его субкапсулярной зоны.

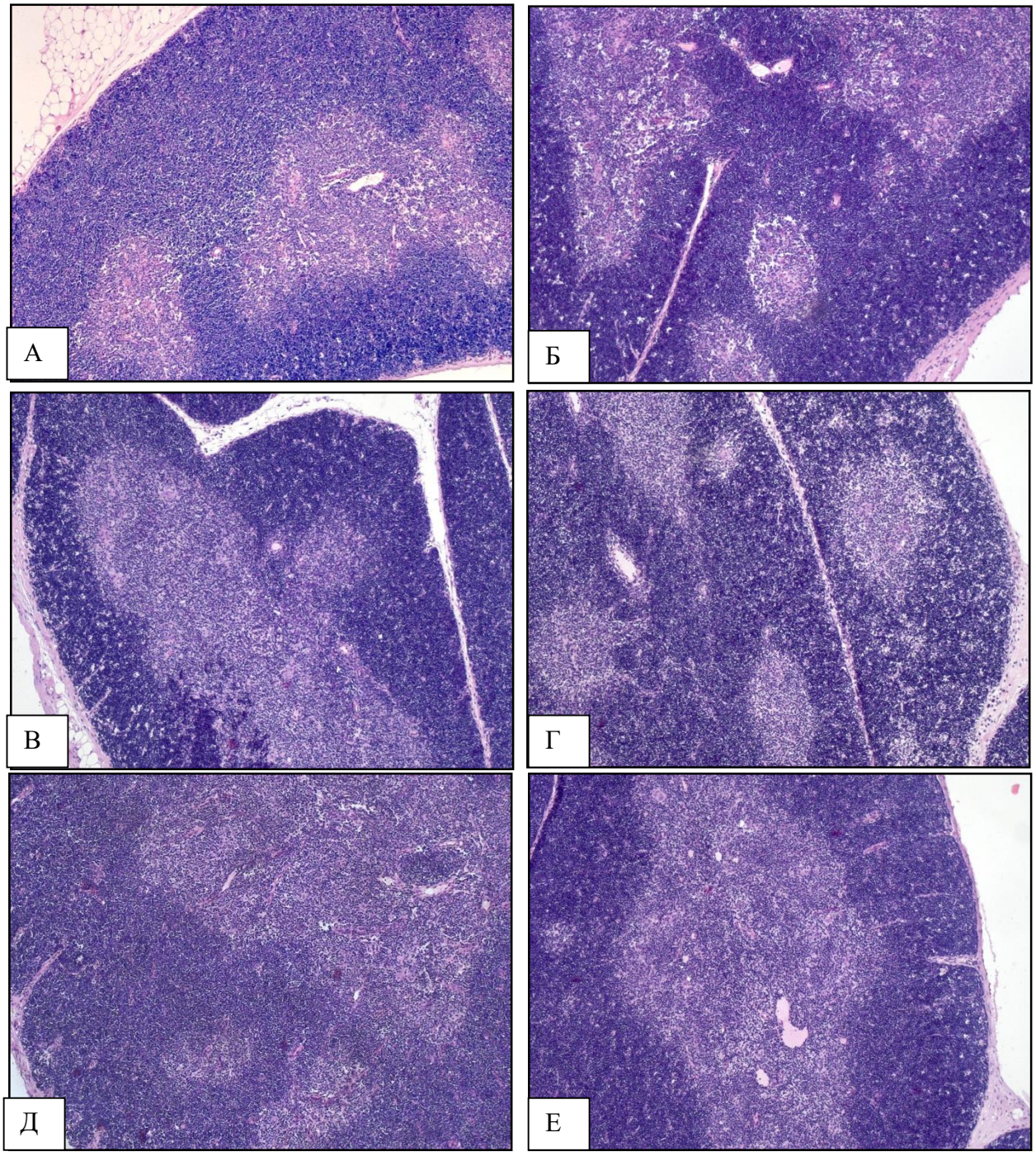


Рис. 8.2.10. Морфологическая характеристика тимуса у некастрированных самцов (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (Б, Г, Е) контрольной группы (А, Б) и на 1-е (В, Г) и 7-е (Д, Е) сутки после введения ЛПС. *Контрольная группа, некастрированные самцы (А)* – корковое и мозговое вещество плотно «заселено» лимфоцитами, границы между корковым и мозговым веществом четкие; *отдаленные сроки после орхиэктомии (Б)*: акцидентальная инволюция II стадии, картина «звездного неба» в корковом веществе. *На 1-е сут после введения ЛПС* (В, Г) – акцидентальная инволюция II стадии, картина «звездного неба». *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (Д) – широкое корковое вещество тимуса, границы между корковым и мозговым веществом четкие; *отдаленные сроки после орхиэктомии* (Е) – широкое корковое вещество тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

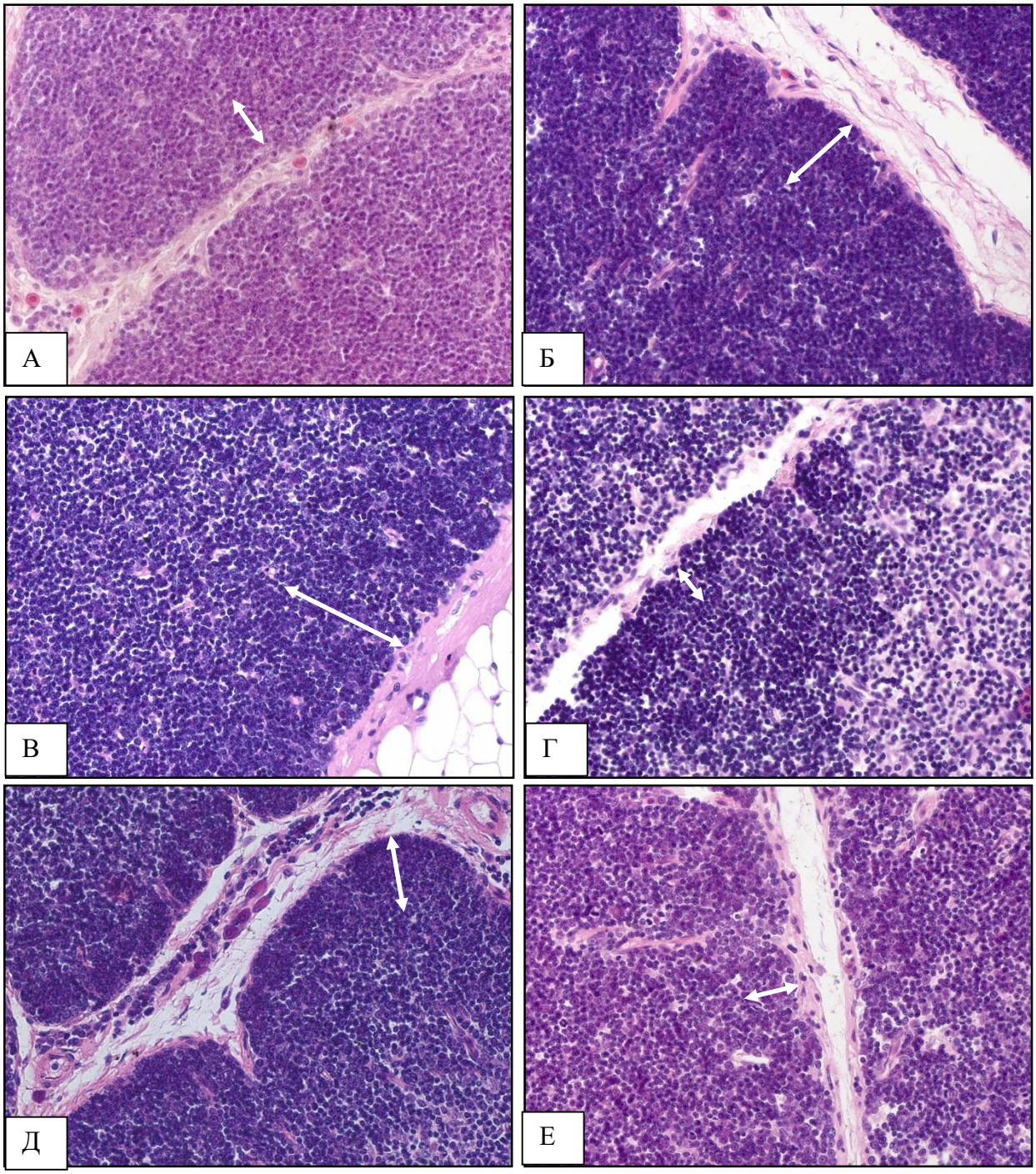


Рис. 8.2.11**.** Морфологическая характеристика субкапсулярной зоны коркового вещества тимуса у некастрированных самцов (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (Б, Г, Е) контрольной группы (А, Б) и на 1-е (В, Г) и 7-е (Д, Е) сутки после введения ЛПС. *Контрольная группа*: *некастрированные самцы* (А) – субкапсулярная зона представлена 2-6 рядами лимфобластов; *орхиэктомированные самцы* (Б) – субкапсулярная зона широкая, представлена 8-14 рядами лимфобластов. *На 1-е сут после введения ЛПС*: *некастрированные самцы* (В) – расширение субкапсулярной зоны; *орхиэктомированные самцы* (Г) – субкапсулярная зона узкая, представлена 2-5 рядами лимфобластов. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (Д) – широкая субкапсулярная зона; *орхиэктомированные самцы* (Е) – субкапсулярная зона узкая. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

Таблица 8.2.5

Морфометрическая характеристика тимуса у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (M±m)

Группа наблюдения		Объемная доля, %		Индекс отношения КВ к МВ, усл. ед.	Ширина СКЗ, мкм
		КВ	МВ		
Без орхиэктомии	Контрольная	54,98±1,20[1*]	45,02±1,20[1]	1,27±0,06[1]	25,28±1,32[1]
	ЛПС 1-е сут	55,06±0,65[2]	44,94±0,65[2]	1,23±0,03[2]	39,74±0,72[2]
	ЛПС 7-е сут	70,33±2,47[3]	29,67±2,47[3]	2,48±0,28[3]	53,86±3,62[3]
Отдаленные сроки после орхиэктомии	Контрольная	56,38±2,16[4]	43,62±2,16[4]	1,51±0,13[4]	62,55±4,29[4]
	ЛПС 1-е сут	61,38±3,20[5]	38,62±3,20[5]	1,94±0,28[5]	23,35±3,34[5]
	ЛПС 7-е сут	70,82±2,04[6]	29,18±2,04[6]	3,06±0,44[6]	36,69±0,56[6]
Статистическая значимость различий (p)		0,7913[1-2] 0,0027[1-3] 0,0045[2-3] 0,8773[4-5] 0,0108[4-6] 0,0269[5-6] 0,6272[1-4] 0,3938[2-5] 1,000[3-6]	0,7913[1-2] 0,0027[1-3] 0,0045[2-3] 0,8773[4-5] 0,0108[4-6] 0,0269[5-6] 0,6272[1-4] 0,3938[2-5] 1,000[3-6]	0,4914[1-2] 0,0027[1-3] 0,0045[2-3] 0,7576[4-5] 0,0066[4-6] 0,0343[5-6] 0,6272[1-4] 0,1769[2-5] 0,3055[3-6]	0,0112[1-2] 0,0143[1-3] 0,0025[2-3] 0,0055[4-5] 0,0126[4-6] 0,0339[5-6] 0,0130[1-4] 0,0047[2-5] 0,0143[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения; КВ – корковое вещество, МВ – мозговое вещество, СКЗ – субкапсулярная зона

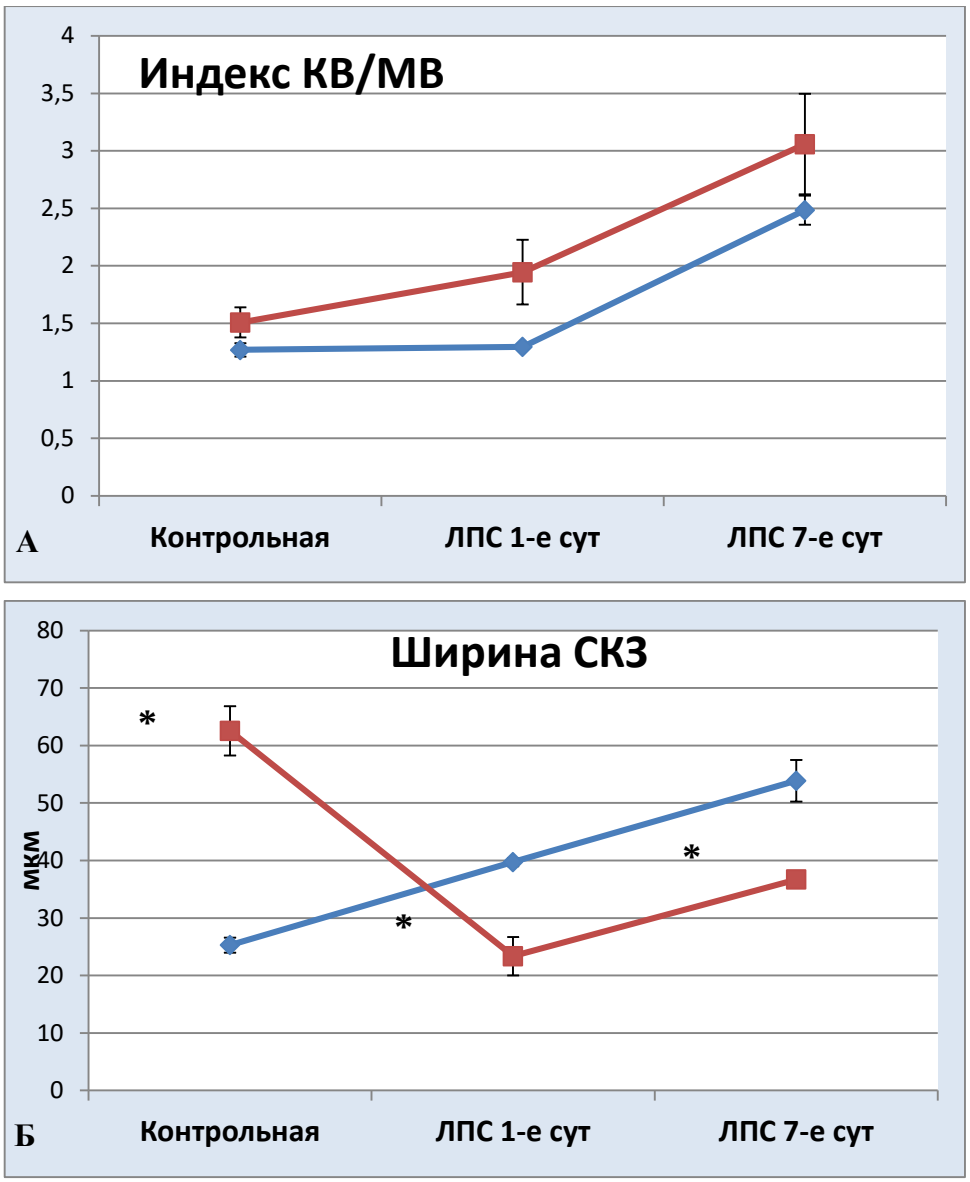


Рис. 8.2.12. Изменение индекса отношения объемной доли коркового вещества тимуса к мозговому – КВ/МВ (А) и ширины субкапсулярной зоны - СКЗ (Б) тимуса у некастрированных самцов (синяя линия) и орхиэктомированных (красная линия) крыс Вистар контрольной группы, на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Значения представлены в виде m±M. * - различия показателей статистически значимы между некастрированными и кастрированными самцами

Сравнительная характеристика морфологических изменений селезенки у некастрированных и кастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут после введения ЛПС у орхиэктомированных крыс Вистар в селезенке ПАЛМ-зона была выражена (рис. 8.2.13 Г), лимфоидные узелки с крупными герминативными центрами (рис. 8.2.14 Г), в которых выявлялись фрагменты ядер лимфоцитов и небольшое число лимфобластов. В красной пульпе обнаружены мегакариоциты и рассеянные нейтрофилы. В эти сроки развития СВО в селезенке у некастрированных самцов наблюдалось «опустошение» белой пульпы, представленной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками (рис. 8.2.13В, рис. 8.2.15А). В лимфоидных узелках выявлялись крупные герминативные центры, в них единичные митозы, фрагменты ядер (рис. 8.2.14В). Маргинальные зоны лимфоидных узелков были уже по сравнению с контрольной группой.

На 7-е сут после введения ЛПС у орхиэктомированных крыс Вистар в селезенке наблюдалось сужение лимфоидных узелков и их герминативных центров, которые были представлены лимфобластами, среди которых выявлялись митотически делящиеся. ПАЛМ-зона была выражена, в красной пульпе выявлялись единичные нейтрофилы, большое число мегакариоцитов (рис. 8.2.13Е; рис. 8.2.14Е). У некастрированных самцов на 7-е сут после введения ЛПС обнаружено увеличение объемной доли белой пульпы селезенки и сужение герминативных центров лимфоидных узелков (рис. 8.2.13Д; рис.8.2.14Д, рис. 8.2.15В).

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов выявлено «опустошение» белой пульпы селезенки (рис. 8.2.15А, Б). Развитие СВО в отдаленные сроки после орхиэктомии, напротив, характеризуется гиперплазией белой пульпы селезенки (рис. 8.2.15А, Б). На 7-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов обнаруживается тенденция к нормализации структуры органа, а в отдаленные сроки после орхиэктомии гиперплазия белой пульпы сохраняется по сравнению с более ранним сроком развития СВО.

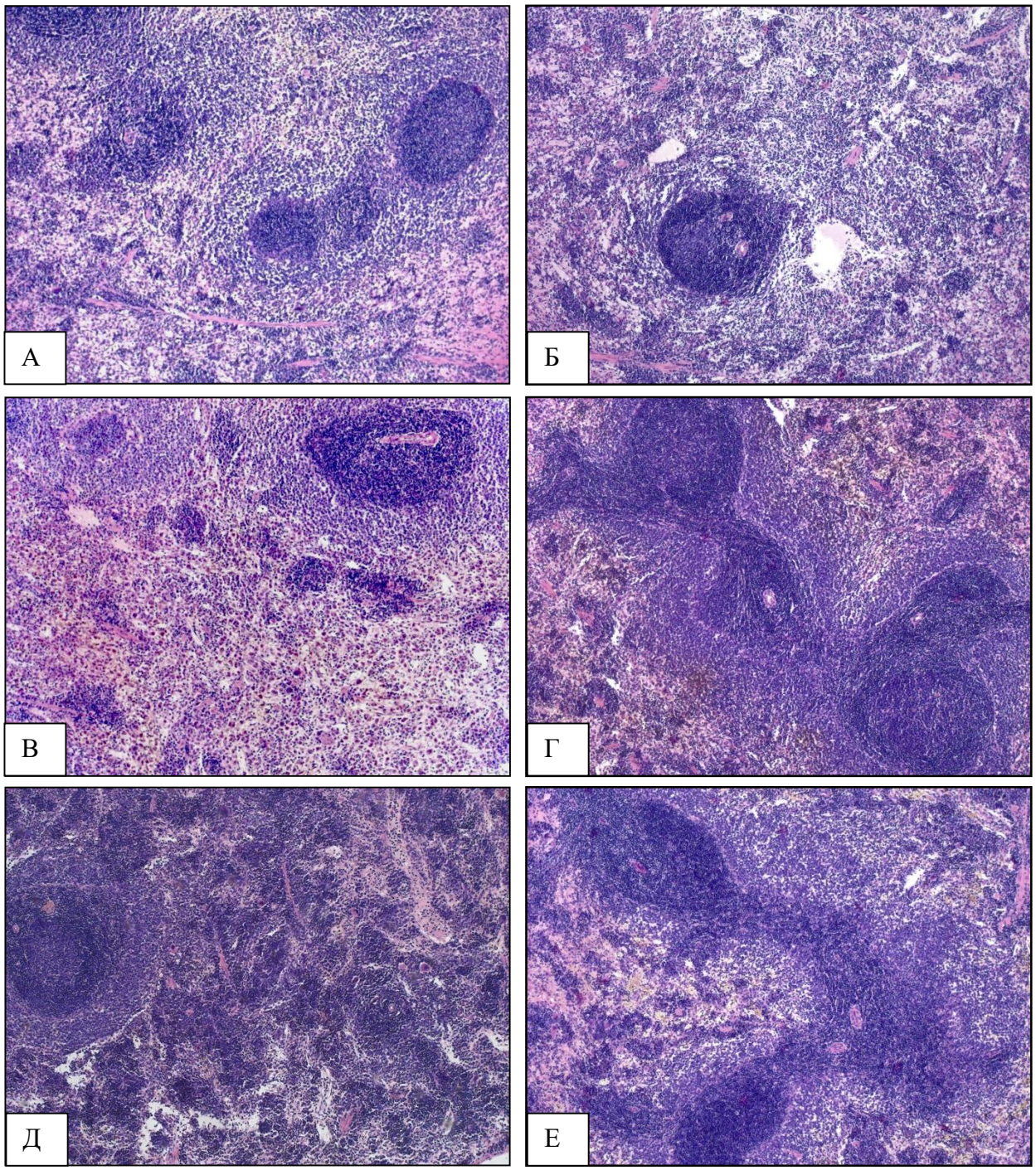


Рис. 8.2.13. Морфологическая характеристика селезенки у некастрированных самцов крыс Вистар (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Б, Г, Е) контрольной группы (А, Б) и на 1-е (В, Г) и 7-е (Д, Е) сутки после введения ЛПС. *Контрольная группа: некастрированные самцы* (А) – узкая зона ПАЛМ, небольшие лимфоидные узелки с узкими герминативными центрами; *орхиэктомированные самцы* (Б) – ПАЛМ-зона менее выражена, лимфоидный узелок с небольшим герминативным центром. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (В) – «опустошение» белой пульпы; *орхиэктомированные самцы* (Г) – гиперплазия белой пульпы: широкая ПАЛМ-зона и крупные лимфоидные узелки. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (Д) – гиперплазия белой пульпы; *орхиэктомированные самцы* (Е) – ПАЛМ-зона и крупные лимфоидные узелки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

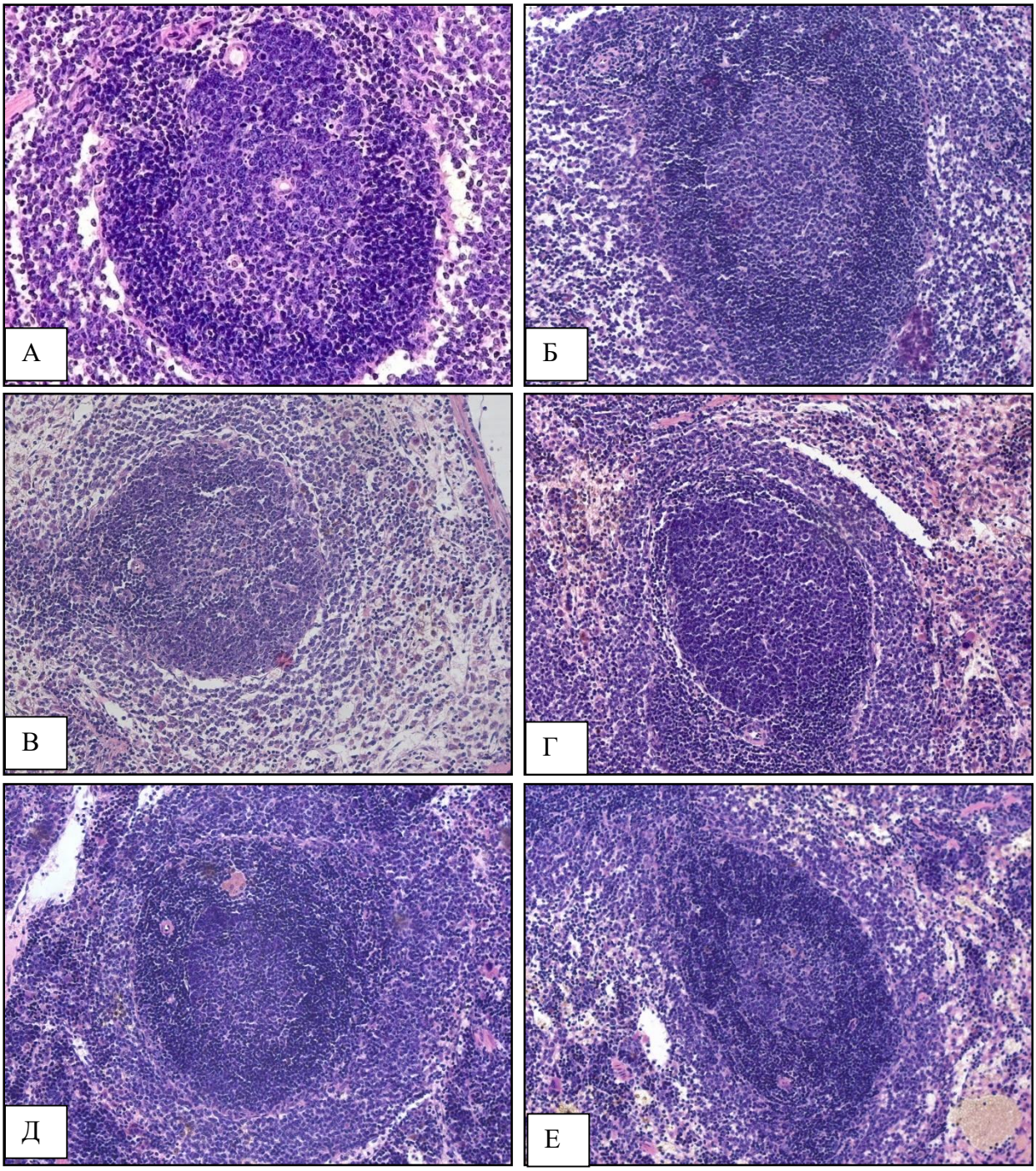


Рис. 8.2.14. Морфологическая характеристика лимфоидных узелков селезенки у некастрированных самцов (А, В, Д) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (Б, Г, Е) контрольной группы (А, Б) и на 1-е (В, Г) и 7-е (Д, Е) сутки после введения ЛПС. *Контрольная группа* (А, Б) – лимфоидный узелок с герминативным центром. *На 1-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (В) – лимфоидный узелок с широким герминативным центром; *орхиэктомированные самцы* (Г) – широкий центр размножения лимфоидного узелка, в котором выявляются лимфобласты и погибшие лимфоциты. *На 7-е сут после введения ЛПС: некастрированные самцы* (Д) – лимфоидный узелок с герминативным центром и широкой маргинальной зоной; *орхиэктомированные самцы* (Е) – лимфоидный узелок с герминативным центром и широкой маргинальной зоной. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

Таблица 8.2.6

Морфометрические показатели селезенки у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (m±M)

Группа наблюдения		Селезенка				Лимфоидные узелки селезенки	
		ПАЛМ, %	Лимфоидные узелки, %	БП, %	Индекс отношения БП к КП, усл. ед.	МЗ, %	Герминатив-ные центры, %
Без орхиэктомии	Контрольная	27,42±1,65[1*]	14,82±1,62[1]	42,24±1,83[1]	0,78±0,03[1]	44,70±1,92[1]	22,18±1,93[1]
	ЛПС 1-е сут	24,08±0,35[2]	16,99±0,33[2]	40,06±0,55[2]	0,71±0,03[2]	37,68±0,55[2]	30,72±0,32[2]
	ЛПС 7-е сут	30,28±0,53[3]	20,20±0,47[3]	50,48±0,74[3]	1,03±0,02[3]	38,88±1,24[3]	19,54±0,80[3]
В отдаленные сроки после орхиэктомии	Контрольная	17,44±1,70[4]	16,47±1,83[4]	33,91±2,42[4]	0,55±0,05[4]	27,32±2,91[4]	26,83±0,98[4]
	ЛПС 1-е сут	28,18±1,40[5]	26,49±1,20[5]	54,67±1,66[5]	1,29±0,09[5]	27,01±2,83[5]	68,43±4,97[5]
	ЛПС 7-е сут	26,30±1,67[6]	14,14±1,00[6]	40,44±1,56[6]	0,73±0,04[6]	29,52±1,87[6]	22,41±1,99[6]
Статистическая значимость различий (p)		0,0008[1-2] 0,0077[1-3] 0,0038[2-3] 0,0013[4-5] 0,0055[4-6] 0,3913[5-6] 0,0008[1-4] 0,0080[2-5] 0,1258[3-6]	0,2330[1-2] 0,0041[1-3] 0,0058[2-3] 0,0005[4-5] 0,2884[4-6] 0,0002[5-6] 0,5637[1-4] 0,0000[2-5] 0,0033[3-6]	0,0369[1-2] 0,0027[1-3] 0,0045[2-3] 0,0003[4-5] 0,0500[4-6] 0,0002[5-6] 0,0018[1-4] 0,0000[2-5] 0,0022[3-6]	0,0457[1-2] 0,0027[1-3] 0,0046[2-3] 0,0003[4-5] 0,0222[4-6] 0,0002[5-6] 0,0029[1-4] 0,0000[2-5] 0,0022[3-6]	0,0002[1-2] 0,0388[1-3] 0,4064[2-3] 0,6911[4-5] 0,7440[4-6] 0,5676[5-6] 0,0005[1-4] 0,0067[2-5] 0,0200[3-6]	0,0001[1-2] 0,2571[1-3] 0,0010[2-3] 0,0003[4-5] 0,1025[4-6] 0,0002[5-6] 0,0124[1-4] 0,0000[2-5] 0,4624[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения; ПАЛМ – периартериолярные муфты, БП – белая пульпа, КП – красная пульпа, МЗ – маргинальная зона

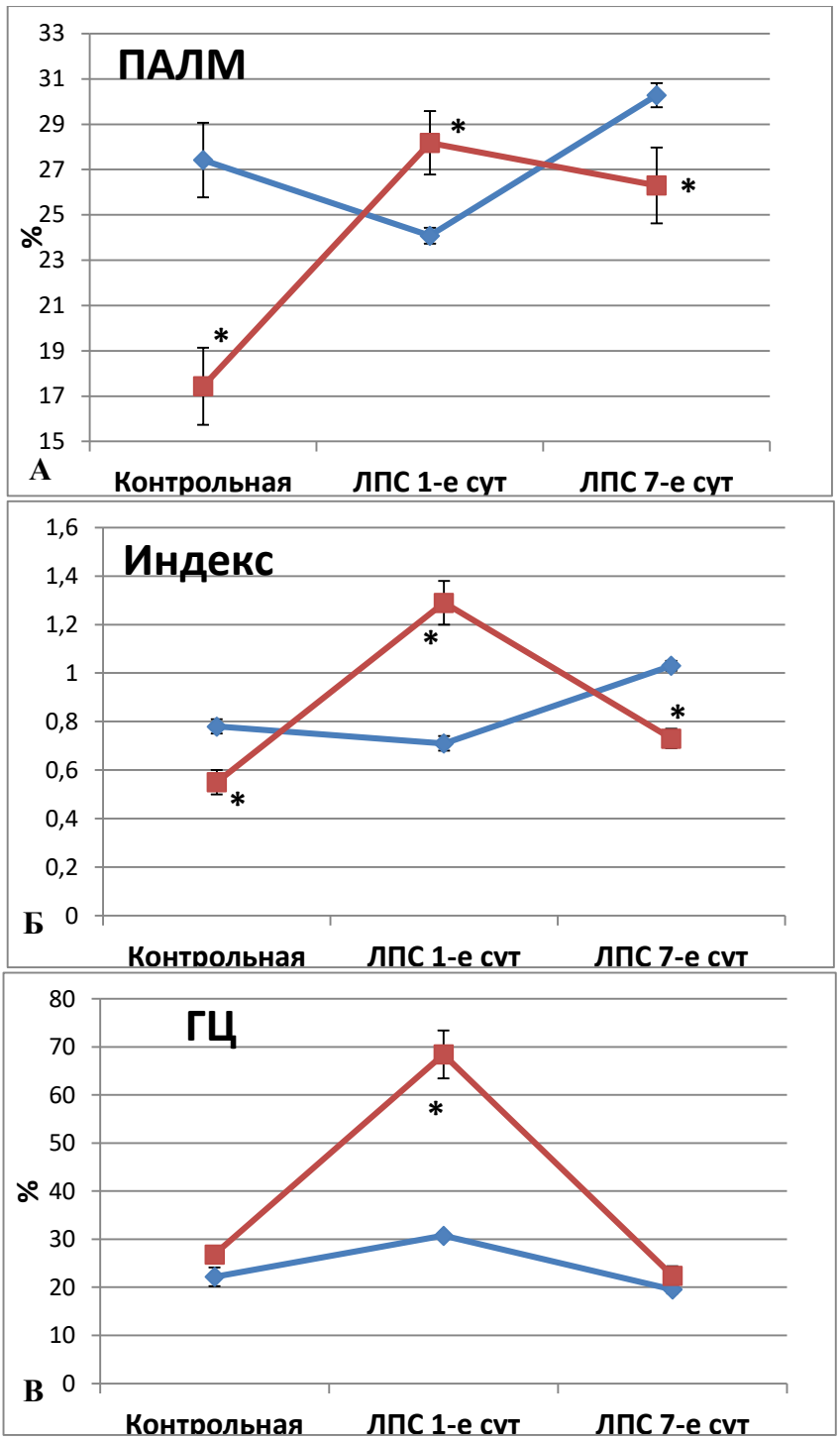


Рис. 8.2.15. Изменение объемной доли ПАЛМ-зоны (А), индекса отношения объемной доли белой пульпы к красной (Б), объемной доли герминативных центров (В) лимфоидных узелков селезенки у некастрированных самцов (синяя линия) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (красная линия) контрольной группы, на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Значения представлены в виде m±M. * - различия статистически значимы между некастрированными и кастрированными самцами

Сравнительная характеристика содержания цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у кастрированных и некастрированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

На 1-е сут развития СВО концентрация неоптерина в сыворотке крови как у кастрированных крыс Вистар, так и у некастрированных повышалась. Содержание TGF-β в сыворотке крови в эти сроки развития СВО у некастрированных самцов снижалось, а в отдаленные сроки после орхиэктомии – не отличалось от значений соответствующей контрольной группы (табл. 8.2.7).

В эти сроки эксперимента в культуре клеток селезенки у некастрированных самцов и орхиэктомированных крыс Вистар выявлялось снижение уровня продукции и секреции клетками селезенки ИЛ-4 и ИЛ-12. При развитии СВО у некастрированных крыс наблюдалось снижение уровня продукции ИЛ-2, содержание которого в культуральной жидкости селезенки у кастрированных крыс Вистар на 1-е сут СВО не изменялось (табл. 8.2.8, рис. 8.2.16). Показатели уровня продукции и секреции ИЛ-6, ИФН-γ и ФНО-α клетками селезенки как некастрированных самцов, так и в отдаленные сроки после орхиэктомии через сутки после введения ЛПС статистически значимо не отличались от значений в соответствующих контрольных группах (табл. 8.2.8).

На 7-е сут развития СВО содержание неоптерина в сыворотке крови кастрированных крыс Вистар было выше по сравнению с некастрированными самцами – в этой группе животных уровень неоптерина нормализовался (табл. 8.2.7).

На 7-е сут после введения ЛПС в культуральной жидкости клеток селезенки у некастрированных самцов уровень продукции ИЛ-2 оставался более высоким, чем в контрольной группе и на 1-е сут после введения ЛПС. В этой группе крыс наблюдалась нормализация содержания Тх1-цитокина ИЛ-12, что сопровождалось снижением концентрации ИФН-γ, ФНО-α и повышением – ИЛ-6 (табл. 8.2.8, рис. 8.2.16). В эти сроки развития СВО в культуре клеток селезенки у орхиэктомированных крыс Вистар было выявлено повышение содержания ИЛ-2 в 3,5 раза по сравнению с контрольной группой, а также снижение продукции ИЛ-6 в 6,7 раз. Концентрация ИЛ-12, также как и у некастрированных самцов, нормализовалась, а уровень продукции ИЛ-4 оставался ниже, чем в контрольной группе. По показателям содержания в культуральной жидкости клеток селезенки ИФН-γ и ФНО-α различий по сравнению с контрольной группой орхиэктомированных животных не выявлено (табл. 8.2.8, рис. 8.2.16).

Таблица 8.2.7

Содержание TGF-β и неоптерина в сыворотке крови у орхиэктомирвоанных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		TGF-β, нг/мл	Неоптерин, нмоль/л
Без орхиэктомии	**Контрольная**	50,8 (43,0-64,0)[1*]	0,84 (0,17-1,14)[1]
	ЛПС 1-е сут	20,5 (13,04-41,8)[2]	1,53 (1,39-1,94)[2]
	ЛПС 7-е сут	не опр.	1,03 (0,78-1,49)[3]
Отдаленные сроки после орхиэктомии	**Контрольная**	33,2 (1,3-41,0)[3]	1,02 (0,92-1,13)[4]
	ЛПС 1-е сут	35,2 (27,6-46,9)[4]	2,45 (1,63-3,43)[5]
	ЛПС 7-е сут	не опр	1,58 (1,47-2,93)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}008^{1\text{-}2}$ $0{,}381^{3\text{-}4}$ $0{,}0024^{1\text{-}3}$ $0{,}6921^{2\text{-}4}$	$0{,}0424^{1\text{-}2}$ $0{,}3717^{1\text{-}3}$ $0{,}0639^{2\text{-}3}$ $0{,}0062^{4\text{-}5}$ $0{,}0090^{4\text{-}6}$ $0{,}3613^{5\text{-}6}$ $0{,}9168^{1\text{-}4}$ $0{,}3907^{2\text{-}5}$ $0{,}0424^{5\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения, не опр. – показатель не определяли

Таблица 8.2.8

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, активированных КонА, у орхиэктомированных самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС (Me; 25-75%)

Группа наблюдения		Уровень продукции цитокинов, пг/мл					
		ИЛ-2	**ИЛ-4**	**ИЛ-6**	**ИЛ-12**	**ИФН-γ**	**ФНО-α**
Без орхиэктомии	**Контрольная**	152,03[1*] (103,8-167,3)	29,9[1] (23,4-39,1)	547[1] (438-798)	38,40[1] (22,9-55,4)	44,70[1] (40,2-58,1)	37,65[1] (33,35-43,03)
	ЛПС 1-е сут	209,80[2] (194,2-548,8)	5,36[2] (4,57-9,02)	326[2] (244-649)	0,00[2] (0-0)	31,30[2] (26,8-45)	24,53[2] (12,27-55,2)
	ЛПС 7-е сут	360,20[3] (239,4-430,1)	3,32[3] (2,10-3,62)	1000[3] (976-1112)	29,70[3] (12,8-33,6)	26,80[3] (13,7-44,7)	12,27[3] (0-26,07)
Отдаленные сроки после орхиэктомии	**Контрольная**	94,52[4] (63,0-369,4)	20,66[4] (9,97-31,85)	1126,2[4] (892,9-1244)	51,73[4] (40,86-129)[4]	53,66[4] (53,66-53,66)	49,07[4] (28,75-62,09)
	ЛПС 1-е сут	55,13[5] (31,5-102,4)	4,88[5] (3,26-7,14)	1289,7[5] (1156-1707)	3,20[5] (0,00-25,26)	53,66[5] (49,19-86,00)	30,67[5] (23,00-36,42)
	ЛПС 7-е сут	341,4[6] (317,2-435,5)	5,66[6] (5,60-17,04)	170,5[6] (104,2-260,8)	43,89[6] (16,81-55,96)	40,24[6] (35,77-49,19)	49,07[6] (46,39-71,58)
Статистическая значимость различий (p)		0,0011[1-2] 0,0771[1-3] 1,000[2-3] 0,3913[4-5] 0,1905[4-6] 0,0472[5-6] 0,2888[1-4] 0,0472[2-5] 0,8065[3-6]	0,0045[1-2] 0,0090[1-3] 0,0185[2-3] 0,0472[4-5] 0,0758[4-6] 0,3472[5-6] 0,3861[1-4] 1,000[2-5] 0,1073[3-6]	0,0760[1-2] 0,0090[1-3] 0,0034[2-3] 0,1779[4-5] 0,0022[4-6] 0,0090[5-6] 0,0120[1-4] 0,0093[2-5] 0,0570[3-6]	0,0209[1-2] 0,3865[1-3] 0,0455[2-3] 0,0047[4-5] 0,3912[4-6] 0,3272[5-6] 0,2207[1-4] 0,6242[2-5] 0,3123[3-6]	0,0740[1-2] 0,0424[1-3] 0,3379[2-3] 0,9168[4-5] 0,1172[4-6] 0,2101[5-6] 0,4034[1-4] 0,0230[2-5] 0,1675[3-6]	0,0881[1-2] 0,0002[1-3] 0,1797[2-3] 0,3472[4-5] 0,4647[4-6] 0,0163[5-6] 0,5808[1-4] 0,6847[2-5] 0,0045[3-6]

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

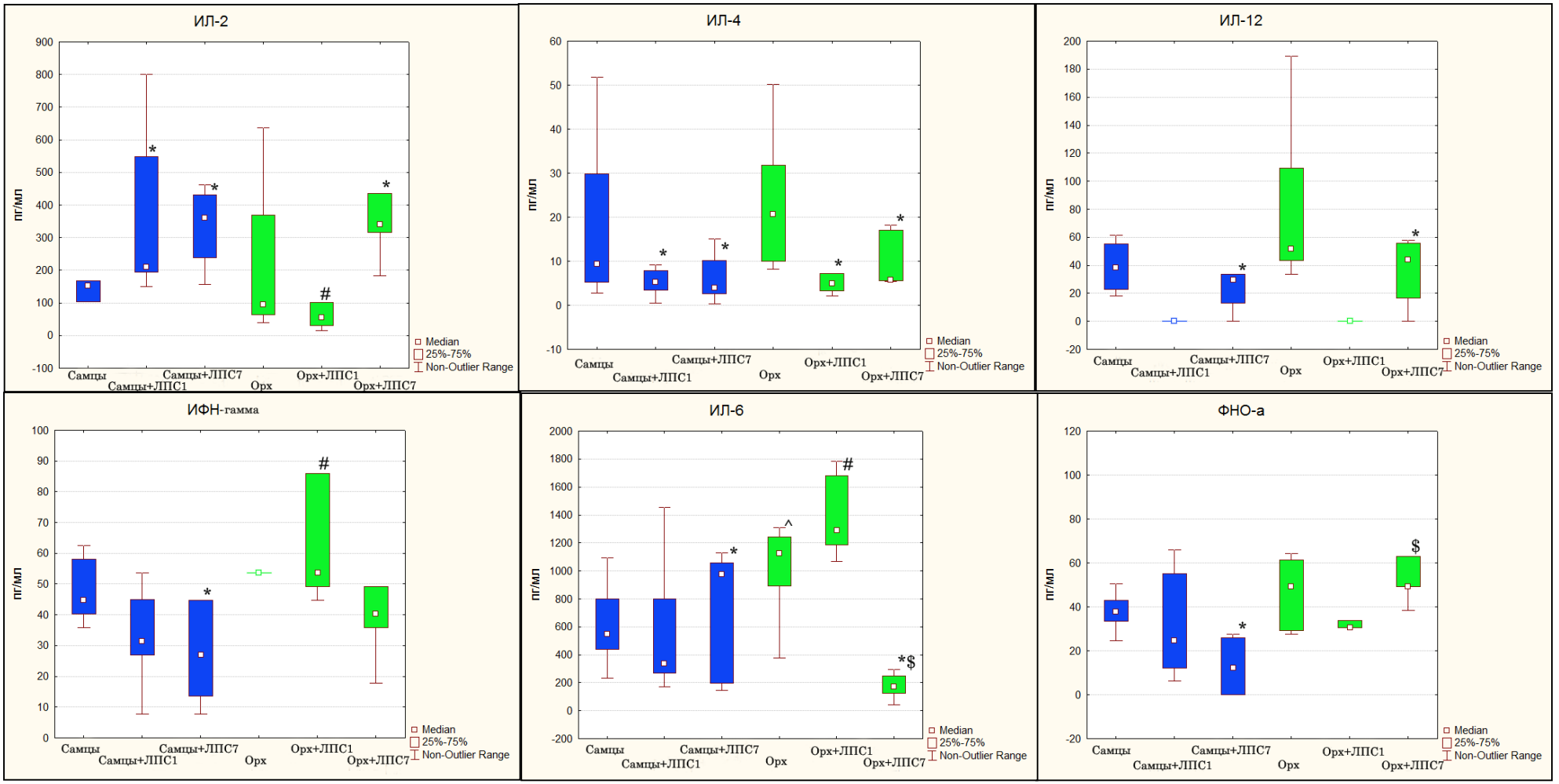


Рис. 8.2.16. Изменение содержания цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки у некастрированных самцов крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии (Орх), на 1-е (Самцы+ЛПС 1, Орх+ЛПС 1) и 7-е сут (Самцы+ЛПС 7, Орх+ЛПС 7) после введения ЛПС. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой, ^ - некастрированными самцами; # - некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС; $ - некастрированными самцами на 7-е сут после введения ЛПС

Заключение

Таким образом, по сравнению с половозрелыми некастрированными самцами крыс Вистар развитие СВО в отдаленные сроки после орхиэктомии характеризуется многократным и длительным повышением уровня эндотоксина в сыворотке крови. На фоне эндотоксинемии наблюдается увеличение содержания кортикостерона в сыворотке крови у орхиэктомированных самцов на 7-е сут после введения ЛПС. При СВО у кастрированных самцов крыс Вистар по сравнению с некастрированными животными выявляются более выраженные альтеративные изменения в печени, и воспалительная реакция в легких, характеризующаяся повышением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. На 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных крыс выявляется опустошение белой пульпы селезенки и акцидентальная инволюция тимуса I-II стадии с расширением субкапсулярной зоны коркового вещества. У кастрированных крыс, напротив, отмечается гиперплазия белой пульпы селезенки, расширение коркового вещества и сужение субкапсулярной зоны тимуса. По сравнению с некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС у орхиэктомированных крыс Вистар наблюдается более высокий уровень продукции ИЛ-6, неоптерина и более низкая концентрация ИЛ-2. Повышение уровня продукции ИЛ-2 и снижение – ИЛ-6 у кастрированных животных выявляется только на 7-е сут развития СВО.

Оценка информативности статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение ЛПС некастрированным и кастрированным самцам крыс Вистар

На 1-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг количество статистически значимо изменяющихся показателей у некастрированных самцов составило 21, а у кастрированных крыс – 14, тогда как на 7-е – 16 и 12, соответственно. Для оценки значимости достоверно изменяющихся при СВО показателей было проведено вычисление информативности каждого признака по формуле Кульбака (табл. 8.2.9, 8.2.10). В каждой группе, для которой были получены значения информативности, были отобраны первые пять показателей, показатели информативности которых оказались максимальными (табл. 8.2.9, 8.2.10). На 1-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов выявлена максимальная диагностическая значимость следующих параметров: уровня продукции ИЛ-12 КонА активированными клетками селезенки, содержания тестостерона, уровня эндотоксина в сыворотке крови, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и объемной доля герминативных центров в лимфоидных узелках селезенки (табл. 8.2.9, рис. 8.2.17).

При введении ЛПС кастрированным самцам максимально информативными были показатели уровня эндотоксина в сыворотке крови, число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, уровень активности АсАТ в сыворотке крови, объемная доля

герминативных центров лимфоидных узелков селезенки и показатель альтеративных изменений в печени (табл. 8.2.9, рис. 8.2.17).

Таким образом, на 1-е сут после введения ЛПС некастрированным самцам наиболее значимыми в механизмах развития СВО были иммунологические нарушения – снижение уровня продукции ИЛ-12, а также изменения содержания тестостерона. При введении ЛПС в отдаленные сроки после орхиэктомии изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови имеет наибольшую патогенетическую значимость в развитии СВО наряду с патологическими изменениями в органах-мишенях, тогда как гормональные и иммунологические нарушения у кастрированных самцов не являются ведущими.

На 7-е сут развития СВО наибольшую патогенетическую значимость у некастрированных самцов имеют показатели уровня продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного ИЛ-6 клетками селезенки, ширина субкапсулярной зоны тимуса, объемная доля белой пульпы селезенки, а также содержание тестостерона в сыворотке крови. В эти сроки после введения ЛПС у кастрированных крыс наиболее информативными оказались такие параметры, как увеличение уровня эндотоксина и содержания кортикостерона и прогестерона в сыворотке крови наряду со снижением продукции ИЛ-6 и сужением субкапсулярной зоны тимуса.

Таким образом, на 7-е сут после введения ЛПС некастрированным самцам наиболее значимыми в механизмах развития СВО были иммунологические нарушения – снижение уровня продукции ИЛ-4 и ИЛ-6 клетками культуры селезенки, расширение субкапсулярной зоны тимуса и гиперплазия белой пульпы селезенки наряду с гормональными изменениями - снижением концентрации тестостерона в сыворотке крови. При введении ЛПС в отдаленные сроки после орхиэктомии изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови имеет наибольшую патогенетическую значимость в развитии СВО, доминируя над иммунологическими нарушениями (сужение субкапсулярной зоны и уровня продукции ИЛ-6) и гормональными изменениями (повышение концентрации кортикостерона и прогестерона).

Таблица 8.2.9

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей через сутки после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг некастрированным самцам крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии

Некастрированные самцы			Кастрированные самцы		
Параметры	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**	**Параметры**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**
ИЛ-12	**↓ в 384**	**20848853**	**Эндотоксин**	**↑ в 90**	**27890**
Тестостерон	**↓ в 56,5**	**9029,96**	**НФ в легких**	**↑ в 12,5**	**1424**
Эндотоксин	**↑ в 2,9**	**878**	**АсАТ**	**↑ в 2**	**985**
НФ в легких	**↑ в 7,4**	**660**	**%ГЦ**	**↑ в 2,5**	**250**
%ГЦ	**↑ в 1,4**	**156,9**	**Баллы печень**	**↑ в 4,9**	**245**
Т-цитотоксические	↓ в 1,3	138	СКЗ	↓ в 2,7	49,7
ИЛ-4	↓ в 5,6	124,7	%БП	↑ в 1,6	28,4
НК	↑ в 5,5	81,5	Тестостерон	↑ в 4	15
Апоптоз тимоцитов	↑ в 9	61,5	Кортикостерон	↑ в 2,5	14,8
ИЛ-2	↑ в 1,4	46,11	Прогестерон	↑ в 2,9	8,8
%МЗ	↓ в 1,2	41,1	ИЛ-12	↓ в 16	3,9
СКЗ	↑ в 1,6	38,9	ИЛ-4	↓ в 4	2,7
Баллы печень	↑ в 2	24,4	%КВ	↑ в 1,1	1,64
АлАТ	↑ в 1,4	14	Эстрадиол	↑ в 1,4	0,96
%ПАЛМ	↓ в 1,1	7,3			
АсАТ	↑ в 1,3	7			
Неоптерин	↑ в 2	6,3			
TGF-β	↓ в 1,9	4,3			
Т-регуляторные	↓ в 2	1,88			
%БП	↓ в 1,1	1,4			
Т-хелперы	↓ в 1,8	0,39			

Условные обозначения: НФ – нейтрофилы; ГЦ – герминативные центры лимфоидных узелков; НК – НК клетки; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

Таблица 8.2.10

Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 7-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг некастрированным самцам крыс Вистар и в отдаленные сроки после орхиэктомии

Некастрированные самцы			Кастрированные самцы		
Параметр	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**	**Параметр**	**Изменения по отношению к контрольной группе**	**Информа-тивность**
ИЛ-4	**↓ в 9**	**472,6**	**Эндотоксин**	**↑ в 12,9**	**2224,8**
СКЗ	**↑ в 2,1**	**232,6**	**СКЗ**	**↓ в 1,7**	**964,3**
ИЛ-6	**↓ в 1,8**	**165,6**	**ИЛ-6**	**↓ в 6,6**	**107,5**
Тестостерон	**↓ в 6,6**	**145,4**	**Прогестерон**	**↑ в 1,3**	**51,4**
%БП	**↑ в 1,2**	**117,2**	**Кортикостерон**	**↑ в 2,7**	**27,1**
ИЛ-2	↑ в 2,4	80,5	%КВ	↑ в 1,3	12,2
%ПАЛМ	↑ в 1,1	50,1	ИЛ-4	↓ в 3,7	10,8
НФ в легких	↑ в 2,4	38,3	Неоптерин	↑ в 1,5	9,9
АсАТ	↑ в 1,3	37,5	%ПАЛМ	↑ в 1,5	6,3
%КВ	↑ в 1,3	28,9	%БП	↑ в 1,2	3,5
Эндотоксин	↓ в 5,5	23,8	Баллы в печени	↑ в 8	2,1
Эстрадиол	↑ в 1,3	17,5	ИЛ-2	↑ в 3,6	1,4
ФНО-α	↓ в 2,8	14,2			
ИФН-γ	↓ в 1,9	6,1			
Кортикостерон	↑ в 2	2,6			
%МЗ	↑ в 1,1	1,54			

Условные обозначения: НФ – нейтрофилы; СКЗ – субкапсулярная зона; МЗ – маргинальная зона лимфоидных узелков; БП – белая пульпа; КВ – корковое вещество

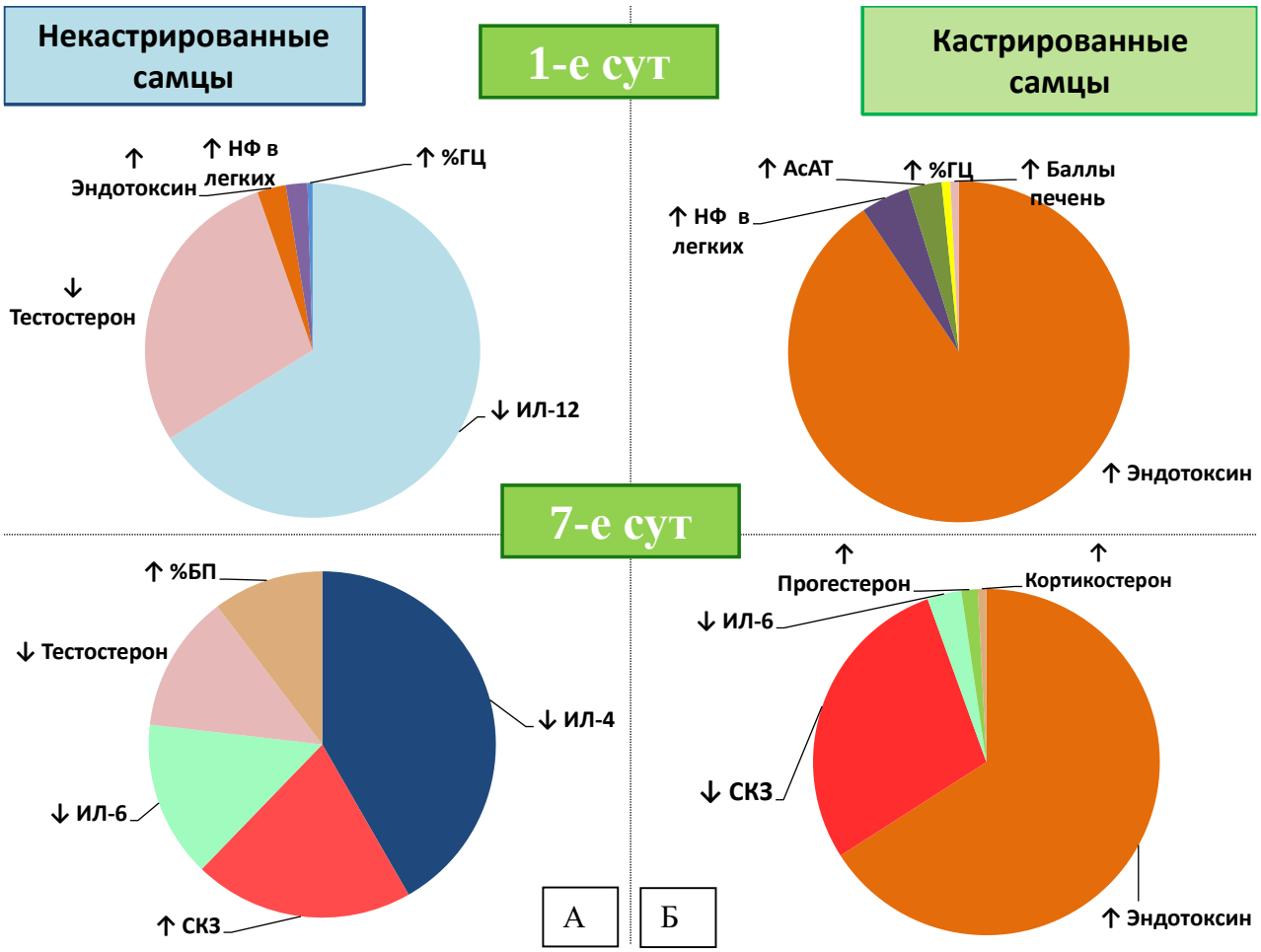


Рис. 8.2.17. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей в ответ на введение ЛПС в дозе 1,5 мг/кг некастрированным самцам (А) и в отдаленные сроки после орхиэктомии крыс Вистар (Б)

8.3 Обсуждение

В регуляции иммунного ответа важную роль играет уровень половых стероидов, содержание которых изменяется в зависимости от возраста и репродуктивного статуса. Во многих работах, посвященных исследованию функциональных изменений иммунной системы при аутоиммунных, инфекционно-воспалительных заболеваниях, показано, что половые гормоны модулируют развитие реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа (Rettew J.A. et al., 2008; Klein S.L., Roberts C.W., 2010).

В экспериментах *in vitro* показано, что андрогены влияют на развитие иммунного ответа при инфекционно-воспалительных заболеваниях посредством регулирования дифференцировки и функционирования клеток иммунной системы, взаимодействуя со специфическими рецепторами на иммунокомпетентных клетках, в частности макрофагах и $CD45^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитах селезенки, печени и тимуса (Benten W.P. et al., 2004; Nalbandian G., Kovats S., 2005; Butts C.L. et al., 2007).

Данные о влиянии физиологических концентраций тестостерона на течение инфекционно-воспалительных заболеваний немногочисленны и противоречивы. M.B. Torres и соавт. (2005) показано, что тестостерон поляризует иммунный ответ преимущественно по Tx1-типу и оказывает провоспалительное действие, однако другие авторы указывают на его иммуносупрессорные эффекты (Wunderlich F. et al., 2002). Введение ЛПС кастрированным самцам приводит к повышению уровня продукции как провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-6 (Wichmann M.W. et al., 1997), так и противовоспалительного ИЛ-10 (Torres M.B. et al., 2005).

Физиологические половые различия морфофункционального состояния иммунной системы обусловлены прямым рецепторно-опосредованным воздействием половых гормонов на иммунокомпетентные клетки и экспрессией генов, расположенных на X- и Y-хромосоме (Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Гены, расположенные на Y-хромосоме, уникальны для самцов и могут определять чувствительность к развитию инфекционных заболеваний. Помимо этого, у самцов одна X-хромосома, т.е. одна из пары аллелей, поэтому они склонны к заболеваниям, сцепленным с X-хромосомой, включая первичные иммунодефицитные состояния. Одно их таких заболеваний – это тяжелое комбинированное иммунодефицитное состояние, сцепленное с X-хромосомой (X-SCID, **X-s**ex **c**hromosomes **i**mmuno**d**eficiency), которое возникает в результате мутации γ-цепей гетеродимеров рецепторов к ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15 и ИЛ-21 (Fish E.N., 2008).

По данным литературы у мужчин чувствительность к ЛПС, тяжесть течения и уровень смертности от эндотоксин-ассоциированных заболеваний увеличиваются с возрастом, что, по-видимому, обусловлено снижением содержания половых гормонов (Angstwurm M.W. et al., 2005; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Известно, что у мужчин старше 40 лет снижается уровень общего и свободного тестостерона на 1,6% в год, и к 70-75 годам развивается физиологическая гипоандрогенемия (Pinsky M.R., Hellstrom W.J., 2010).

Оценка влияния половых стероидных гормонов на иммунный ответ у самцов и самок в экспериментальных исследованиях проводится на модели гонадоэктомии. Работы, посвященные изучению морфофункциональных изменений иммунной системы и барьерных органов в отдаленные сроки после орхиэктомии, немногочисленны и, в основном, касаются изменений массы тимуса и селезенки, а также субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток (Heng T.S. et al., 2005; Page S.T. et al., 2006). Большинство работ по изучению влияния половых стероидов на иммунный ответ выполнены в короткие сроки после кастрации - от 2 до 28 сут (Pejcic-Karapetrovic B. et al., 2001; Heng T.S. et al., 2005). В эти сроки после орхиэктомии наблюдаются морфофункциональные изменения гипоталамуса и гипофиза, которые, в свою очередь, вызывают колебания уровня секреции гормонов гипофиза, оказывая влияние на все органы и системы, в том числе иммунную (Алешин Б.В., 1971; Purves H., Griesbach W., 1957). Поэтому целесообразно исследовать влияние половых стероидов на состояние иммунной

системы в более поздние сроки после орхиэктомии, когда сформированы компенсаторные механизмы в системе гипоталамус-гипофиз-гонады.

Особенности иммунного и воспалительного ответа, развивающегося при андрогенной недостаточности, остаются не изученными. Поэтому нами была проведена оценка морфологических и иммунологических изменений при СВО у самцов крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии.

Нами показано, что в отдаленные сроки после билатеральной орхиэктомии развивается устойчивое состояние гипоандрогенемии, характеризующееся снижением общего и свободного тестостерона на фоне неизмененного уровня эстрадиола, прогестерона и кортикостерона в сыворотке крови. На 1-е сут развития СВО в сыворотке крови у некастрированных самцов было выявлено снижение концентрации только тестостерона, тогда как содержание других исследуемых половых гормонов не изменялось. На 7-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов концентрация тестостерона оставалась низкой, а содержание эстрадиола увеличивалось по сравнению с контрольной группой. Введение ЛПС в отдаленные сроки после орхиэктомии приводило, напротив, к увеличению содержания тестостерона и прогестерона в сыворотке крови, концентрация которых и на 7-е сут эксперимента оставалась на более высоком уровне, чем в контрольной группе. Содержание эстрадиола во все сроки эксперимента в сыворотке крови у орхиэктомированных самцов не изменялось.

Основную долю – 95% тестостерона у мужчин продуцируют инерстициальные клетки тестикул, – клетки Лейдига. Эти клетки также секретируют 5-альфа-дигидротестостерон, андростерон, андростендион, 17-гидроксипрогестерон, прогестерон и прегненолон (Nieschlag E. et al., 2012). Синтез тестостерона происходит не только в тестикулах, а также в надпочечниках, предстательной железе, коже, головном мозге, кишечнике и даже в тимусе у грызунов (Slominski A. et al., 2013). Поэтому гонадоэктомия не приводит к полному исчезновению тестостерона из сыворотки крови у крыс, и его концентрация в отдаленные сроки после орхиэктомии низкая. Исходным субстратом для биосинтеза тестостерона является холестерин. Липопротеин низкой плотности связывает холестерин и переносит его из печени к клеткам различных органов, в которых концентрация холестерина должна поддерживаться на высоком уровне (надпочечники, тестикулы, яичники и др.). Транспорт холестерина из периферических тканей в печень, где он метаболизируется, осуществляется липопротеином высокой плотности (Vodo S. et al. 2013). Показано, что при гонадоэктомии у самцов на фоне повышения содержания холестерина в крови увеличивается уровень липопротеинов высокой и низкой плотности (Lee C.E. et al., 2009; Link J.C. et al., 2015). Увеличение концентрации тестостерона и прогестерона при развитии СВО у орхиэктомированных самцов может быть связано с активацией их синтеза из холестерина за счет интенсивного метаболизма. По данным M. Angstwurm и соавт. (2005) у пожилых мужчин с

острыми инфекционно-воспалительными заболеваниями, развивающимися на фоне физиологической гипоандрогенемии, уровень прогестерона коррелирует с тяжестью течения заболевания: чем выше содержание этого гормона, тем хуже прогноз.

На 1-е сут развития СВО у некастрированных самцов выявлено снижение концентрации кортикостерона в крови, тогда как у кастрированных крыс его показатели не изменялись. На 7-е сут после введения ЛПС у некастрированных самцов наблюдали нормализацию содержания кортикостерона, а в отдаленные сроки после орхиэктомии его показатели повышались. Подобная динамика содержания кортикостерона была нами выявлена и у овариэктомированных самок (см. главу 7.2). По-видимому, механизмы, регулирующие концентрацию кортикостерона у кастрированных самцов и самок сходные, а выявленные закономерности изменения содержания кортикостерона у гонадоэктомированных крыс обоего пола при СВО указывают на роль половых гормонов в регуляции синтеза и метаболизма кортикостерона при введении ЛПС.

По нашим данным течение СВО на фоне гипоандрогенемии более тяжелое, чем при физиологическом уровне тестостерона, что проявляется высоким уровнем эндотоксинемии, и как следствие, более выраженными воспалительными изменениями в органах-мишенях.

На поверхности кишечного эпителия экспрессируются TLR4, активация которых ЛПС приводит к нарушению проницаемости кишечного барьера путем нарушения межэптелиальных контактов, в результате чего увеличивается поступление эндогенного эндотоксина в кровь. Высокий уровень эндогенного эндотоксина вызывает гиперактивацию сигнального каскада NF-κB эффекторных иммунокомпетентных клеток, что характеризуется увеличением уровня продукции провоспалительных цитокинов (O'Hara A.M. et al., 2006; van Vliet M.J., et al., 2010). Q. Wang и соавт. (2001) и J. Derikx и соавт. (2010) показали, что маркерами повышения проницаемости эпителия кишечника являются высокий уровень продукции ИЛ-6 и высокое содержание эндотоксина в крови, что и наблюдалось нами у орхиэктомированных крыс на 1-е сут после введения ЛПС. Показано, что в отдаленные сроки после орхиэктомии количество условно-патогенных бактерий в просветной микрофлоре толстой кишки больше, чем у некастрированных животных (Косырева А.М. и соавт., 2012). По данным В.Б. Писарева и соавт. (2008) при грамотрицательном бактериальном эндотоксикозе увеличивается число энтеробактерий в толстой кишке, наблюдается контаминация и колонизация ими слизистой оболочки тонкой кишки, происходит разрушение бактерий с повышением концентрации ЛПС в просвете кишки. Эти изменения приводят к усилению контаминации и колонизации слизистой оболочки грамотрицательной микрофлорой и последующей транслокацией микроорганизмов из просвета кишки, а также повышением поступления эндотоксина в кровоток. Повышение проницаемости кишечного эпителия в сочетании с высоким содержанием условно-патогенных бактерий, в том числе и грамотрицательных, может быть причиной высокого уровня эндотоксина

в сыворотке крови у орхиэктомированных самцов как на 1-е, так и на 7-е сут после введения ЛПС.

На 1-е сут развития СВО по сравнению с некастрированными крысами у орхиэктомированных самцов число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было выше, что отражает более выраженную воспалительную реакцию. В экспериментах *ex vivo* показано, что метаболит тестостерона – дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С) дозозависимо снижает хемотаксис нейтрофилов, и оказывает протективное действие на развитие воспалительных процессов в легких (Koziol-White C. et al., 2012). По-видимому, низкое содержание ДГЭА-С, связанное со снижением синтеза тестостерона в результате хирургической кастрации, является одной из причин развития более выраженной воспалительной инфильтрации в легких у орхиэктомированных крыс во все сроки развития СВО по сравнению с некастрированными самцами.

По сравнению с некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС в печени у орхиэктомированных крыс были выявлены более выраженные патологические изменения. Альтеративные изменения гепатоцитов в ранние сроки развития СВО в отдаленные сроки после орхиэктомии сопровождались высоким уровнем активности фермента печени – АсАТ, повышение которой свидетельствует о выраженности некротических изменений. На 7-е сут развития СВО в обеих опытных группах наблюдалась нормализация структуры органа, однако в печени у части орхиэктомированных животных выявлялась слабо выраженная дистрофия. Согласно данным литературы активная форма тестостерона – дегидротестостерон, активирует метаболизм жирных кислот и липидов клетками печени, что предотвращает развитие дистрофических изменений в гепатоцитах (Zhang H. et al., 2013). Низкое содержание тестостерона у орхиэктомированных самцов в разные сроки после введения ЛПС на фоне высокого уровня эндотоксина, по-видимому, является причиной более выраженных альтеративных изменений в печени, выявленных нами у кастрированных самцов.

На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе у некастрированных крыс выявлена акцидентальная инволюция I-II стадии, которая сочеталась с расширением субкапсулярной зоны коркового вещества. У кастрированных крыс, напротив, отмечено расширение коркового вещества и сужение субкапсулярной зоны тимуса, что свидетельствует о менее выраженной активации иммунной системы. По данным литературы андрогены, в частности тестостерон, снижают число незрелых двойных позитивных лимфоцитов ($CD4^+CD8^+$), которые заселяют преимущественно корковое вещество тимуса (Olsen N.J., Kovacs W.J., 2011). Также показано, что тестостерон и его метаболиты стимулируют созревание и миграцию из тимуса на периферию $CD8^+$ лимфоцитов (Griefing-Koll C. et al., 2015), что приводит к сужению коркового вещества тимуса. Поэтому на фоне низкого содержания тестостерона в отдаленные сроки после

орхиэктомии наблюдается расширение коркового вещества тимуса, что сохраняется и при развитии СВО на фоне гипоандрогенемии.

В селезенке у некастрированных крыс в ранний срок развития СВО выявляется опустошение белой пульпы, за счет сужения Т-зависимой ПАЛМ-зоны. У кастрированных крыс, напротив, отмечается гиперплазия белой пульпы с увеличением объемной доли как Т-зависимой ПАЛМ-зоны, так и В-зоны. Отмечено более выраженное расширение герминативных центров лимфоидных узелков на 1-е сут после введения ЛПС орхиэктомированным крысам. Согласно данным литературы андрогены оказывают супрессорное действие на пролиферацию и созревание незрелых В-лимфоцитов, при этом активируют их апоптотическую гибель (Sakiani S. et al., 2013). Таким образом, развитие СВО на фоне низких концентраций тестостерона в отдаленные сроки после орхиэктомии сочетается с гиперплазией В-зоны селезенки и выраженной активацией пролиферативных процессов в ее лимфоидных узелках.

Орхиэктомия не влияла на динамику изменений продукции ИЛ-12, ИФН-γ и ИЛ-4 клетками селезенки в ответ на введение ЛПС, что согласуется с данными литературы (Oertelt-Prigione S., 2012; Griefing-Koll C. et al., 2015). По сравнению с некастрированными самцами на 1-е сут после введения ЛПС у орхиэктомированных крыс Вистар наблюдается более высокий уровень продукции ИЛ-6 и низкий – ИЛ-2. Повышение уровня продукции ИЛ-2 и снижение – ИЛ-6 у кастрированных животных выявляется только на 7-е сут развития СВО. Механизмы развития СВО сложные и на многие из них тестостерон может оказывать влияние, начиная от взаимодействия ЛПС с Toll-like рецепторами 4 типа (TLR4) и ассоциированными с ним белками и заканчивая продукцией и секрецией цитокинов. Известно, что тестостерон способен дозозависимо снижать уровень экспрессии TLR4 на макрофагах (Quintar A.A. et al., 2006; Rettew J.A. et al., 2008), ингибировать ЛПС-зависимую активацию p38MAP киназного пути (Benten W.P. et al., 2004) и продукцию провоспалительных цитокинов, включая ИЛ-6, ФНО-α, ИЛ-1β (Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Дегидротестостерон, являясь активной формой тестостерона, конкурирует с NFκB за связывание с промотором ДНК (Norata G.D. et al., 2006), тем самым снижая уровень экспрессии генов, кодирующих цитокины, что указывает на иммуносупрессорные свойства андрогенов. Низкое содержание тестостерона у орхиэктомированных крыс с СВО может опосредовать развитие более выраженных воспалительных и альтеративных изменений в органах-мишенях, сочетающихся с высокой продукцией провоспалительных цитокинов клетками селезенки.

Таким образом, по сравнению с некастрированных самцами СВО у крыс Вистар на фоне орхиэктомии протекает в более тяжелой форме с выраженными воспалительными изменениями в легких и альтеративными – в печени, что сопровождается выраженной эндотоксинемией, активацией продукции провоспалительных цитокинов на ранних сроках развития СВО и

повышением содержания кортикостерона и продукции Тх1-цитокина ИЛ-2 только на 7-е сут после введения ЛПС.

Согласно проведенному анализу информативности статистически значимо изменяющихся показателей в разные сроки после введения ЛПС на фоне орхиэктомии показано, что наибольшую патогенетическую значимость в развитии СВО у кастрированных самцов имеет изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови наряду с патологическими изменениями в органах-мишенях, тогда как гормональные и иммунологические нарушения не являются определяющими. Выявленные особенности течения СВО у кастрированных самцов отражают иммуносупрессорную и модулирующую роль тестостерона в развитии воспалительных реакций.

Глава 9 ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Проводили сравнительный анализ морфологических изменений и иммунологических нарушений через сутки после введения ЛПС в дозе 15 мг/кг самкам и самцам разных возрастные периодов.

9.1 Возрастные особенности морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у самок крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При СВО у новорожденных самок по сравнению с соответствующей контрольной группой содержание эстрадиола снижалось, а концентрация общего тестостерона увеличивалась (табл. 9.1.1). Тогда как в сыворотке крови у десятидневных самок на 1-е сут после введения ЛПС концентрация эстрадиола повышалась, а содержание общего тестостерона не отличалось от значений контрольной группы (табл. 9.1.1). У новорожденных самок и в препубертатный период развитие СВО сопровождалось снижением концентрации прогестерона (табл. 9.1.1). При СВО у половозрелых самок уровень половых стероидных гормонов статистически значимо не изменялся по сравнению с контрольной группой (табл. 9.1.1).

Морфологические изменения в легких у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

На 1-е сут развития СВО у 50% новорожденных самок (5 животных из 10) в легких развивался очаговый интраальвеолярный отек. По сравнению с контрольной группой через сутки после введения ЛПС у них было выявлено увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (табл. 9.1.2). На 1-е сут после введения ЛПС у всех десятидневных самок был выявлен очаговый интраальвеолярный отек (10 крыс из 10), а в межальвеолярных перегородках наблюдалось увеличение числа нейтрофилов, показатели которых соответствовали значениям у новорожденных самок с СВО (табл. 9.1.2). В легких у половозрелых самок на 1-е сут после введения ЛПС выявлялись небольшие очаги интраальвеолярного отека, он был менее выражен и развивался реже, чем в препубертатном периоде (у 50% крыс – 4 самки из 8). Однако число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых самок с СВО было статистически значимо выше, чем у новорожденных самок и крыс препубертатного периода (табл. 9.1.2), что свидетельствует о более выраженной воспалительной реакции.

Таблица 9.1.1

Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самки		**Тестостерон, нг/мл**	**Эстрадиол, пг/мл**	**Прогестерон, нг/мл**
Новорожденные	Контрольная группа	$0,24^{1*}$ (0,16-0,26)	$32,90^{1}$ (32,03-34,47)	$1,19^{1}$ (0,58-1,23)
	СВО	$0,41^{2}$ (0,24-1,16)	$19,54^{2}$ (13,22-21,75)	$0,53^{2}$ (0,23-0,75)
Препубертатный период	Контрольная группа	$0,21^{3}$ (0,10-0,27)	$17,73^{3}$ (15,18-30,17)	$17,6^{3}$ (14,82-18,93)
	СВО	$0,18^{4}$ (0,11-0,29)	$32,65^{4}$ (24,12-55,34)	$4,33^{4}$ (2,84-10,58)
Половозрелые	Контрольная группа	$0,77^{5}$ (0,76-1,13)	$33,55^{5}$ (27,91-40,63)	$36,37^{5}$ (33,20-39,53)
	СВО	$0,60^{6}$ (0,32-0,92)	$32,51^{6}$ (25,88-38,14)	$22,54^{6}$ (18,56-41,54)
Статистическая значимость различий (p)		$0,04^{1-2}$ $0,4^{3-4}$ $0,3^{5-6}$ $0,006^{1-3}$ $0,04^{1-5}$ $0,0006^{3-5}$ $0,1^{2-4}$ $0,5^{2-6}$ $0,02^{4-6}$	$0,01^{1-2}$ $0,03^{3-4}$ $0,89^{5-6}$ $0,01^{1-3}$ $0,49^{1-5}$ $0,006^{3-5}$ $0,03^{2-4}$ $0,09^{2-6}$ $0,3^{4-6}$	$0,05^{1-2}$ $0,00001^{3-4}$ $0,7^{5-6}$ $0,0001^{1-3}$ $0,0001^{1-5}$ $0,0002^{3-5}$ $0,0001^{2-4}$ $0,0001^{2-6}$ $0,4^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

Таблица 9.1.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и показатель патологических изменений в печени у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самки		Число нейтрофилов, абс. число	Показатель патологических изменений в печени, усл. ед
Новорожденные	Контрольная группа	1,70 (1,00-2,40)[1*]	0,50 (0,00-0,50)[1]
	СВО	8,30 (7,10-8,40)[2]	2,50 (1,00-3,00)[2]
Препубертатный период	Контрольная группа	2,60 (1,90-3,55)[3]	0,75 (0,25-1,25)[3]
	СВО	8,50 (8,40-9,70)[4]	4,00 (3,50-4,00)[4]
Половозрелые	Контрольная группа	1,57 (1,43-2,00)[5]	1,00 (0,00-2,00)[5]
	СВО	23,6 (14,6-28,7)[6]	3,00 (3,00-5,00)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,00002^{1-2}$ $0,00003^{3-4}$ $0,0002^{5-6}$ $0,2^{1-3}$ $0,4^{1-5}$ $0,1^{3-5}$ $0,1^{2-4}$ $0,01^{2-6}$ $0,01^{4-6}$	$0,00007^{1-2}$ $0,00001^{3-4}$ $0,0003^{5-6}$ $0,1^{1-3}$ $0,1^{1-5}$ $0,4^{3-5}$ $0,005^{2-4}$ $0,3^{2-6}$ $0,02^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

Морфологические изменения в печени у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При СВО в печени у новорождённых самок выявлялись в основном умеренные дистрофические изменения, полнокровие сосудов, стазы и сладжи. У 1 крысы из 6 были выявлены обширные зоны некрозов. На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок уровень активности АлАТ в сыворотке крови повышался, а АсАТ не изменялся (табл. 9.1.3). В препубертатном периоде на 1-е сут после введения ЛПС по сравнению с новорожденными самками патологические изменения в печени были более выражены: наблюдались очаговые и ландшафтообразные некрозы (у 7 самок из 10) и выраженная дистрофия гепатоцитов. Также обнаруживалось неравномерное полнокровие сосудов, стазы и сладжи. При полуколичественной оценке патологических изменений в печени при введении ЛПС было показано, что более выраженное повреждение гепатоцитов характерно для самок препубертатного возраста (табл. 9.1.2). Введение ЛПС самкам в этот возрастной период также как и у новорожденных животных приводило к увеличению уровня активности АлАТ в сыворотке крови, тогда как показатель активности АсАТ при СВО не отличался от контрольных значений. При СВО по сравнению с

новорожденными самками в препубертатном периоде показатели АлАТ были ниже (табл. 9.1.3). Через сутки после введения высокой дозы ЛПС у половозрелых самок патологические изменения в печени характеризовались очаговыми и ландшафтообразными некрозами, умеренно выраженной дистрофией гепатоцитов, полнокровием сосудов, стазами и сладжами. В печени у 2 самок из 6 наблюдались ландшафтообразные некрозы. Данные морфологического исследования были подтверждены полуколичественной оценкой патологических изменений в печени у половозрелых самок с СВО (табл. 9.1.2). Уровень активности ферментов печени в сыворотке крови у половозрелых самок с СВО был наиболее высоким по сравнению с группами препубертатного периода и новорожденными крысами (табл. 9.1.3).

Таблица 9.1.3

Показатели активности ферментов печени в сыворотке крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самки		**АлАТ, Е/л**	**АсАТ, Е/л**
Новорожденные	Контрольная группа	22,0 (13-41)^{1*}	264 (217-422)^{1}
	СВО	107 (89-222)^{2}	512 (244-685)^{2}
Препубертатный период	Контрольная группа	27 (25-29)^{3}	173 (169-213)^{3}
	СВО	50 (36-60)^{4}	200 (161-366)^{4}
Половозрелые	Контрольная группа	86 (72-97)^{5}	139 (98-166)^{5}
	СВО	736 (96-2141)^{6}	771 (160-2652)^{6}
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}001^{1\text{-}2}$ $0{,}05^{3\text{-}4}$ $0{,}00001^{5\text{-}6}$ $0{,}5^{1\text{-}3}$ $0{,}0008^{1\text{-}5}$ $0{,}001^{3\text{-}5}$ $0{,}05^{2\text{-}4}$ $0{,}00009^{2\text{-}6}$ $0{,}01^{4\text{-}6}$	$0{,}2^{1\text{-}2}$ $0{,}3^{3\text{-}4}$ $0{,}04^{5\text{-}6}$ $0{,}03^{1\text{-}3}$ $0{,}006^{1\text{-}5}$ $0{,}2^{3\text{-}5}$ $0{,}02^{2\text{-}4}$ $0{,}00001^{2\text{-}6}$ $0{,}00003^{4\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

После введения ЛПС в сыворотке крови как у новорожденных самок, так и в период половой зрелости, уровень эндотоксина увеличивался в 30 раз, а содержание кортикостерона не изменялось (табл. 9.1.4). Наиболее выраженное увеличение уровня эндотоксина при СВО по сравнению с группами новорожденных и половозрелых крыс наблюдалось у самок препубертатного периода. По сравнению с контрольной группой его показатель был выше в 165 раз, что сопровождалось снижением содержания кортикостерона в сыворотке крови (табл. 9.1.4).

Таблица 9.1.4

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самки		**Эндотоксин, Ме/мл**	**Кортикостерон, нг/мл**
Новорожденные	Контрольная группа	$1,88^{1*}$ (0,47-3,29)	$4,24^{1}$ (3,88-15,25)
	СВО	$56,99^{2}$ (47,30-90,65)	$15,1^{2}$ (8,16-15,51)
Препубертатный период	Контрольная группа	$2,60^{3}$ (1,26-4,75)	$623,8^{3}$ (494,5-692,5)
	СВО	**430^{4} (417,8-451,25)**	**$231,2^{4}$ (103,1-279,6)**
Половозрелые	Контрольная группа	$0,70^{5}$ (0,53-0,75)	$58,59^{5}$ (31,27-65,49)
	СВО	$22,09^{6}$ (3,63-100)	$33,15^{6}$ (21,78-41,58)
Статистическая значимость различий (p)		$0,00003^{1-2}$ $0,00002^{3-4}$ $0,0001^{5-6}$ $0,2^{1-3}$ $0,02^{1-5}$ $0,2^{3-5}$ $0,004^{2-4}$ $0,0001^{2-6}$ $0,00001^{4-6}$	$0,1^{1-2}$ $0,00009^{3-4}$ $0,03^{5-6}$ $0,00004^{1-3}$ $0,004^{1-5}$ $0,00006^{3-5}$ $0,00001^{2-4}$ $0,00003^{2-6}$ $0,009^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

Морфологические изменения в тимусе у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При введении ЛПС в тимусе у самок всех возрастных групп выявлялась акцидентальная инволюция I-III стадий. При СВО у новорожденных самок наблюдалось развитие акцидентальной инволюции тимуса I-II стадий, сужение коркового вещества (табл. 9.1.5). Анализ числа апоптотически гибнущих клеток тимуса, в том числе и Т-лимфоцитов, не выявил статистически значимых различий между контрольными и опытными группами животных (табл. 9.1.5). Введение ЛПС самкам в препубертатном периоде привело к развитию акцидентальной инволюции более поздних стадий (II-III):

Таблица 9.1.5

Морфометрическая характеристика тимуса самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самки		Объемная доля коркового вещества тимуса, %	Ширина субкапсулярной зоны, мкм	Апоптотическая гибель клеток тимуса, %	
				Все клетки	$CD3^+$-лимфоциты
Новорожденные	Контрольная группа	$74,39^{1*}$ (68,49-75,57)	-	$2,00^{1}$ (1,40-3,10)	$4,90^{1}$ (4,50-8,90)
	СВО	$62,42^{2}$ (44,84-69,50)	-	$3,45^{2}$ (2,50-4,50)	$5,20^{2}$ (3,00-8,10)
Препубертатный период	Контрольная группа	$86,36^{3}$ (86,66-88,82)	$46,52^{3}$ (43,82-47,72)	$15,1^{3}$ (6,1-20,0)	$10,9^{3}$ (3,7-12,0)
	СВО	$74,58^{4}$ (69,14-80,53)	$17,78^{4}$ (7,96-19,15)	$33,1^{4}$ (22,6-53,4)	$13,8^{4}$ (13,2-20,0)
Половозрелые	Контрольная группа	$49,17^{5}$ (47,40-54,00)	$30,66^{5}$ (28,43-31,75)	$1,3^{5}$ (1,1-1,3)	$11,9^{5}$ (9,4-15,2)
	СВО	$32,81^{6}$ (29,41-41,13)	$0,00^{2}$ (0,0-15,6)	$1,4^{6}$ (0,4-1,6)	$9,4^{6}$ (9,3-20,2)
Статистическая значимость различий (p)		$0,01^{1-2}$ $0,006^{3-4}$ $0,003^{5-6}$ $0,02^{1-3}$ $0,0001^{1-5}$ $0,0003^{3-5}$ $0,05^{2-4}$ $0,0001^{2-6}$ $0,00009^{4-6}$	$0,014^{3-4}$ $0,0001^{5-6}$ $0,0008^{3-5}$ $0,7^{4-6}$	$0,17^{1-2}$ $0,04^{3-4}$ $0,8^{5-6}$ $0,0002^{1-3}$ $0,5^{1-5}$ $0,0003^{3-5}$ $0,0004^{2-4}$ $0,002^{2-6}$ $0,00001^{4-6}$	$0,7^{1-2}$ $0,04^{3-4}$ $0,05^{5-6}$ $0,09^{1-3}$ $0,02^{1-5}$ $0,9^{3-5}$ $0,04^{2-4}$ $0,009^{2-6}$ $0,1^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

выявлялась выраженная картина «звездного неба» с резким сужением коркового вещества и субкапсулярной зоны (табл. 9.1.5). СВО у десятидневных самок крыс Вистар сопровождался увеличением числа апоптотически гибнущих клеток, в том числе и $CD3^+$-лимфоцитов (табл. 9.1.5). У половозрелых животных, также как и в препубертатном периоде, введение ЛПС приводило к развитию акцидентальной инволюции тимуса II-III стадий. Наблюдалось сужение коркового вещества тимуса (табл. 5). Число апоптотически гибнущих клеток у крыс обоего пола при СВО не отличалось от соответствующих показателей контрольных групп (табл. 9.1.5).

Морфологические изменения в селезенке у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

На 1-е сут после введения ЛПС в селезенке у новорожденных самок выявлялась гиперплазия белой пульпы, представленной ПАЛМ-зоной (табл. 9.1.6). В препубертатном периоде и у половозрелых самок крыс Вистар при развитии СВО изменений показателей объемной доли белой пульпы выявлено не было (табл. 9.1.6).

Таблица 9.1.6
Морфометрическая характеристика селезенки самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды,
(Me; 25%-75%)

Самки		**Объемная доля белой пульпы, %**
Новорожденные	Контрольная группа	11,0 (9,0-15,0)[1*]
	СВО	28,13 (27,5-29,7)[2]
Препубертатный период	Контрольная группа	11,3 (10,7-14,7)[3]
	СВО	13,0 (10,25-18,0)[4]
Половозрелые	Контрольная группа	38,4 (31,2-41,8)[5]
	СВО	34,6 (29,8-43,4)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}002^{1\text{-}2}$ $0{,}9^{3\text{-}4}$ $0{,}7^{5\text{-}6}$ $0{,}8^{1\text{-}3}$ $0{,}0003^{1\text{-}5}$ $0{,}0003^{3\text{-}5}$ $0{,}005^{2\text{-}4}$ $0{,}04^{2\text{-}6}$ $0{,}00007^{4\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

Содержание TGF-в в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов активированными КонА клетками селезенки у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

Через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови у половзрелых самок крыс Вистар и в препубертатном периоде выявлено снижение содержания TGF-β, обладающего противовоспалительными свойствами (табл. 9.1.7). Тогда как у новорожденных самок значения этого показателя не изменялись (табл. 9.1.7).

Через сутки после введения ЛПС у новорожденных самок наблюдалось снижение уровня продукции клетками селезенки ИЛ-2 и ИФН-γ в 10 раз, ФНО-α в 2 раза, тогда как содержание ИЛ-4 в культуральной жидкости статистически значимо не изменялось (табл. 9.1.7). В препубертатном периоде при развитии СВО определялось снижение уровня продукции только ИЛ-2 и ИЛ-4 в 7 раз, тогда как показатели концентрации ИФН-γ и ФНО-α не различались (табл. 9.1.7). Введение ЛПС половозрелым самкам приводило к снижению уровня продукции ИЛ-4 и ФНО-α, на фоне повышения Тх1-цитокина - ИЛ-2. Уровень продукции ИФН-γ клетками селезенки у половозрелых самок с СВО не изменялся (табл. 9.1.7).

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При СВО у новорожденных самок крыс Вистар число всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов в периферической крови не изменялось (табл. 9.1.8). По сравнению с контрольной группой у десятидневных самок крыс Вистар с СВО было выявлено снижение относительного и абсолютного числа Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов и Т-цитотоксических, незрелых двойных позитивных Т-лимфоцитов ($CD4^+CD8^+$) и регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 9.1.8). В периферической крови у половозрелых самок крыс Вистар через сутки после введения ЛПС наблюдалось повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение – регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 9.1.8). Более выраженное снижение количества Т-лимфоцитов в периферической крови при СВО обнаружено у десятидневных самок, что свидетельствует о выраженной иммуносупрессии.

Таким образом, течение СВО у самок крыс препубертатного периода более тяжелое, чем у новорожденных и половозрелых животных, что сочетается с низким содержанием эстрадиола в сыворотке крови, выраженной эндотоксинемией, наличием интраальвеолярного отека легких и ландшафтообразных некрозов в 100% наблюдений, супрессией иммунного ответа: выраженным апоптозом Т-лимфоцитов и снижением уровня продукции цитокинов клетками селезенки.

Таблица 9.1.7

Содержание TGF-β в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов активированными КонА клетками селезенки у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25%-75%)

Самки		TGF-β, нг/мл	ИЛ-2, пг/мл	ИЛ-4, пг/мл	ИФН-γ, пг/мл	ФНО-α, пг/мл
Новорожденные	Контрольная группа	$18,63^{1*}$ (16,11-20,93)	4403^{1} (2378-6093)	$0,15^{1}$ (0-0,88)	$10,44^{1}$ (2,09-35,48)	$169,65^{1}$ (123,55-255,80)
	СВО	$14,48^{2}$ (15,22-18,17)	$456,25^{2}$ (386,1-617,75)	$0,36^{2}$ (0,05-0,83)	0^{2} (0-0)	$89,80^{2}$ (67,42-128,80)
Препубертатный период	Контрольная группа	$41,29^{3}$ (31,14-52,08)	8000^{3} (6672-8000)	80^{3} (14,3-172,5)	$19,56^{3}$ (15,65-31,30)	$49,91^{3}$ (29,95-63,23)
	СВО	$17,99^{4}$ (13,77-26,57)	$1147,7^{4}$ (50-6138)	$12,06^{4}$ (1,83-54,1)	$14,67^{4}$ (8,80-65,36)	$19,13^{4}$ (0-85,2)
Половозрелые	Контрольная группа	$79,0^{5}$ (63,2-81,9)	4700^{5} (4000-5600)	300^{5} (284-344)	379^{5} (340-426)	453^{5} (308-624)
	СВО	$37,2^{6}$ (17,5-41,0)	5400^{6} (5100-5400)	$86,83^{6}$ (46,04-127,10)	375^{6} (320-422)	173^{6} (136-202)
Статистическая значимость различий (p)		$0,05^{1-2}$ $0,0006^{3-4}$ $0,0004^{5-6}$ $0,00006^{1-3}$ $0,00002^{1-5}$ $0,5^{3-5}$ $0,02^{2-4}$ $0,04^{2-6}$ $0,4^{4-6}$	$0,00007^{1-2}$ $0,0004^{3-4}$ $0,035^{5-6}$ $0,0006^{1-3}$ $0,9^{1-5}$ $0,0003^{3-5}$ $0,17^{2-4}$ $0,00004^{2-6}$ $0,01^{4-6}$	$0,31^{1-2}$ $0,02^{3-4}$ $0,2^{5-6}$ $0,00003^{1-3}$ $0,00002^{1-5}$ $0,03^{3-5}$ $0,009^{2-4}$ $0,00002^{2-6}$ $0,00009^{4-6}$	$0,0002^{1-2}$ $0,2^{3-4}$ $0,7^{5-6}$ $0,03^{1-3}$ $0,00002^{1-5}$ $0,00006^{3-5}$ $0,0006^{2-4}$ $0,00002^{2-6}$ $0,00001^{4-6}$	$0,01^{1-2}$ $0,2^{3-4}$ $0,001^{5-6}$ $0,0005^{1-3}$ $0,00008^{1-5}$ $0,00002^{3-5}$ $0,03^{2-4}$ $0,003^{2-6}$ $0,00001^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

Таблица 9.1.8

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, Med (25%-75%)

Субпопуляция, %	Новорожденные		Препубертатный		Половозрелые		Статистически значимые различия	
	Контрольная	СВО	Контрольная	СВО	Контрольная	СВО		
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$5,9^{1}$ (2,9-7,9)	$4,05^{2}$ (2,85-6,1)	$15,7^{17}$ (13,5-24,1)	$6,8^{18}$ (5,0-11,2)	$43,8^{33}$ (37,2-51,1)	$39,4^{34}$ (30,7-52,7)	$0,0001^{1-17}$ $0,00001^{1-33}$ $0,03^{17-33}$	$0,04^{2-18}$ $0,0001^{2-34}$ $0,004^{18-34}$
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$4,8^{3}$ (2,1-5,6)	$3,45^{4}$ (2,5-5,15)	$12,5^{19}$ (10,9-18,6)	$5,8^{20}$ (3,9-9,7)	$54,7^{35}$ (51,9-64,8)	$65,2^{36}$ (37,6-67,4)	$0,006^{3-19}$ $0,00001^{3-35}$ $0,002^{19-35}$	$0,08^{4-20}$ $0,00001^{4-36}$ $0,009^{20-36}$
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$2,3^{5}$ (1,3-4,7)	$1,75^{6}$ (0,75-3,1)	$4,6^{21}$ (3,8-7,2)	**$1,6^{22}$** (1,2-2,2)	$38,8^{37}$ (30,4-45,0)	$32,55^{38}$ (26,8-46,3)	$0,04^{5-21}$ $0,0008^{5-37}$ $0,005^{21-37}$	$0,7^{6-22}$ $0,00002^{6-38}$ $0,00007^{22-38}$
Двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$)	$2,0^{7}$ (0,7-2,7)	$1,05^{8}$ (0,55-2,35)	$2,0^{23}$ (1,4-2,2)	$0,6^{24}$ (0,4-1,1)	-	-	$0,1^{7-23}$	$0,2^{8-24}$
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$4,0^{9}$ (1,0-5,3)	$7,0^{10}$ (3,75-10,9)	$10,8^{25}$ (7,0-13,1)	$8,9^{26}$ (5,1-11,7)	$20,8^{39}$ (20,0-25,9)	$18,2^{40}$ (15,5-22,4)	$0,01^{9-25}$ $0,0007^{9-39}$ $0,004^{25-39}$	$0,2^{10-26}$ $0,03^{10-40}$ $0,01^{26-40}$
NK-клетки ($CD314^+$)	$0,2^{11}$ (0,1-0,3)	$0,1^{12}$ (0,05-0,2)	$2,8^{27}$ (1,5-6,3)	$2,7^{28}$ (0,65-5,5)	$4,9^{41}$ (3,0-6,1)	$26,3^{42}$ (16,2-52,2)	$0,02^{11-27}$ $0,001^{11-41}$ $0,2^{27-41}$	$0,04^{12-28}$ $0,0005^{12-42}$ $0,0003^{28-42}$
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$1,0^{13}$ (0,5-1,3)	$1,0^{14}$ (0,3-1,4)	$1,9^{29}$ (1,2-4,1)	$2,1^{30}$ (1,0-4,5)	$3,2^{43}$ (2,3-3,7)	$4,1^{44}$ (2,8-5,0)	$0,04^{13-29}$ $0,02^{13-43}$ $0,3^{29-43}$	$0,3^{14-30}$ $0,02^{14-44}$ $0,5^{30-44}$
Т-регуляторные лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$1,2^{15}$ (0,8-3,0)	$0,7^{16}$ (0,5-2,5)	$3,8^{31}$ (1,9-4,3)	$0,9^{32}$ (0,4-2,1)	$3,4^{45}$ (3,2-4,6)	$2,2^{46}$ (1,5-2,7)	$0,1^{15-31}$ $0,04^{15-45}$ $0,5^{31-45}$	$0,1^{16-32}$ $0,04^{16-46}$ $0,5^{32-46}$
Статистически значимые различия, значения	$0,56^{1-2}$ $0,91^{3-4}$ $0,32^{5-6}$ $0,30^{7-8}$	$0,11^{9-10}$ $0,25^{11-12}$ $0,74^{13-14}$ $0,10^{15-16}$	$0,46^{17-18}$ $0,04^{19-20}$ $0,02^{21-22}$ $0,17^{23-24}$	$0,02^{25-26}$ $0,82^{27-28}$ $0,34^{29-30}$ $0,26^{31-32}$	$0,74^{33-34}$ $0,47^{35-36}$ $0,78^{37-38}$ $0,26^{39-40}$	$0,0002^{41-42}$ $0,32^{43-44}$ $0,002^{45-46}$		

Условные обозначения: * - номер группы наблюдений

9.2 Обсуждение

Несмотря на то, что в литературе представлено большое количество работ, в которых показано иммуномодулирующее действие стероидных половых гормонов, в частности эстрадиола (Klein S.L., Roberts C.W., 2010; Klein S.L., 2012), во многих учебниках и руководствах по педиатрии клинические и лабораторные проявления многих инфекционно-воспалительных заболеваний описываются без указания на особенности их течения в зависимости от пола и возраста, тем более от концентрации половых стероидов в сыворотке крови (Kliegman R.M. et al., 2007; Heymann D.L., 2008). Литературные данные о возрастных особенностях течения СВО у лиц женского пола немногочисленны и, в основном, они представлены анализом показателей смертности и частоты встречаемости инфекционно-воспалительных заболеваний (Eshima N. et al., 2012). В опубликованных работах не всегда учитывается возраст. C.C. Cheng et al. (2008) показали, что девочки более устойчивы к аденовирусу, однако периодизацию возраста детей авторы не учитывали. Показано, что максимальная частота встречаемости многих инфекционно-воспалительных заболеваний наблюдается в возрастной период от 2-х до 12-ти лет, и она также зависит от пола: мальчики чаще болеют вирусными заболеваниями, тогда как некоторые бактериальные инфекции, в частности стрептококковый фарингит, девочки переносят тяжелее (Eshima N. et al., 2012). Недостаточная изученность течения инфекционно-воспалительных заболеваний и, в частности, самого тяжелого из них – сепсиса, в зависимости от возраста и пола во многом препятствуют проведению их эффективного лечения.

С целью моделирования СВО крысам трех возрастных групп внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 15 мг/кг. СВО во всех возрастных периодах характеризовался эндотоксинемией, развитием воспалительной реакции в легких с увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, альтеративными изменениями в печени разной степени выраженности, а также изменениями продукции клетками селезенки провоспалительных, противовоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

Через сутки после введения ЛПС минимальные изменения в органах-мишенях – печени и легких, были выявлены у новорожденных самок. В легких в 50% случаев обнаруживали интраальвеолярный отек, а в печени – дистрофические изменения гепатоцитов на фоне увеличения уровня активности АлАТ в сыворотке крови. Период новорожденности характеризуется незрелой иммунной системой, о чем свидетельствует низкий уровень продукция ИЛ-4 и ИФН-γ, а также в этом возрасте выявляется высокое содержание эстрадиола, что согласуется с данными литературы. A.T. Konkle и M.M. McCarthy (2011) было показано, что у новорожденных крыс Спрейг-Доули в сыворотке крови высокое содержание эстрадиола, которое имеет материнское происхождение, а затем его уровень постепенно снижается. Также в сыворотке крови у новорожденных самок была выявлена сравнительно низкая концентрация

кортикостерона, что согласуется с данными литературы (Dallman M., 2000; Sullivan R.M., Holman P.J., 2010). Известно, что эстрадиол в физиологических концентрациях оказывает иммуномодулирующее действие, а кортикостерон, напротив, иммуносупрессорное (Karpuzoglu E. et al., 2007; Pernis A.B., 2007). По-видимому, поэтому, несмотря на незрелую иммунную систему, у новорожденных самок в культуре клеток селезенки уровень продукции ИЛ-2 и ФНО-α высокий, а через сутки после введения ЛПС у них наблюдаются минимальные изменения в органах-мишенях, что сочетается со снижением уровня продукции ИЛ-2, ФНО-α и ИФН-γ.

Нами показано, что при СВО у новорожденных самок наблюдается повышение уровня эндотоксина, тогда как содержание кортикостерона в сыворотке крови не изменяется. Уровень эндогенного эндотоксина в крови зависит от количества грамотрицательных бактерий, колонизирующих толстую кишку, а также от интенсивности его клиренса моноцитами, гранулоцитами, связывания с липопротеинами и плазменными белками, нейтрализации анти-эндотоксиновыми антителами и процессами детоксикации клетками печени (Adkins B. et al., 2006; Arrieta M.C. et al. 2014). В период новорожденности клиренс эндотоксина осуществляется преимущественно анти-эндотоксиновыми антителами, поступающими с молоком матери, так как системы его детекции и элиминации еще незрелые. Высокий уровень эндотоксина и минимальные альтеративные изменения в печени и легких можно объяснить низким уровнем экспрессии TLR4 рецепторов на клетках Купфера у новорожденных крыс (Gabehart K. et al., 2015).

СВО у новорожденных самок характеризовался развитием акцидентальной инволюции I-II стадии и гиперплазией белой пульпы селезенки, что, очевидно, вызвано антигенным действием эндотоксина. Через сутки после введения ЛПС в периферической крови у новорожденных самок не было обнаружено изменения количества субпопуляций лимфоцитов, что, по-видимому, связано с функциональной незрелостью иммунной системы. По данным литературы новорожденные дети более подвержены риску возникновения и развития ССВО, так как у них наблюдается физиологическое иммунодефицитное состояние (Carcillo J.A., 2003; Wynn J. et al., 2010). По сравнению со взрослыми людьми «незрелая» иммунная система новорожденных характеризуется низкой активностью Т-цитотоксических и повышенной – Т-регуляторных лимфоцитов, низким уровнем продукции цитокинов, преимущественной поляризацией иммунного ответа по Т-хелпер 2 типу (Adkins B. et al., 2004; Levy O., 2007). По-видимому, невыраженные воспалительные реакции в ответ на введение ЛПС новорожденным самкам также объясняются низкой функциональной активностью иммунной системы.

Наиболее выраженные воспалительные изменения, характерные для СВО, выявлены в препубертатном периоде, который по сравнению с новорожденными самками характеризуется низким содержанием эстрадиола в сыворотке крови на фоне интенсивных процессов созревания

иммунной системы с увеличением уровня продукции ИЛ-2 и ИЛ-4. В этот период у самок выявляется высокая концентрация кортикостерона, что согласуется с данными S. Moriceau et al. (2004) и С.А. Ляликова и соавт. (1996), которые показали, что у детей в возрасте от 2 до 18 лет наблюдается максимальное содержание кортизола по сравнению с новорожденными и лицами репродуктивного возраста.

Через сутки после введения ЛПС у десятидневных самок наблюдалось максимальное увеличение эндотоксина в сыворотке крови по сравнению с другими возрастными периодами. По данным литературы с возрастом изменяется количество и состав микрофлоры, колонизирующей кишечник (Adkins B. et al., 2004; Arrieta M.C. et al., 2014), что сопровождается повышением интенсивности клиренса и нейтрализации эндотоксина, тогда как собственный анти-эндотоксиновый иммунитет у крыс в препубертатном периоде окончательно не сформирован, а концентрация антител в молоке матери к этому периоду снижается (German J.B. et al., 2002). На фоне выраженной эндотоксинемии у крыс препубертатного периода наблюдается снижение содержания кортикостерона и прогестерона и повышение эстрадиола. Изменения гормонального профиля могут быть связаны с нарушениями метаболизма стероидных половых гормонов поврежденными при СВО клетками печени. Так нами показано, что по сравнению с другими возрастными периодами у десятидневных самок с СВО в печени выявлялись наиболее выраженные альтеративные изменения гепатоцитов: очаговые и ландшафтообразные некрозы определялись у 70% самок.

По сравнению с новорожденными развитие СВО у десятидневных крыс Вистар сопровождалось акцидентальной инволюцией тимуса более поздних стадий с наличием выраженной картины «звездного неба» и сужением коркового вещества, увеличением числа апоптотически гибнущих клеток, в том числе и $CD3^+$-лимфоцитов, что сочеталось со снижением уровня продукция ИЛ-2 и ИЛ-4, тогда как концентрация ИФН-γ и ФНО-α не изменялась, что свидетельствует о супрессии иммунного ответа по Тх1 и Тх2 типу. Анализ количества субпопуляций лимфоцитов в периферической крови показал выраженное снижение Т-лимфоцитов, в частности хелперов, цитотоксических, двойных позитивных и регуляторных клеток, что доказывает подавление развития иммунного ответа у самок препубертатного периода через сутки после введения ЛПС. По данным литературы, иммунный ответ у мышей препубертатного периода при развитии абдоминального сепсиса не выражен, что, по-видимому, связано со сниженной экспрессией генов, ответственных за пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку числа Т-лимфоцитов, развитие и созревание клеток крови и лейкоцитов (Gentile L.F. et al. 2014). Показано, что по сравнению с новорожденными и взрослыми людьми дети в препубертатном возрасте характеризуются низким уровнем экспрессии селектинов и хемокинов, уровень которых у них при сепсисе резко возрастает, усиливая миграцию лейкоцитов

в очаг воспаления (Zonneveld R. et al., 2014). Показано, что у здоровых мышей в возрасте 5-7 дней снижен уровень экспрессии генов, ответственных за развитие адаптивного иммунитета (*Mhc II, Cd40, Btla*) и воспаления (*Il1β, Arg2*). В этот возрастной период активирована экспрессия генов, участвующих в пролиферации и дифференцировке лимфоцитов – *Rag1* и *Rag2*, что, в целом, свидетельствует о функциональном созревании иммунной системы у мышей препубертатного периода (Gentile L.F. et al., 2014).

По сравнению с группами новорожденных и десятидневных самок СВО у половозрелых крыс сопровождался выраженной воспалительной реакцией в легких, что характеризовалось высоким числом нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. По данным литературы процессы хемотаксиса наиболее выражены у животных репродуктивного возраста, что характеризуется высоким уровнем экспрессии хемокинов CXCR2, ICAM-1 и G-CSF по сравнению с другими возрастными группами (Brubaker A.L. et al., 2013).

Содержание стероидных половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок при СВО не изменялось по сравнению с контрольной группой, что, возможно, связано со сниженным метаболизмом половых стероидов поврежденными эндотоксином гепатоцитами, а также угнетенным синтезом эстрадиола в яичниках (Shimizu T. et al., 2012). По сравнению с препубертатными животными эндотоксинемия у половозрелых самок с СВО была менее выражена, что, по-видимому, связано с активацией продукции анти-эндооксиновых антител, а также более эффективными процессами детекции и элиминации эндотоксина в печени по сравнению с более ранними периодами постнатального онтогенеза.

В периоде половой зрелости, также как и в препубертатном, введение ЛПС приводило к развитию акцидентальной инволюции тимуса II-III стадий, наблюдалось сужение коркового вещества тимуса, однако число апоптотически гибнущих клеток не изменялось. В селезенке половозрелых самок с СВО не было выявлено изменения объемной доли белой пульпы, однако наблюдалась активация В-зоны: расширение герминативных центров и сужение маргинальной зоны лимфоидных узелков. На фоне высокого уровня эстрадиола в сыворотке крови у половозрелых самок в ответ на введение ЛПС наблюдалась поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу, о чем свидетельствовал низкий уровень продукции ИЛ-4, и высокий – ИЛ-2 и ИФН-γ, что сопровождалось снижением содержания провоспалительного цитокина – ФНО-α. В периферической крови у половозрелых самок с СВО было выявлено повышение числа NK-клеток, что отражает активацию врожденного звена иммунного ответа, и снижение количества Т-регуляторных клеток, что характеризует супрессию противовоспалительного иммунного ответа.

Таким образом, течение СВО у самок крыс препубертатного периода по сравнению с новорожденными и половозрелыми крысами Вистар наиболее тяжелое, что сочетается с низким

содержанием эстрадиола в сыворотке крови и выраженной супрессией иммунного ответа, характеризующейся снижением продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН-γ, ФНО-α, числа Т-лимфоцитов в периферической крови, а также выраженным апоптозом клеток тимуса.

9.3 Возрастные особенности морфологических и иммунологических изменений при системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар

Изменение содержания половых гормонов в сыворотке крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При СВО концентрация тестостерона в сыворотке крови увеличивалась только у самцов препубертатного периода, а в другие возрастные периоды – не изменялась (табл. 9.3.1). После введения ЛПС концентрация эстрадиола у двухдневных самцов снижалась, в препубертатный период по сравнению с соответствующей возрастной контрольной группой повышалась, а у половозрелых крыс Вистар статистически значимо не изменялась (табл. 9.3.1). При СВО во всех возрастных периодах содержание прогестерона в сыворотке крови статистически значимо не изменялось (табл. 9.3.1).

Морфологические изменения в легких у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При СВО во всех возрастных группах самцов крыс Вистар выявлялись патологические изменения в легких, которые характеризовались увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках и интраальвеолярным отеком разной степени выраженности и распространенности. При морфологическом исследовании отек легких был выявлен у 5 из 9 (56%) новорожденных, у 8 из 10 (80%) десятидневных и 4 из 8 (50%) половозрелых крыс. По данным количественной оценки числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках на 1-е сут СВО статистически значимых различий между группой новорожденных и крыс препубертатного возраста выявлено не было. По сравнению с другими возрастными группами после введения ЛПС у половозрелых крыс количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было максимальным (табл. 10).

Таблица 9.3.1

Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самцы		Тестостерон, нг/мл	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нг/мл
Новорожденные	Контрольная группа	$0,29^{1*}$ (0,14-3,28)	$22,22^{1}$ (20,16-24,57)	$0,77^{1}$ (0,73-0,80)
	СВО	$1,68^{2}$ (1,45-2,11)	$8,44^{2}$ (6,65-21,47)	$0,54^{2}$ (0,32-0,79)
Препубертатный период	Контрольная группа	$0,42^{3}$ (0,33-0,65)	$20,77^{3}$ (16,75-22,24)	$10,58^{3}$ (5,70-12,26)
	СВО	**$0,84^{4}$ (0,60-1,10)**	**$35,02^{4}$ (32,12-38,16)**	$10,28^{4}$ (3,09-15,72)
Половозрелые	Контрольная группа	$1,29^{5}$ (1,19-1,48)	$24,59^{5}$ (20,35-29,34)	$4,49^{5}$ (4,21-6,12)
	СВО	$1,61^{6}$ (0,42-2,92)	$19,79^{6}$ (16,41-30,43)	$3,83^{6}$ (3,25-4,30)
Статистическая значимость различий (p)		$0,3^{1-2}$ $0,02^{3-4}$ $0,7^{5-6}$ $0,4^{1-3}$ $0,5^{1-5}$ $0,002^{3-5}$ $0,1^{2-4}$ $0,7^{2-6}$ $0,6^{4-6}$	$0,003^{1-2}$ $0,008^{3-4}$ $0,6^{5-6}$ $0,5^{1-3}$ $0,6^{1-5}$ $0,2^{3-5}$ $0,003^{2-4}$ $0,04^{2-6}$ $0,01^{4-6}$	$0,7^{1-2}$ $0,9^{3-4}$ $0,04^{5-6}$ $0,0007^{1-3}$ $0,02^{1-5}$ $0,04^{3-5}$ $0,003^{2-4}$ $0,002^{2-6}$ $0,3^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения в печени у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

После введения ЛПС в печени у животных всех исследуемых возрастных групп выявлены патологические изменения, варьирующие от слабо выраженных дистрофических изменений гепатоцитов до обширных ландшафтообразных некрозов. Наиболее выраженные патологические изменения гепатоцитов наблюдались при СВО у крыс препубертатного возраста (табл. 9.3.2). В другие возрастные периоды дистрофические изменения в печени были менее выражены, и некрозы выявлялись реже по сравнению с крысами препубертатного периода.

Таблица 9.3.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и показатель патологических изменений в печени у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самцы		Число нейтрофилов, абс. число	Показатель патологических изменений в печени, усл. ед.
Новорожденные	Контрольная группа	1,90 (1,50-2,30)[1*]	0,25 (0,00-0,50)[1]
	СВО	11,80 (11,00-12,80)[2]	2,00 (1,00-2,00)[2]
Препубертатный период	Контрольная группа	2,10 (2,10-2,50)[3]	0,50 (0,00-1,00)[3]
	СВО	12,20 (10,80-14,30)[4]	4,00 (4,00-5,00)[4]
Половозрелые	Контрольная группа	2,55 (1,95-4,05)[5]	1,00 (0,50-1,50)[5]
	СВО	27,83 (24,00-32,60)[6]	3,50 (2,00-4,00)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0{,}009^{1\text{-}2}$ $0{,}04^{3\text{-}4}$ $0{,}005^{5\text{-}6}$ $0{,}4^{1\text{-}3}$ $0{,}3^{1\text{-}5}$ $0{,}6^{3\text{-}5}$ $0{,}9^{2\text{-}4}$ $0{,}0004^{2\text{-}6}$ $0{,}0009^{4\text{-}6}$	$0{,}005^{1\text{-}2}$ $0{,}0006^{3\text{-}4}$ $0{,}001^{5\text{-}6}$ $0{,}3^{1\text{-}3}$ $0{,}08^{1\text{-}5}$ $0{,}1^{3\text{-}5}$ $0{,}0003^{2\text{-}4}$ $0{,}02^{2\text{-}6}$ $0{,}005^{4\text{-}6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Исследование активности ферментов печени в норме показало, что с возрастом снижается уровень активности АсАТ, а АлАТ статистически значимо не изменяется (табл. 9.3.3). После введения ЛПС уровень активности АлАТ и АсАТ повышался в сыворотке крови у крыс препубертатного и половозрелого периода, а у новорожденных не отличался от значений контрольной группы (табл. 9.3.3).

Таблица 9.3.3

Показатели активности ферментов печени в сыворотке крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самцы		АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л
Новорожденные	Контрольная группа	50,50 (29-74)[1*]	197 (132,5-371,5)[1]
	СВО	102 (52-174)[2]	294 (179-343)[2]
Препубертатный период	Контрольная группа	31 (19-31)[3]	143 (73-167)[3]
	СВО	**154 (75-180)[4]**	**529 (398-660)[4]**
Половозрелые	Контрольная группа	78 (69-87)[5]	103 (100-119)[5]
	СВО	297 (145-398)[6]	425 (188–604)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,1^{1-2}$ $0,02^{3-4}$ $0,02^{5-6}$ $0,5^{1-3}$ $0,3^{1-5}$ $0,21^{3-5}$ $0,5^{2-4}$ $0,2^{2-6}$ $0,003^{4-6}$	$0,3^{1-2}$ $0,02^{3-4}$ $0,01^{5-6}$ $0,8^{1-3}$ $0,002^{1-5}$ $0,003^{3-5}$ $0,05^{2-4}$ $0,2^{2-6}$ $0, 4^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

В норме уровень эндогенного эндотоксина в сыворотке крови увеличивался от двухдневного возраста к препубертатному периоду (табл. 9.3.4). При СВО на 1-е сут после введения ЛПС содержание эндотоксина у крыс всех трех исследованных возрастных групп было статистически значимо выше по сравнению с соответствующими контрольными группами. Однако в отличие от новорожденных более выраженное повышение эндотоксина наблюдалось у крыс препубертатного и половозрелого периодов постнатального развития (табл. 9.3.4).

При СВО содержание кортикостерона повышалось только у крыс препубертатного возраста. У половозрелых самцов наблюдалось снижение этого показателя на 1-е сут после введения ЛПС, тогда как у новорожденных крыс Вистар содержание кортикостерона статистически значимо не изменялось (табл. 9.3.4).

Таблица 9.3.4

Уровень эндотоксина и содержание кортикостерона в сыворотке крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25-75%)

Самцы		Эндотоксин, Ме/мл	Кортикостерон, нг/мл
Новорожденные	Контрольная группа	0,47 (0,12-2,58)[1*]	7,45 (1,24-11,78)[1]
	СВО	33,53 (29,66-44,31)[2]	12,17 (7,30-15,94)[2]
Препубертатный период	Контрольная группа	2,25 (0,67-3,75)[3]	97,15 (57,89-214,65)[3]
	СВО	**136,54 (42,24-215)[4]**	**244,8 (181,18-462,48)[4]**
Половозрелые	Контрольная группа	0,5 (0,48-0,66)[5]	25,54 (21,20-30,94)[5]
	СВО	110 (105-125)[6]	18,76 (12,02-20,34)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,0002^{1-2}$ $0,00008^{3-4}$ $0,004^{5-6}$ $0,06^{1-3}$ $0,4^{1-5}$ $0,08^{3-5}$ $0,0008^{2-4}$ $0,0002^{2-6}$ $0,3^{4-6}$	$0,1^{1-2}$ $0,02^{3-4}$ $0,02^{5-6}$ $0,0002^{1-3}$ $0,006^{1-5}$ $0,003^{3-5}$ $0,0004^{2-4}$ $0,1^{2-6}$ $0,00008^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения в тимусе у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При морфологическом исследовании тимуса у новорожденных самцов крыс Вистар с СВО выявлена слабо выраженная акцидентальная инволюция, которая не приводила к изменению объемной доли коркового вещества (табл. 9.3.5). Анализ числа апоптотически гибнущих клеток, в том числе и Т-лимфоцитов, не выявил статистически значимых различий между контрольными и опытными группами новорожденных животных (табл. 9.3.5). Введение ЛПС самцам в препубертатном периоде привело к развитию акцидентальной инволюции более поздних стадий (II-III): наблюдалась яркая картина «звездного неба», сужение коркового вещества тимуса, увеличение числа апоптотически гибнущих клеток, в том числе и $CD3^+$-лимфоцитов, однако не было обнаружено изменения ширины субкапсулярной зоны (табл. 9.3.5). В периоде половой зрелости акцидентальная инволюция тимуса была также выражена, как и у десятидневных самцов, что сочеталось с сужением коркового вещества тимуса и резким уменьшением ширины субкапсулярной зоны (табл. 9.3.5). Однако число апоптотически гибнущих клеток у половозрелых самцов с СВО не отличалось от соответствующих показателей контрольных групп (табл. 9.3.5).

Таблица 9.3.5

Морфометрическая характеристика тимуса крыс Вистар у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25%-75%)

Самцы		Объемная доля коркового вещества тимуса, %	Ширина субкапсулярной зоны, мкм	Апоптотическая гибель клеток тимуса, %	
				Все клетки	$CD3^+$-лимфоциты
Новорожденные	Контрольная группа	$62,75^{1*}$ (55,67-69,04)	-	$2,15^{1}$ (1,50-2,60)	$6,10^{1}$ (5,80-9,80)
	СВО	$58,64^{2}$ (57,24-63,08)	-	$3,45^{2}$ (1,95-8,70)	$7,25^{2}$ (4,50-8,85)
Препубертатный период	Контрольная группа	$81,62^{3}$ (80,65-86,15)	$40,60^{3}$ (38,51-41,84)	$\mathbf{5,0^{3}}$ (4,7-6,8)	$6,3^{3}$ (3,3-11,0)
	СВО	$76,78^{4}$ (71,43-80,25)	$41,40^{4}$ (37,74-42,16)	$\mathbf{27,9^{4}}$ (16,1-38,8)	$\mathbf{17,9^{4}}$ (14-19,9)
Половозрелые	Контрольная группа	$55,19^{5}$ (50,80-57,59)	$25,75^{5}$ (21,58-29,16)	$\mathbf{0,4^{5}}$ (0,1-1,0)	$11,8^{5}$ (4,4-13,4)
	СВО	$46,25^{6}$ (39,37-53,30)	$0,00^{6}$ (0,0-0,0)	$1,5^{6}$ (0,9-2,3)	$10,5^{6}$ (10,2-13,9)
Статистическая значимость различий (p)		$0,4^{1-2}$ $0,003^{3-4}$ $0,002^{5-6}$ $0,01^{1-3}$ $0,04^{1-5}$ $0,001^{3-5}$ $0,02^{2-4}$ $0,03^{2-6}$ $0,01^{4-6}$	$0,6^{3-4}$ $0,0001^{5-6}$ $0,03^{3-5}$ $0,000007^{4-6}$	$0,3^{1-2}$ $0,001^{3-4}$ $0,04^{5-6}$ $0,0003^{1-3}$ $0,005^{1-5}$ $0,0004^{3-5}$ $0,002^{2-4}$ $0,7^{2-6}$ $0,00004^{4-6}$	$0,7^{1-2}$ $0,03^{3-4}$ $0,9^{5-6}$ $0,8^{1-3}$ $0,4^{1-5}$ $0,9^{3-5}$ $0,02^{2-4}$ $0,04^{2-6}$ $0,04^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Морфологические изменения в селезенке у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

По сравнению с группами десятидневных и половозрелых самцов на 1-е сут после введения ЛПС в селезенке у новорожденных крыс выявлялась гиперплазия белой пульпы, которая у них была представлена ПАЛМ-зоной (табл. 9.3.6). В препубертатном периоде и у половозрелых крыс Вистар при развитии СВО изменений показателей объемной доли белой пульпы выявлено не было (табл. 9.3.6).

Таблица 9.3.6

Морфометрическая характеристика селезенки самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25%-75%)

Самцы		**Объемная доля белой пульпы, %**
Новорожденные	Контрольная группа	11,75 (10,35-13,15)[1*]
	СВО	35,94 (32,22-39,60)[2]
Препубертатный период	Контрольная группа	13,00 (10,7-14,0)[3]
	СВО	13,70 (12,00-15,70)[4]
Половозрелые	Контрольная группа	29,0 (27,4-34,2)[5]
	СВО	29,2 (25,7-33,6)[6]
Статистическая значимость различий (p)		$0,002^{1-2}$ $0,5^{3-4}$ $0,7^{5-6}$ $0,9^{1-3}$ $0,0002^{1-5}$ $0,0002^{3-5}$ $0,0004^{2-4}$ $0,05^{2-6}$ $0,00004^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Содержание TGF-в в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов активированными КонА клетками селезенки у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

Через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови у десятидневных и половозрелых самцов крыс Вистар снижалось содержание TGF-β, тогда как у новорожденных его концентрация не изменялась (табл. 9.3.7). После введения ЛПС у новорожденных самцов наблюдалось увеличение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО-α, тогда как концентрация ИФН-γ не изменялась. При СВО у крыс препубертатного периода выявлено снижение продукции и секреции ИЛ-2 и ФНО-α, а у половозрелых также уменьшение ИЛ-4 и ИФН-γ (табл. 9.3.7).

Таблица 9.3.7

Содержание TGF-β в сыворотке крови и уровень продукции цитокинов активированными КонА клетками селезенки у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25%-75%)

Самцы		TGF-β, нг/мл	ИЛ-2, пг/мл	ИЛ-4, пг/мл	ИФН-γ, пг/мл	ФНО-α, пг/мл
Новорожденные	Контрольная группа	$18,86^{1*}$ (16,80-27,12)	$141,70^{1}$ (124,60-158,75)	$0,04^{1}$ (0,01-0,31)	$0,87^{1}$ (0,30-10,87)	$10,79^{1}$ (1,34-13,48)
	СВО	$17,02^{2}$ (15,23-18,17)	$474,40^{2}$ (426,10-826,15)	$0,31^{2}$ (0-0,62)	0^{2} (0-0)	$51,23^{2}$ (41,80-70,11)
Препубертатный период	Контрольная группа	$57,29^{3}$ (45,01-63,49)	3214^{3} (1136-3620)	$15,61^{3}$ (12,56-51,21)	$9,78^{3}$ (5,87-219,87)	$149,2^{3}$ (69,88-281,8)
	СВО	$20,85^{4}$ (17,44-31,32)	460^{4} (0-1034)	$8,76^{4}$ (3,48-14,3)	$9,78^{4}$ (6,85-21,9)	$53,24^{4}$ (42,84-68,22)
Половозрелые	Контрольная группа	$50,8^{5}$ (43,0-64,0)	3107^{5} (2199-5200)	252^{5} (220-356)	$421,9^{5}$ (359,4-1164,2)	$386,7^{5}$ (221,0-417,5)
	СВО	$20,2^{6}$ (19,3-29,4)	2094^{6} (1313-2270)	$17,76^{6}$ (16,47-17,86)	$281,3^{6}$ (206,5-320,3)	$100,8^{6}$ (56,5-156,0)
Статистическая значимость различий (p)		$0,09^{1-2}$ $0,01^{3-4}$ $0,009^{5-6}$ $0,005^{1-3}$ $0,005^{1-5}$ $0,8^{3-5}$ $0,4^{2-4}$ $0,5^{2-6}$ $0,8^{4-6}$	$0,006^{1-2}$ $0,003^{3-4}$ $0,04^{5-6}$ $0,00001^{1-3}$ $0,00001^{1-5}$ $0,6^{3-5}$ $0,7^{2-4}$ $0,04^{2-6}$ $0,03^{4-6}$	$0,3^{1-2}$ $0,03^{3-4}$ $0,04^{5-6}$ $0,00002^{1-3}$ $0,00001^{1-5}$ $0,00003^{3-5}$ $0,001^{2-4}$ $0,00001^{2-6}$ $0,03^{4-6}$	$0,9^{1-2}$ $0,4^{3-4}$ $0,04^{5-6}$ $0,3^{1-3}$ $0,00001^{1-5}$ $0,004^{3-5}$ $0,0001^{2-4}$ $0,000001^{2-6}$ $0,00002^{4-6}$	$0,007^{1-2}$ $0,01^{3-4}$ $0,02^{5-6}$ $0,0004^{1-3}$ $0,00001^{1-5}$ $0,05^{3-5}$ $0,6^{2-4}$ $0,3^{2-6}$ $0,1^{4-6}$

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды

При СВО у новорожденных самцов крыс Вистар статистически значимых различий числа всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов не было выявлено (табл. 9.3.8). На 1-е сут развития СВО у десятидневных самцов обнаружено снижение числа Т-цитотоксических и В-лимфоцитов (табл. 9.3.8). При развитии СВО у половозрелых самцов в периферической крови выявлено повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток и снижение – Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических и регуляторных (табл. 9.3.8).

9.4 Обсуждение

С целью моделирования СВО самцам трех возрастных групп внутрибрюшинно вводили ЛПС. СВО во всех возрастных периодах у самцов, также как и у самок, характеризовался эндотоксинемией, развитием воспалительной реакции в легких с увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, альтеративными процессами в печени разной степени выраженности, а также изменениями продукции клетками селезенки провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

Нами показано, что течение СВО, также как и у самок, наиболее выражено у самцов препубертатного периода – у них выявлены тяжелые патологические изменения в печени, повышение уровня активности АлАТ и АсАТ, эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови, а также выраженная супрессия иммунного ответа, характеризующаяся подавлением продукции всех исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов, повышением содержания апоптотически гибнущих тимоцитов, и выраженным снижением числа Т-лимфоцитов в периферической крови. В отличие от других возрастных периодов у десятидневных самцов крыс Вистар развитие СВО сопровождалось повышением концентрации кортикостерона, тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови.

По данным литературы в раннем препубертатном периоде (возраст 3-6 лет) на фоне низкого содержания мужских половых стероидов у мальчиков чаще, чем в другие возрастные периоды, диагностируются вторичные иммунодефицитные состояния (Ляликов С.А. и соавт., 1996), наблюдается пик заболеваемости и смертности от инфекционно-воспалительных заболеваний, в частности, туберкулеза, гриппа, полиомиелита, эпидемического паротита, кори, ветряной оспы (Ahmed R. et al., 2007).

Таблица 9.3.8

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС в разные возрастные периоды, (Me; 25%-75%)

Субпопуляция, %	Новорожденные		Препубертатный		Половозрелые		Статистически значимые различия	
	Контрольная	СВО	Контрольная	СВО	Контрольная	СВО		
Т-лимфоциты ($CD3^+$)	$4,15^{1}$ (1,55-6,85)	$2,8^{2}$ (1,8-6,7)	$25,5^{17}$ (12,2-37,4)	$15,9^{18}$ (14,4-18,8)	$43,5^{33}$ (42,1-45,0)	**$23,2^{34}$** (18,0-29,0)	$0,01^{1-17}$ $0,001^{1-33}$ $0,04^{17-33}$	$0,02^{2-18}$ $0,01^{2-34}$ $0,04^{18-34}$
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$)	$3,25^{3}$ (1,30-5,35)	$2,4^{4}$ (1,4-5,9)	$17,9^{19}$ (8,9-28,7)	$12,8^{20}$ (12,3-15,7)	$55,6^{35}$ (48,7-57,4)	$70,2^{36}$ (60,5-73,0)	$0,005^{3-19}$ $0,001^{3-35}$ $0,03^{19-35}$	$0,003^{4-20}$ $0,002^{4-36}$ $0,0001^{20-36}$
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8a^+$)	$1,7^{5}$ (0,55-3,5)	$1,0^{6}$ (0,4-2,7)	$8,7^{21}$ (4,6-9,8)	**$3,7^{22}$** (3,6-4,7)	$42,6^{37}$ (39,2-44,3)	**$28,6^{38}$** (26,4-29,5)	$0,01^{5-21}$ $0,0001^{5-37}$ $0,004^{21-37}$	$0,03^{6-22}$ $0,00001^{6-38}$ $0,00001^{22-38}$
Двойные позитивные лимфоциты ($CD4^+CD8^+$)	$0,9^{7}$ (0,4-1,95)	$0,7^{8}$ (0,3-1,8)	$1,5^{23}$ (1,2-2,3)	$1,2^{24}$ (1,2-1,2)	-	-	$0,2^{7-23}$	$0,2^{8-24}$
В-лимфоциты ($CD45^+$)	$1,4^{9}$ (1,0-1,8)	$4,2^{10}$ (1,5-9,5)	$12,3^{25}$ (8,5-18,2)	**$1,9^{26}$** (1,8-7,5)	$21,3^{39}$ (20,1-24,8)	$16,2^{40}$ (13,0-24,8)	$0,008^{9-25}$ $0,0006^{9-39}$ $0,04^{25-39}$	$0,4^{10-26}$ $0,02^{10-40}$ $0,02^{26-40}$
NK-клетки ($CD314^+$)	$0,1^{11}$ (0-0,1)	$0,15^{12}$ (0,1-0,25)	$1,2^{27}$ (0,4-1,7)	$0,6^{28}$ (0,6-1,5)	$5,55^{41}$ (2,9-9,6)	**$28,3^{42}$** (21,0-38,7)	$0,01^{11-27}$ $0,01^{11-41}$ $0,02^{27-41}$	$0,03^{12-28}$ $0,0001^{12-42}$ $0,0001^{28-42}$
Активированные Т-хелперы ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$)	$0,45^{13}$ (0,1-2,1)	$1,1^{14}$ (0,9-2,1)	$1,9^{29}$ (1,2-4,8)	$5,2^{30}$ (1,9-9,7)	$3,3^{43}$ (3,0-3,8)	$2,6^{44}$ (2,1-3,1)	$0,4^{13-29}$ $0,04^{13-43}$ $0,4^{29-43}$	$0,3^{14-30}$ $0,04^{14-44}$ $0,6^{30-44}$
Т-регуляторные лимфоциты ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)	$0,6^{15}$ (0,1-2,7)	$3,0^{16}$ (2,5-3,8)	$2,6^{31}$ (1,5-3,8)	$1,8^{32}$ (1,0-3,0)	$3,8^{45}$ (3,1-4,7)	**$2,4^{46}$** (1,4-3,2)	$0,4^{15-31}$ $0,04^{15-45}$ $0,5^{31-45}$	$0,1^{16-32}$ $0,5^{16-46}$ $0,6^{32-46}$
Статистически значимые различия, значения	$0,6^{1-2}$ $0,1^{3-4}$ $0,2^{5-6}$ $0,7^{7-8}$	$0,1^{9-10}$ $0,5^{11-12}$ $0,4^{13-14}$ $0,05^{15-16}$	$0,4^{17-18}$ $0,6^{19-20}$ $0,03^{21-22}$ $0,7^{23-24}$	$0,03^{25-26}$ $0,2^{27-28}$ $0,4^{29-30}$ $0,6^{31-32}$	$0,05^{33-34}$ $0,001^{35-36}$ $0,0005^{37-38}$ $0,05^{39-40}$	$0,0001^{41-42}$ $0,3^{43-44}$ $0,04^{45-46}$		

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

P.R. Carvalho и соавт. (2005), как и J. Pavare и соавт. (2009) оценивали у пациентов педиатрических клиник частоту встречаемости ССВО и установили, что большинство пациентов были дети в возрасте 2-5 лет, а на втором месте оказались новорожденные. В экспериментальных исследованиях J.L. Wynn и соавт. (2007) было показано, что выраженность проявления СВО и показатели смертности при экспериментальном перитоните были выше у мышей в возрасте 5-7 дней, по сравнению с особями 7-10 недельного возрастного периода постнатального онтогенеза, что согласуется с полученными нами данными.

Через сутки после введения ЛПС отек легких чаще встречался у десятидневных самцов (80%) по сравнению с новорожденными и половозрелыми крысами, у которых интраальвеолярный отек выявлялся в 50-56% наблюдений. По данным патологоанатомических исследований показано, что у детей в развитии патологических реакций преобладает экссудативный компонент воспаления (Ивановская Т.Е., Гусман Б.С., 1981; Серов В.В., Пауков В.С., 1995). При развитии СВО выраженность воспалительных изменений в легких у новорожденных и крыс препубертатного возраста не различалась. По сравнению с этими возрастными группами после введения ЛПС у половозрелых крыс количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было максимальным. Миграция нейтрофилов и их активация – основные механизмы, ответственные за развитие острого воспаления, в том числе острого респираторного дистресс синдрома (Kruger P. et al., 2015). Период половой зрелости мужчин и лабораторных животных характеризуется максимальным содержанием мужских половых стероидов, функциональной зрелостью иммунной системы, сбалансированным уровнем продукции Тх1/Тх2-цитокинов (Симонова Е.Ю. и соавт., 2014; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Видимо, функциональная зрелость иммунной системы у половозрелых самцов обеспечивает развитие эффективных механизмов миграции и активации нейтрофилов по сравнению с новорожденными и десятидневными крысами.

Наиболее выраженные патологические изменения гепатоцитов наблюдались при СВО у самцов препубертатного возраста, тогда как в другие возрастные периоды дистрофические изменения в печени были менее выражены, а некрозы выявлялись реже по сравнению с крысами препубертатного периода. После введения ЛПС уровень активности АлАТ и АсАТ повышался в сыворотке крови у крыс препубертатного и половозрелого периода, а у новорожденных не отличался от значений контрольной группы. По данным H.S. Holley и соавторов (2012) самцы крыс в возрасте 10-15 дней постнатального онтогенеза наиболее чувствительны к гипоксии, что, вероятно, определяет развитие более выраженных патологических изменений в печени у самцов крыс Вистар препубертатного периода по сравнению с другими возрастными периодами.

При СВО содержание эндотоксина в сыворотке крови у крыс всех трех исследованных возрастных групп повышалось. Однако в отличие от новорожденных более выраженное

повышение эндотоксина наблюдалось у крыс препубертатного и половозрелого периодов постнатального развития. По данным литературы количественный и качественный состав микробиома кишечника изменяется с возрастом (Lozupone C.A. et al., 2013; Arrieta M.C. et al., 2014). Наиболее нестабильный состав микрофлоры кишечника у детей выявлен в возрасте до 3-х лет (Yatsunenko T. et al., 2012). В толстой кишке у новорожденных детей преобладает факультативная анаэробная микрофлора, представленная, в основном, грамотрицательными энтеробактериями. С возрастом происходит колонизация грамположительными бактериями – бифидобактериями, клостридиями, энтерококками, стрептококками, лактобациллами, а также грамотрицательными бактероидами (Matamoros S. et al., 2013). Одним из процессов, приводящих к повышению уровня эндотоксина в сыворотке крови, является активация проницаемости эпителия кишки вследствие увеличения концентрации кортикостерона, и дальнейшая транслокация грамотрицательных бактерий в кровь. По данным Zheng G. и соавт. (2013) подкожные инъекции кортикостерона приводят к снижению уровня экспрессии генов, кодирующих белки плотных контактов эпителия кишки, развитию воспалительных реакций в слизистой оболочке, и, в конечном итоге, к повышению проницаемости кишечного эпителия. По нашим данным, выраженное повышение содержания кортикостерона через сутки после введения ЛПС было обнаружено у десятидневных самцов, что сочетается с выраженной эндотоксинемией и тяжестью течения СВО.

По сравнению с новорожденными самцами развитие СВО у десятидневных и половозрелых крыс сопровождается развитием более выраженной акцидентальной инволюцией тимуса. Однако в отличие от половозрелых самцов, у крыс препубертатного возраста резкое опустошение коркового вещества тимуса сочетается с картиной «звездного неба» и повышением числа апоптотически гибнущих тимоцитов, в том числе и $CD3^+$ Т-лимфоцитов. В отличие от десятидневных и половозрелых самцов, у которых на 1-е сут после введения ЛПС не было выявлено изменений функциональных зон селезенки, у новорожденных крыс выявлялась гиперплазия белой пульпы.

Через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови у десятидневных и половозрелых самцов крыс Вистар снижалось содержание TGF-β, тогда как у новорожденных его концентрация не изменялась. Развитие СВО у новорожденных самцов сочеталось с увеличением уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО-α. При СВО у крыс препубертатного возраста выявлено снижение продукции и секреции ИЛ-2 и ФНО-α. В половозрелом периоде развитие СВО сопровождалось снижением содержания ИЛ-4, ИФН-γ и ФНО-α. Снижение продукции и секреции клетками селезенки ИЛ-2 и ФНО-α после введения ЛПС у десятидневных крыс может быть обусловлено высоким содержанием кортикостерона, который оказывает противовоспалительное и иммуносупрессорное действие (Cui K. et al., 2011). При исследовании функциональной

активности стимулированных ЛПС и ИЛ-1 перитонеальных макрофагов, полученных при диагностической хирургической лапароскопии, показано, что уровень продукции как провоспалительных цитокинов (ФНО-α и ИЛ-6), так и противовоспалительного (ИЛ-10) у детей в возрасте 2-4 лет выше, чем у взрослых (Barsness K.A. et al., 2004). Однако по сравнению со взрослыми людьми у детей отношение уровня продукции ИЛ-10 к ФНО-α выше, что отражает б***о***льшую активность противовоспалительного ответа в детском возрасте (Barsness K.A. et al., 2004).

При СВО у новорожденных самцов крыс Вистар статистически значимых различий числа всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов не было выявлено. По данным литературы новорожденные дети более подвержены риску возникновения и развития ССВО, так как у них наблюдается физиологическое иммунодефицитное состояние (Carcillo J.A., 2003; Wynn J. et al., 2010). По сравнению со взрослыми людьми «незрелая» иммунная система новорожденных характеризуется низкой активностью Т-цитотоксических и повышенной – Т-регуляторных лимфоцитов, низким уровнем продукции цитокинов, преимущественной поляризацией иммунного ответа по Т-хелпер 2 типу (Adkins B. et al., 2004; Levy O., 2007). В сыворотке крови у новорожденных уровень продукции иммуноглобулинов всех классов низкий и не развита лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками барьерных органов (Wynn J. et al., 2010; Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014). Однако, показатели смертности от сепсиса у новорожденных детей ниже, чем у взрослых, и составляют 10-20% и 35-50%, соответственно (Angus D.C. et al., 2001; Watson R.S., Carcillo J.A., 2005).

На 1-е сут развития СВО у десятидневных самцов обнаружено снижение числа Т-цитотоксических и В-лимфоцитов, что отражает супрессию иммунного ответа. При развитии СВО у половозрелых самцов в периферической крови выявлено повышение относительного и абсолютного числа NK-клеток – компонента врожденного звена иммунитета, и снижение – Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических и регуляторных. В развитии сепсиса выделяют фазу активации иммунного ответа с продукцией провоспалительных цитокинов и реализацией реакций клеточного звена врожденного иммунитета и фазу иммуносупрессии – снижение продукции провоспалительных цитокинов, активация апоптотической гибели лимфоцитов и снижение их пролиферации (Hirsiger S. et al., 2012; Luan Y.Y. et al., 2012; Fang H. et al., 2015). Однако между этими фазами четкой временной границы не существует, поэтому активация реакций врожденного иммунитета может сопровождаться иммуносупрессией, а для оценки выраженности реакций иммунной системы в разные возрастные периоды необходимо оценивать баланс про- и противовоспалительных реакций.

Таким образом, аналогично самкам, СВО наиболее выражен у самцов препубертатного периода: у них выявлены более тяжелые патологические изменения в печени, повышение уровня

активности АлАТ и АсАТ, уровня эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови, а также супрессия иммунного ответа по Тх1-типу.

Глава 10 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство исследований, выполненных за последнее столетие, посвящено изучению полового диморфизма репродуктивной функции – генетическим и гормональным механизмам половой дифференцировки гонад, наружных и внутренних половых органов, а также головного мозга (Kauffman A.S., 2010; Sun T. et al., 2015; McCarthy M.M., 2016). В последние десятилетия накоплен большой фактологический материал о том, что функционирование органов и интегративных систем – эндокринной, иммунной и нервной, клеточные взаимодействия у человека и животных, а также предрасположенность к ряду заболеваний и их течение различаются у самцов и самок (Voskuhl R., 2011; Ober C. et al., 2008; Regitz-Zagrosek V. et al., 2006; Arnold A.P. et al., 2010). При проведении доклинических и клинических исследований по изучению механизмов действия и эффективности лекарственных средств половые различия не всегда учитываются (Beery A.K., Zucker I., 2011; Taylor K.E. et al., 2011). Экстраполяция на самок результатов исследований, проведенных на самцах, является недостаточно корректной (Arnold A.P. et al., 2010).

Различия в функционировании всех интегративных систем, в частности иммунной, у самцов и самок определяются как разным уровнем половых гормонов, так и генами, расположенными на половых хромосомах. Гены и кодируемые ими РНК и белки, связаны в единый комплекс, активность которого различается у самок и самцов, что обусловливает функциональный половой диморфизм на системном уровне (van Nas A. et al., 2009; Arnold A.P. et al., 2009; Arnold A.P., Lusis A.J., 2011). Совокупность факторов, определяющих половые особенности индивида, объединена в понятие «сексом» (Arnold A.P., Lusis A.J., 2011). «Сексом» включает два типа таких факторов – первичные полоопределяющие, которые кодируются половыми хромосомами и являются начальным звеном проявления половых особенностей, и вторичные полоопределяющие – РНК и белки, и другие активные вещества, продукция которых реализуется за счет активации первичных факторов (Arnold A.P., 2009b; Arnold A.P., 2012).

В эксперименте показано, что по сравнению с самцами у половозрелых самок в фазе проэструса выше показатели ширины субкапсулярной зоны тимуса, уровня продукции ФНО-α клетками селезенки, абсолютного и относительного количества Т-хелперов и активированных Т-лимфоцитов в периферической крови, а также фагоцитарной активности гранулоцитов (Симонова Е.Ю. и соавт., 2014), что во многом определяет течение воспаления, а именно его локальных и системных проявлений. Тяжесть течения многих воспалительных, опухолевых, сердечно-сосудистых заболеваний, их осложнения и исходы зависят от пола. Одним из наиболее тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний, при котором манифестируют системные

воспалительные реакции, является сепсис. В клинических работах данные о половых различиях частоты встречаемости и смертности от ССВО и сепсиса противоречивы (Eachempati S.R. et al., 1999; Hubacek J.A. et al., 2001; Combes A. et al., 2009). Одними авторами показано, что сепсис развивается чаще и показатели смертности от него выше у женщин, чем у мужчин (Nachtigall I. et al., 2011). В других исследованиях, напротив, выявлено, что по сравнению с мужчинами у женщин реже развивается тяжелый сепсис и показатели выживаемости у них выше (Adrie C. et al., 2007). По данным Y. Sakr и соавт. (2013) по сравнению с мужчинами у женщин реже развивается сепсис, однако показатели смертности от сепсиса у них выше.

Противоречивость данных, полученных в клинических исследованиях, посвященных половым различиям течения воспалительного процесса и иммунологических нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях, связана с проблемами в подборе репрезентативных групп. В клинике невозможно сформировать однородные группы по репродуктивному статусу, тяжести течения заболевания, сопутствующей соматической патологии и проводимого лечения. Данные о половых различиях течения системных проявлений воспалительного ответа в разных возрастных группах, которые отличаются по функциональной активности иммунной системы и содержанию половых гормонов, в литературе отсутствуют.

Поэтому целью работы было установить половые и возрастные различия морфологических проявлений системных воспалительных реакций и особенностей иммунного ответа у крыс Вистар при введении разных доз ЛПС.

В работе изучены половые различия морфологических изменений органов-мишеней и иммунологических нарушений при введении разных доз ЛПС у крыс Вистар трех возрастных групп: новорожденных, препубертатных и половозрелых. По данным литературы по сравнению с другими возрастными периодами новорожденные дети наиболее подвержены риску возникновения и развития ССВО, у них наблюдается физиологическое иммунодефицитное состояние (низкая активность цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов, низкий уровень продукции цитокинов и синтез антител), преобладает экссудативный компонент воспаления, выражена генерализация воспалительного процесса (Серов В.В., Пауков В.С., 1995; Muenchhoff M., Goulder P.J.R., 2014). Однако, показатели смертности от сепсиса у новорожденных детей ниже, чем у взрослых, и составляют 10-20% и 35-50%, соответственно. По-видимому, низкие показатели смертности у новорожденных детей определяются высоким содержанием в сыворотке крови эстрадиола, имеющего материнское происхождение (Watson R.S., Carcillo J.A., 2005; Konkle A.T, McCarthy M.M., 2011).

Нами показано, что при введении ЛПС в высокой дозе 15 мг/кг у новорожденных крыс обоего пола в сыворотке крови снижается содержание эстрадиола, причем уменьшение его концентрации более значительное у самцов. Снижение концентрации эстрадиола в сыворотке

крови у новорожденных самцов и самок через сутки после введения ЛПС, по-видимому, связано со снижением потребления содержащего большое количество эстрадиола материнского молока, а также нарушением метаболизма стероидных половых гормонов поврежденными гепатоцитами.

На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных крыс наблюдалось увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови, показатели которого были выше контрольных значений в 30 раз у самок, и более чем в 60 раз у самцов. Содержание эндотоксина в крови у новорожденных в первую очередь зависит от его клиренса и нейтрализации антиэндотоксиновыми антителами, которые как и эстрадиол, имеют материнское происхождение, а также активностью детоксикационной системы печени, вследствие развития дистрофических и некротических изменений (Arrieta M.C. et al., 2014; Adamik B. et al., 2015; Mani V. et al., 2015).

Через сутки после введения ЛПС в легких более чем у 50% новорожденных самцов и самок развивается отек, в межальвеолярных перегородках наблюдается инфильтрация нейтрофилами, более выраженная у самцов. Выраженная воспалительная реакция в легких у новорожденных самцов по сравнению с самками может быть связана с более низкой концентрацией эстрадиола, который, по данным литературы, снижает продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и NO (Giannoni E. et al., 2011). В ранние сроки после введения ЛПС в печени у новорожденных самцов и самок выявляются умеренно выраженные дистрофические изменения, что сопровождается повышением уровня активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови. Однако половых различий в выраженности дистрофических и некротических изменений в печени у новорожденных крыс при системном воспалении нами не выявлено.

Патологические изменения в органах мишенях на 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самцов и самок сочетаются с умеренной акцидентальной инволюцией тимуса и апоптотической гибелью тимоцитов, а также гиперплазией белой пульпы селезенки. В отличие от самцов, у которых не обнаружено изменений морфометрических показателей функциональных зон тимуса, у самок наблюдается снижение объемной доли коркового вещества, размеры которого, как и его клеточность определяются балансом процессов пролиферации, миграции и гибели Т-лимфоцитов. По нашим данным введение ЛПС приводит к сужению коркового вещества тиумса только у самок, что отражает более выраженную активацию иммунной системы по сравнению с самцами, в крови у которых обнаружено увеличение содержания Т-регуляторных лимфоцитов, оказывающих иммуносупрессорное действие.

Изменения уровня продукции цитокинов клетками селезенки при системном воспалении, индуцированном введением высокой дозы ЛПС, у новорожденных имеют половые различия: у самок выявлено снижение уровня продукции Тх1-цитокинов ИЛ-2 и ИФН-γ, а также провоспалительного ФНО-α клетками селезенки; а у самцов, напротив, обнаружено повышение

концентрации ИЛ-2 и ФНО-α, что у них сочетается с более выраженным воспалительном ответом.

Половые различия морфологических и иммунологических изменений у новорожденных крыс Вистар при инфекционно-воспалительных процессах, по-видимому, в первую очередь, определяются экспрессией генов, которые расположены на половых хромосомах и кодируют иммунорегуляторные белки. По данным литературы на Х-хромосоме расположено более чем 1100 генов, часть из которых определяет функционирование иммунной системы (Fish E.N., 2008). Это рецепторы и ассоциированные белки (AR, IL-1R, IL-2R, IL-3R, TLR7, TLR8); белки, связанные с иммунным ответом (IGSF1, CD40L), транскрипционные и трансляционные эффекторы (TRAP, IKKγ, NFkBRF, PRKCi). Гены, расположенные на Y-хромосоме, уникальны для самцов и могут определять чувствительность к развитию различных заболеваний, включая сепсис. Помимо этого, у самцов всего одна Х-хромосома, т.е. одна из пары аллелей, и поэтому они склонны к заболеваниям, сцепленным с этой хромосомой, включая первичные иммунодефицитные состояния (Fish E.N., 2008). Помимо генетических особенностей, определяющих половые различия течения системного воспаления у новорожденных, немалую роль играет поступающий с молоком матери эстрадиол, оказывающий иммуностимулирующее действие. По данным Е.Ю. Симоновой и соавт. (2014) содержание эстадиола у новорожденных самок выше, чем у самцов, что согласуется с нашими данными и объясняет менее выраженную тяжесть течения системных воспалительных реакций у самок по сравнению с самцами.

В раннем препубертатном периоде (возраст 3-6 лет у человека) содержание половых стероидных гормонов низкое, концентрация эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови не различается у людей разного пола, а также у экспериментальных животных. По сравнению с другими возрастными периодами у детей в возрасте 3-6 лет чаще диагностируются вторичные иммунодефицитные состояния (Ляликов С.А., и соавт., 1996), у них наблюдается пик заболеваемости и смертности от инфекционно-воспалительных заболеваний, в частности, туберкулеза, гриппа, полиомиелита, эпидемического паротита, кори, ветряной оспы (Ahmed R. et al., 2007). Недавними исследованиями было показано, что тяжесть течения острых и хронических воспалительных заболеваний различается у мальчиков и девочек препубертатного возраста (Casimir G.J. et al., 2010; Lefevre N. et al., 2017). Авторы считают, что половые различия выраженности воспалительных изменений при остром сепсисе у детей препубертатного периода определяются не концентрацией половых стероидных гормонов, так как их содержание крайне низкое в этом возрастной группе, а активацией генов Х-хромосомы, кодирующих основные белки, участвующие в запуске NF-kB зависимого каскада синтеза провоспалительных медиаторов (Spolarics Z., 2007). Мозаичность клеток у самок, определяющаяся инактивацией либо материнской, либо отцовской Х-хромосомы, обеспечивает полиморфизм в уровне

экспрессии провоспалительных цитокинов и факторов, отвечающих за развитие эффективного иммунного ответа при инфекционно-воспалительных заболеваниях (Migeon B.R., 2006). Кроме того показано, что 15% сцепленных с Х-хромосомой генов у самок полностью не инактивируются, что обеспечивает повышение уровня продукции факторов и белков, участвующих в развитии воспаления (Carrel L., Willard H.F., 2005). Таким образом, полиморфизм генов, сцепленных с Х-хромосомой, и мозаичность клеток у самок вследствие инактивации отцовской или материнской Х-хромосомы, может быть одной из причин половых различий течения воспалительных заболеваний и низких показателей смертности от них у самок по сравнению с самцами (Lefevre N. et al., 2017).

В работе показано, что в препубертатном периоде у самцов и самок морфологические проявления системных воспалительных реакций – распространенность отека легких и воспалительная инфильтрация, выражены в равной мере. При введении высокой дозы уровень продукции ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНО-α клетками селезенки и содержание TGF-β в сыворотке крови у крыс обоего пола препубертатного периода уменьшаются. В субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у десятидневных самок и самцов отмечено снижение цитотоксических Т-лимфоцитов, что отражает активацию процессов миграции лимфоцитов во вторичные (периферические) органы иммунной системы, а также в очаги воспаления.

Нами были выявлены половые различия тяжести течения воспалительного ответа, индуцированного введением высокой дозы ЛПС, у крыс препубертатного периода. По сравнению с самками у самцов выше выраженность воспалительных реакций в легких, некротических изменений в печени и уровень активности ее ферментов. Более выраженные воспалительные изменения в органах-мишенях у самцов препубертатного периода сочетаются с увеличением концентрации кортикостерона и половых стероидных гормонов – эстрадиола и тестостерона, что является неблагоприятным прогностическим маркером развития сепсиса (Feng J.Y. et al., 2014). В отличие от самцов менее выраженные воспалительные изменения в легких и печени у десятидневных самок сопровождается снижением концентрации кортикостерона и прогестерона.

Тяжелое течение системного воспаления на ранних сроках у самцов препубертатного периода сочетается с выраженным увеличением числа апоптотически гибнущих $CD3^+$-лимфоцитов тимуса и снижением количества В-лимфоцитов в периферической крови. Менее выраженная апоптотическая гибель клеток тимуса у самок на 1-е сут после введения ЛПС сопровождалась снижением количества Т-хелперов и Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови, что отражает превалирование процессов миграции лимфоцитов в очаги воспаления над их гибелью. Иммунологические нарушения, выявленные при введении высокой дозы ЛПС у препубертатных самок, сопровождаются снижением уровня продукции провоспалительного ИФН-γ клетками селезенки, тогда как у самцов его синтез и секреция не

изменяются, что может определять более выраженные воспалительные изменения в органах-мишенях у самцов по сравнению с самками.

На 4-е сут после введения высокой дозы ЛПС морфологические изменения в органах-мишенях у десятидневных крыс обоего пола остаются выраженными, наблюдается нормализация уровня активности ферментов печени, в тимусе выявляется слабо выраженная акцидентальная инволюция. В сыворотке крови у самок и самцов уровень эндотоксина и содержание кортикостерона остаются выше контрольных значений, концентрации неоптерина и TGF-β в сыворотке крови и ИЛ-4 в культуре клеток селезенки нормализуются, наблюдается супрессия продукции ИЛ-2 и ФНО-α. Выраженная супрессия продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов характеризует неэффективный иммунный ответ у особей препубертатного периода обоего пола, что связано с функциональной незрелостью иммунной системы, сниженной экспрессией генов, ответственных за пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку числа Т-лимфоцитов, развитие и созревание клеток крови и лейкоцитов (Gentile L.F. et al., 2014). Видимо поэтому, у крыс Вистар обоего пола в препубертатном периоде более выражены проявления системного воспаления, по сравнению с другими возрастными группами.

В отличие от периода новорожденности и препубертатного периода половая зрелость у мужчин и женщин, как и у лабораторных животных обоего пола, характеризуется максимальным содержанием половых стероидов, функциональной зрелостью иммунной системы, сбалансированным уровнем продукции Тх1/Тх2-цитокинов и полностью сформированным адаптивным звеном иммунитета (Симонова Е.Ю. и соавт., 2014; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). По данным литературы после полового созревания гендерные различия течения инфекционно-воспалительных заболеваний проявляются наиболее ярко, что, по мнению многих авторов, связано с иммуномодулирующим действием половых гормонов (Watson R.S. et al., 2003; Angstwurm M.W. et al., 2005; Vishwanathan S.A. et al., 2011; Klein S.L., 2012).

Концентрация половых гормонов изменяется не только с возрастом: у особей женского пола колебания эстрадиола и прогестерона происходят в течение менструального\эстрального цикла, в котором выделяют фазу с наиболее высоким содержанием эстрадиола и низким прогестерона – проэструс у животных с эстральным циклом и первые дни менструального цикла у женщин, а также фазу, в которой концентрация эстрадиола низкая, а прогестерона – высокая – диэструс у животных и 7-й день менструального цикла у женщин.

Один из разделов работы был посвящен сравнительному исследованию особенностей развития и тяжести течения системного воспаления у самок крыс Вистар, которым вводили ЛПС в дозе 1,5 мг/кг в фазу проэструса и диэструса, отличающихся между собой по содержанию в крови женских половых гормонов. Фаза проэстурса характеризуется высоким содержанием

эстрадиола и низким – прогестерона в сыворотке крови, тогда как в фазу диэстурса, напротив, низкая концентрация эстрадиола сочетается с максимальным содержанием прогестерона. Показано, что выраженность биохимических, иммунологических и морфологических проявлений системного воспаления, индуцированного введением низкой дозы ЛПС, у самок варьирует в зависимости от фазы эстрального цикла, в которую вводили ЛПС. Более выраженные альтеративные изменения в печени и воспалительные – в легких, высокий уровень активности АлАТ и АсАТ и эндотоксина в сыворотке крови обнаружены у крыс, которым вводили ЛПС в фазу диэструса. Содержание кортикостерона в сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, снижается, наблюдается более выраженная активация иммунной системы – резкое «опустошение» белой пульпы селезенки и акцидентальная инволюция тимуса II стадии. На 1-е сут после введения ЛПС у них выявлено повышение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4 клетками селезенки и концентрации TGF-β в сыворотке, что отражает выраженную активацию как про- так и противовоспалительного звена иммунного ответа. Напротив, введение ЛПС крысам в фазу проэструса вызывает развитие менее выраженных воспалительных изменений в печени и легких. В сыворотке крови у самок, которым вводили ЛПС в фазу проэструса, на фоне увеличения содержания кортикостерона показатели активности АлАТ, АсАТ и уровня эндотоксина не изменяются. В органах иммунной системы реактивные изменения менее выражены по сравнению с группой крыс, которым ЛПС вводили в фазу диэструса. В отличие от самок, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, в фазу проэструса уровень продукции ИЛ-2, ФНО-α и содержание TGF-β снижаются.

В экспериментальных исследованиях показано, что показатели смертности от сепсиса ниже, а активация иммунных реакций на антигены выше у крыс в фазу проэструса (Wichmann M.W. et al., 2003; Choudhry M.A. et al. 2007; Angele M.K. et al., 2014). Более часто развитие воспалительного заболевания матки – пиометры у собак наблюдается в фазу диэструса (Sugiura K. et al., 2004). Инфицирование генитального тракта мышей вирусом герпеса 2 типа в фазу эструса сопровождается поляризацией иммунного ответа по Тх2-типу со снижением уровня продукции IgG антител, а в фазу диэструса – увеличением содержания IgG на фоне снижения IgA (Gallichan W.S. et al., 1996). Данные литературы подтверждаются полученными в работе результатами, что свидетельствует об иммуномодулирующей роли женских половых стероидов.

Исследование половых различий тяжести течения системных проявлений воспаления, индуцированного введением ЛПС, у половозрелых крыс Вистар проводили на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг, вызывающей у животных этой возрастной группы альтеративные изменения в органах-мишенях, характерных для ССВО у человека. В разные сроки после введения ЛПС воспалительные изменения в органах-мишенях были более выражены у самцов, что сопровождалось эндотоксинемией. По сравнению с самками на 1-е сут после введения ЛПС

у самцов выявлено снижение концентрации кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови. В органах иммунной системы у самцов более тяжелое течение воспалительного процесса в печени и легких сопровождалось выраженной акцидентальной инволюцией в тимусе и менее выраженным «опустошением» ПАЛМ-зоны селезенки. На 1-е сут после введения ЛПС у самцов выявлена поляризация иммунного ответа преимущественно по Тх1-типу, о чем свидетельствовало увеличение уровня продукции ИЛ-2 клетками селезенки и содержания неоптерина в сыворотке крови. Эти иммунологические изменения сочетались со снижением абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов в периферической крови у самцов, что отражает, очевидно, более выраженные процессы миграции и гибели лимфоцитов. Согласно данным клинических исследований у септических больных снижение количества Т-цитотоксических лимфоцитов является одним из показателей развития «иммунного паралича» и коррелирует с тяжестью течения заболевания (Boomer J.S. et al., 2011; Condotta S.A. et al., 2013).

На 7-е сут после введения ЛПС у самцов отмечался высокий уровень продукции провоспалительного цитокина ИЛ-6, который, по-видимому, определяет более выраженные альтеративные изменения в органах-мишенях у самцов. По данным литературы неблагоприятными прогностическими маркерами сепсиса и септического шока является гиперпродукция таких провоспалительных цитокинов, как ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-8 (Blackwell T.S., Christman J.W., 1996), которые являются маркером неблагоприятного исхода заболевания (Majetschak M. et al., 2000; Dossett L.A. et al., 2008). Увеличение уровня продукции ИЛ-6 в культуре клеток селезенки у самцов на 7-е сут после введения ЛПС может быть одним из механизмов развития более выраженных воспалительных изменений в органах-мишенях по сравнению с самками.

В отличие от самцов, у которых во все сроки после введения низкой дозы ЛПС наблюдалось увеличение уровня эндотоксина, у самок эндотоксинемия не выявлялась, что сочеталось с менее выраженными воспалительными изменениями в легких. Содержание кортикостерона, прогестерона и тестостерона в сыворотке крови на 1-е сут после введения ЛПС у самок повышалось, что сопровождалось снижением концентрации эстрадиола. Через сутки после введения ЛПС у самок в тимусе выявлялась умеренная акцидентальная инволюция, гиперплазия коркового вещества и более выраженные изменения в селезенке, аналогичные таковым у самцов. Более выраженные морфологические изменения, выявленные в селезенке у самок, возможно, определяются стимулирующим действием эстрогенов на В-лимфоциты (Lu F.X. et al., 2002), и свидетельствуют об активации адаптивного звена иммунного ответа у самок, что сочетается с менее выраженными патологическими изменениями в органах-мишенях. На 1-е сут после введения ЛПС у самок выявлена супрессия продукции всех исследуемых цитокинов, а на 7-е сут эксперимента наблюдалась ее нормализация, за исключением провоспалительных

ИФН-γ и ФНО-α, а также иммунорегуляторного ИЛ-12. По сравнению с самцами у самок не было выявлено увеличения продукции провоспалительного ИЛ-6 клетками селезенки ни в один из двух сроков эксперимента.

С целью оценки выраженности возрастных особенностей тяжести течения системных воспалительных реакций половозрелым крысам Вистар обоего пола внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 15 мг/кг. По сравнению с низкой дозой ЛПС у самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения его высокой дозы выраженность воспалительных изменений и иммунологических нарушений возрастала, а половые различия нивелировались. Высокая доза ЛПС не вызывала изменений содержания половых стероидных гормонов в сыворотке крови как у самцов, так и у самок, тогда как введение низкой дозы ЛПС приводило к снижению содержания эстрадиола у самок, а тестостерона – у самцов.

Как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС интраальвеолярный отек легких выявлялся чаще у самцов, а в печени у них наблюдались более выраженные альтеративные изменения, чем у самок. Тяжесть течения системного воспаления, вызванного введением высокой дозы ЛПС, сочеталась с выраженным повышением уровня эндотоксина в крови. Установлено, что увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови является неблагоприятным прогностическим критерием тяжести течения септического шока, а его терапевтическая элиминация снижает содержание С-реактивного белка и прокальцитонина в сыворотке крови, уменьшает риск развития полиорганной недостаточности и повышает выживаемость (Yaguchi A. et al. 2012; Adamik B. et al., 2015).

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС у животных обоего пола в тимусе выявлена акцидентальная инволюция II-III стадии. По сравнению с самками у самцов были более выражены ее проявления: выше количество апоптотически гибнущих клеток и число макрофагов, фагоцитирующих погибшие лимфоциты. По сравнению с самцами в селезенке у самок отмечалось более выраженное сужение маргинальной зоны лимфоидных узелков, что сопровождалось повышением продукции клетками селезенки ИЛ-2, тогда как у самцов концентрация ИЛ-2 и ИФН-γ, напротив, уменьшалась. По данным литературы клетки селезенки людей, умерших от сепсиса, продуцируют низкие количества как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов (Boomer J.S. et al., 2011). В периферической крови у самцов наблюдалось снижение количества Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических. Выявленные иммунологические нарушения при введении высокой дозы ЛПС свидетельствуют о более выраженной супрессии реакций врожденного иммунного ответа у самцов по сравнению с самками.

При анализе информативности статистически значимо изменяющихся показателей при системном воспалении разной тяжести, индуцированного введением низкой и высокой дозы

ЛПС, у половозрелых крыс Вистар с помощью формулы Кульбака было показано, что при введении низкой дозы ЛПС наиболее значимыми в механизмах развития системного воспаления у самок и самцов были иммунологические нарушения: у самок – выраженный апоптоз тимоцитов, у самцов – снижение уровня продукции ИЛ-12, а также изменения содержания половых гормонов: снижение концентрации эстрадиола у самок, и тестостерона у самцов. Введение высокой дозы ЛПС самкам и самцам крыс Вистар приводит к развитию более тяжелой формы системного воспаления, что связано, в первую очередь, с повышением уровня эндотоксина в сыворотке крови и развитием реакций врожденного иммунитета, в то время как половые различия информативности диагностических критериев нивелируются.

При введении высокой дозы ЛПС (15 мг/кг) во всех возрастных периодах у самок и самцов выявлена эндотоксинемия, воспалительная реакция в легких с увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, альтеративные изменения в печени разной степени выраженности, а также изменения продукции клетками селезенки провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов. Нами показано, что по сравнению с самками наиболее выраженные проявления воспаления характерны для самцов всех возрастных групп. При анализе информативности с помощью формулы Кульбака было показано, что в развитии реакций системного воспаления у новорожденных самок наиболее значимыми были иммунологические нарушения – снижение уровня продукции ИФН-γ и ИЛ-2, тогда как у самцов наибольшую патогенетическую значимость имело изменение уровня эндотоксина в сыворотке крови.

По сравнению с периодом новорожденности и половой зрелости наиболее высокая тяжесть течения системного воспаления, индуцированного введением ЛПС, была в препубертатном периоде у крыс обоего пола, сочетающаяся с высоким уровнем эндотоксина, низким содержанием половых стероидных гормонов и супрессией иммунного ответа. Анализ информативности показал, что в разные сроки после введения ЛПС у десятидневных крыс Вистар обоего пола наиболее значимым в механизмах развития системных воспалительных реакций было увеличение уровня эндотоксина, выраженные альтеративные и патологические изменения в легких и печени. На 1-е и 4-е сут после введения высокой дозы ЛПС у десятидневных самцов одним из наиболее информативных критериев оказалось снижение уровня продукции провоспалительного цитокина ФНО-α клетками селезенки, тогда как у самок иммунологические нарушения, в частности снижение уровня продукции провоспалительных ИФН-γ и ФНО-α, приобрели максимальную значимость только в более поздние сроки.

Полученные результаты исследования показывают, что определяющую роль в развитии системных воспалительных реакций и тяжести его течения у самцов всех исследованных возрастных групп играет уровень эндотоксина, тогда как у самок эндотоксинемия приобретает максимальную диагностическую значимость только в препубертатный период и при введении

сублетальной дозы ЛПС половозрелым крысам. В период новорожденности, когда иммунная система функционально незрелая, а в сыворотке крови содержание эстрадиола поддерживается на сравнительно высоком уровне за счет его поступления с молоком матери, в развитии системного воспаления у самок основную диагностическую значимость имеют иммунологические нарушения, тогда как у самцов повышение уровня эндотоксина доминирует над иммунными и гормональными изменениями. Видимо половые различия особенностей воспалительных реакций, индуцированных введением ЛПС, у новорожденных, в большей мере, зависят от экспрессии генов, расположенных на половых хромосомах и отвечающих за развитие иммунного ответа. Однако в сыворотке крови у новорожденных присутствует высокая концентрация эстрадиола, имеющего материнское происхождение, который оказывает иммуномодулирующее действие, активируя продукцию и синтез цитокинов и транскрипционных факторов, что приводит, во-первых, к наличию половых различий тяжести течения воспаления, а во-вторых, менее выраженным воспалительным изменениям в органах-мишенях у новорожденных самок и самцов по сравнению с препубертатным периодом.

В препубертатный период на фоне низкого содержания половых стероидов и активного созревания иммунной системы системные проявления воспаления у самок и самцов наиболее тяжелые, а показатели уровня эндотоксина имеют максимальную информативность. В отличие от новорожденных у десятидневных крыс материнский эстрадиол не поступает в кровь, его собственный синтез низкий, и у самок, как и у самцов введение ЛПС приводит к выраженным патологическим изменениям в органах-мишенях и тимусе. Иммунологические нарушения у самок и самцов препубертатного периода в ответ на введение ЛПС характеризуются выраженной апоптотической гибелью клеток тимуса, в первую очередь, лимфоцитов коркового вещества, снижением числа Т-лимфоцитов в периферической крови, а также супрессией продукции цитокинов, что свидетельствует о развитии «иммунного паралича». Следует отметить, что, несмотря на отсутствие различий в концентрациях половых гормонов в сыворотке крови у препубертатных самок и самцов, более выраженная воспалительная реакция в легких, обширные некротические изменения гепатоцитов, акцидентальная инволюция тимуса поздних стадий, супрессия продукции Тх1- и Тх2-цитокинов, как и снижение в периферической крови количества Т-лимфоцитов, в том числе хелперов и цитотоксических, при системном воспалении характерна для самцов. Более выраженные иммунологические нарушения и морфологические изменения органов-мишеней при введении ЛПС у самцов препубертатного периода, по-видимому, связаны с низким уровнем экспрессии генов, расположенных на Х-хромосоме, а также отсутствием достаточного количества половых стероидных гормонов, определяющих развитие адекватного иммунного ответа в ответ на введение ЛПС.

Влияние эстрадиола и тестостерона на развитие и особенности течения системных воспалительных реакций у крыс Вистар оценивали с помощью моделей овари- и орхиэктомии, которые приводят к резкому снижению эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови у самок и самцов, соответственно. В отдаленные сроки после хирургической кастрации у самок и самцов моделировали системное воспаление путем внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг, которая у некастрированных самок и самцов приводит к развитию СВО средней тяжести с наличием выраженных половых особенностей его течения.

Нами показано, что хирургическая овари- и орхиэктомия половозрелых крыс Вистар усугубляет течение системных воспалительных реакций, что проявляется в выраженной эндотоксинемии, более тяжелом воспалительном процессе в органах-мишенях и изменением баланса про- и противовоспалительных цитокинов.

По сравнению с половозрелыми самками с физиологическим уровнем половых стероидов при введении 1,5 мг/кг ЛПС у овариэктомированных крыс Вистар выявлено более выраженное увеличение уровня эндотоксина, содержания кортикостерона и прогестерона в сыворотке крови, повышение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и изменение уровня продукции цитокинов: увеличением ИЛ-6 и ИФН-γ на фоне снижения уровня ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α. При введении низкой дозы ЛПС динамика изменений показателей морфофункционального состояния тимуса у овариэктомированных крыс и самок с физиологическим уровнем половых гормонов была сходной. По сравнению с некастрированными самками в селезенке овариэктомированных крыс развитие системных воспалительных реакций сопровождается только реакцией герминативных центров лимфоидных узелков, характеризующейся их многократным расширением. Анализ критерия информативности показал, что по сравнению с некастрированными самками наиболее значимыми в механизмах развития системного воспаления, индуцированного введением ЛПС, у овариэктомированных животных было изменение уровня эндотоксина наряду с патологическими изменениями в легких, доминирующие над гормональными и иммунологическими нарушениями, которые играют ведущую роль в патогенезе системного воспаления у некастрированных самок, но не являются определяющими у кастрированных. Полученные данные свидетельствуют о важной протективной роли женских половых стероидов в модуляции тяжести течения системных проявлений воспалительного ответа. Согласно данным литературы частота развития сепсиса увеличивается с возрастом и у пожилых людей, особенно у женщин после наступления менопаузы показатели смертности от сепсиса увеличиваются (Adrie C. et al., 2007; Iskander K.N. et al., 2013), что авторы объясняют возрастным снижением содержания эстрадиола. В США статистическое исследование более чем 10,4 миллионов пожилых людей показало, что с 65 лет и старше частота встречаемости сепсиса возрастает на 15-30%, что сочетается с высокими

показателями развития осложнений (Martin G.S. et al., 2006). Данные об особенностях развития ССВО у женщин в менопаузу и системных проявлений воспаления у самок с низким содержанием эстрадиола фрагментарны. Некоторыми авторами показано, что после экспериментальной овариэктомии, увеличивается показатель смертности от сепсиса у мышей и крыс по сравнению с некастрированными самками (Merkel S.M. et al., 2001; Tsuyuguchi K. et al., 2001).

По сравнению с некастрированных самцами, введение ЛПС крысам Вистар на фоне орхиэктомии приводит к развитию системных воспалительных реакций в более тяжелой форме с выраженными воспалительными изменениями в легких и альтеративными – в печени, что сопровождается выраженной эндотоксинемией, активацией продукции провоспалительных цитокинов на ранних сроках развития системного воспаления и повышением содержания кортикостерона и продукции Тх1-цитокина ИЛ-2 только на 7-е сут после введения ЛПС. Проведенный анализ информативности статистически значимо изменяющихся показателей в разные сроки после введения ЛПС на фоне орхиэктомии показал, что наибольшую патогенетическую значимость в развитии системного воспалительного ответа у кастрированных самцов имеет повышение уровня эндотоксина в сыворотке крови наряду с патологическими изменениями в органах-мишенях, тогда как гормональные и иммунологические нарушения не являются доминирующими. Выявленные особенности течения системных воспалительных реакций у кастрированных самцов подтверждают иммуносупрессорную и модулирующую роль тестостерона в развитии воспалительных реакций.

В экспериментах *in vitro* показано, что андрогены регулируют процессы дифференцировки и функционирования клеток иммунной системы, взаимодействуя со специфическими рецепторами на иммунокомпетентных клетках, в частности макрофагах и $CD45^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитах селезенки, печени и тимуса (Benten W.P. et al., 2004; Nalbandian G., Kovats S., 2005; Butts C.L. et al., 2007). В экспериментах *in vivo* данные об иммуномодулирующем действии тестостерона противоречат друг другу (Wichmann M.W. et al., 1997; Wunderlich F. et al., 2002; Torres M.B. et al., 2005). Одни авторы указывают на провоспалительное действие тестостерона, другие, наоборот, на его иммуносупрессорные эффекты (Wichmann M.W. et al., 1997; Wunderlich F. et al., 2002; Torres M.B. et al., 2005). В клинических исследованиях установлено, что чувствительность к ЛПС, тяжесть течения и уровень смертности от эндотоксин-ассоциированных заболеваний у мужчин также как и у женщин увеличиваются с возрастом, что, по-видимому, обусловлено снижением содержания половых гормонов (Angstwurm M.W. et al., 2005; Klein S.L., Roberts C.W., 2010). Показано снижение концентрации тестостерона у мужчин, начиная с 40 лет на 1,6% в год, что к 70-75 годам приводит к гипоандрогенемии (Pinsky M.R., Hellstrom W.J., 2010).

Таким образом, на экспериментальной модели системных проявлений воспаления впервые выявлены половые и возрастные различия изменений стероидных гормонов, выраженности воспалительного процесса в органах-мишенях – печени и легких, морфофункционального состояния тимуса и селезенки и цитокинового профиля. Показано, в разные возрастные периоды половые различия морфологических и иммунологических изменений при СВО существуют, но они выражены в разной мере. Максимальная выраженность половых особенностей течения системных воспалителных реакций выявлена в половозрелом возрасте при введении ЛПС в дозе 1,5 мг/кг, в отличие от более высокой дозы – 15 мг/кг, при которой половые различия тяжести СВО нивелируются. По сравнению с другими возрастными группами наиболее тяжелое течение системного воспаления наблюдается у животных препубертатного периода. В этом периоде у самцов выявлены наиболее выраженные морфологические изменения в органах-мишенях и выраженная иммуносупрессия. Хирургическая кастрация крыс обоего пола усугубляет течение СВО, что свидетельствует об иммуномодулирующем действии как эстрадиола, так и тестостерона.

Выводы

1. На модели эндотоксинемии, индуцированной введением высокой и низкой доз ЛПС, выявлены половые и возрастные различия выраженности системных воспалительных реакций и морфофункциональных нарушений иммунной системы, которые определяются, главным образом, содержанием половых стероидных гормонов.
2. В разные возрастные периоды высокая и низкая дозы ЛПС у крыс обоего пола вызывают развитие варьирующих по выраженности системных воспалительных реакций в легких – внутриальвеолярного отека и воспалительной инфильтрации межальвеолярных перегородок нейтрофилами, и альтеративных изменений в печени – дистрофии и некрозов. Во всех возрастных группах у животных обоего пола выявляются акцидентальная инволюция тимуса разных стадий, гиперплазия и/или «опустошение» Т- и В-зависимых зон селезенки, нарушения баланса продукции ее клетками Тх1-, Тх2- и провоспалительных цитокинов, а также субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови.
3. Выраженность системного воспалительного ответа через сутки после введения низкой дозы ЛПС половозрелым самкам крыс Вистар зависит от фазы эстрального цикла. По сравнению с фазой проэструса в фазу диэструса более выражены эндотоксинемия, воспалительные изменения в легких и альтеративные – в печени, морфофункциональные изменения органов иммунной системы – «опустошение» белой пульпы селезенки и коркового вещества тимуса, что сопровождается снижением концентрации кортикостерона и повышением уровня TGF-β, оказывающих противовоспалительное действие, и снижением продукции клетками селезенки Тх1- и Тх2-цитокинов – ИЛ-2 и ИЛ-4.
4. Высокая доза ЛПС в период новорожденности у животных обоего пола с высоким содержанием эстрадиола вызывает развитие слабо выраженного системного воспалительного ответа. По сравнению с самками у самцов воспалительный процесс в легких более тяжелый, он сопровождается увеличением уровня продукции *ex vivo* Тх1-цитокина ИЛ-2 и провоспалительного ФНО-α, а также повышением числа регуляторных Т-лимфоцитов, супрессирующих иммунный ответ. У самок продукция ИЛ-2 и ИФН-γ, напротив, снижается, но увеличивается содержание воспалительного маркера неоптерина.
5. В препубертатном периоде у животных обоего пола физиологические концентрации половых стероидных гормонов не различаются, и они низкие, но у самок выше концентрация кортикостерона. По сравнению с самками у самцов при введении высокой дозы ЛПС морфологические проявления системной воспалительной реакции более выражены. У животных обоего пола наблюдается супрессия продукции клетками селезенки Тх1-цитокина ИЛ-2, Тх2-

цитокина ИЛ-4 и провоспалительных цитокинов – ФНО-α и ИФН-γ. В отличие от самцов у самок снижается содержание $CD3^+CD4^+$ хелперных и $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов, что отражает развитие иммунодефицитного состояния.

6. После введения низкой дозы ЛПС у половозрелых самцов в отличие от самок воспалительные изменения в органах-мишенях более тяжелые, у них наблюдаются повышение содержания эндотоксина, снижение концентрации кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови, выраженная акцидентальная инволюция тимуса. У самцов наблюдается увеличение уровня продукции ИЛ-2 клетками селезенки и содержания неоптерина в сыворотке крови, снижение абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов и Т-хелперов.

7. Низкая концентрация стероидных половых гормонов после хирургической овари- и орхиэктомии половозрелых крыс Вистар усугубляет воспалительный процесс в легких и альтеративный – в печени, что сопровождается выраженной эндотоксинемией и смещением баланса продукции цитокинов в сторону провоспалительных, несмотря на увеличение содержания кортикостерона. По сравнению с некастрированными крысами у животных обоего пола в отдаленные сроки после хирургической кастрации наиболее значимым в развитии системной воспалительной реакции является повышение уровня эндотоксина. Наибольшую информативность у некастрированных животных имеют показатели содержания стероидных гормонов – снижение эстрадиола у самок и тестостерона у самцов, и иммунные нарушения – активация апоптоза тимоцитов у самок и снижение продукции ИЛ-12 у самцов.

8. По сравнению с низкой высокая доза ЛПС как у самок, так и у самцов вызывает более выраженные воспалительные процессы в органах-мишенях, акцидентальную инволюцию тимуса с апоптотической гибелью тимоцитов, опустошение Т-зависимой зоны селезенки. По сравнению с самками у самцов высокая доза ЛПС приводит к выраженному снижению продукции Тх1-, Тх2- и провоспалительных цитокинов клетками селезенки и уменьшению числа Т-и В-лимфоцитов в периферической крови. В отличие от низкой высокая доза ЛПС вызывает более тяжелые системные воспалительные реакции, в развитии которых ключевую роль играет повышение уровня эндотоксина, а половые различия и патогенетическая значимость иммунных и гормональных нарушений нивелируются.

9. Высокая доза ЛПС у самцов всех возрастных групп по сравнению с самками вызывает развитие более выраженных системных воспалительных реакций в легких и печени. У препубертатных и половозрелых самцов системные воспалительные реакции сопровождаются апоптозом и акцидентальной инволюцией тимуса, снижением уровня продукции *ex vivo* Тх1-, Тх2- и провоспалительных цитокинов.

10. При развитии системных воспалительных реакций, вызванных высокой дозой ЛПС, в группах животных с низким содержанием половых стероидных гормонов – у новорожденных

самцов, препубертатных и кастрированных крыс обоего пола, максимальную патогенетическую и прогностическую значимость имеет повышение уровня эндотоксина в сыворотке крови. При введении низкой дозы ЛПС половозрелым животным обоего пола и новорожденным самкам с физиологическим содержанием эстрадиола и тестостерона, определяющими в развитии воспалительного ответа являются иммунные нарушения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева М.Г. Инфекционный процесс и системный воспалительный ответ. М. Г. Авдеева, В. В. Лебедев, М. Г. Шубич ; под ред. М. Т. Абидова. Нальчик, 2010; 326 с.

2. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. М.: Медицина, 1973. 248 с.

3. Алешин Б.В. Гистофизиология гипоталамо-гипофизарной системы. М., Медицина, 1971, 440 с.

4. Берштейн Л.М. Внегонадная продукция эстрогенов (роль в физиологии и патологии) // СПб.: Наука, 1998;172 с.

5. Быкова В.В., Катаева А.В. Методы и средства анализа информативности признаков при обработке медицинских данных. Программные продукты и системы. 2016;2:172-178.

6. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Стратегия иммунной эвазии патогенов: супрессия иммунного ответа путем активирования Т-регуляторных клеток хозяина. Иммунология. 2016;37(1): 35-46.

7. Дашутина Е.В., Блощицкий В.П. Разработка и реализация алгоритма оценки информативности признаков при диагностике заболеваний. ДонНТУ., 2011. http://ea.donntu.edu.ua/handle/123456789/12855

8. Диатроптов М.Е., Макарова О.В., Серебряков С.Н., Трунова Г.В., Малайцев В.В. Морфофункциональные изменения иммунной системы мышей BALB/C и C57Bl/6 при воздействии низкой дозы липополисахарида. Иммунология. 2011. Т. 32. № 3. С. 135-138.

9. Зайратьянц О.В., Берщанская А.М. Строение и развитие вилочковой железы. В кн. Харченко В.П., Саркисов Д.С., Ветшев П.С., Галил-Оглы Г.А., Зайратьянц О.В. Болезни вилочковой железы. М.: «Триада-Х», 1998. С. 6-46.

10. Зайратьянц О.В. Сепсис: этиология, патогенез, классификация, патологическая анатомия. Врач скорой помощи. 2014. № 5. С. 53-64.

11. Ивановская Т.Е., Гусман Б.С. Патологическая анатомия болезней плода и ребенка. Руководство. М.: Медицина, 1981. 376 с.

12. Игонин А.А., Кукес В.Г., Пальцев М.А. Сепсис: молекулярные механизмы системного воспаления в качестве модели для изучения перспективных терапевтических мишеней. Молекулярная медицина. 2004;2:3-11.

13. Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) под ред. проф. В.С. Камышникова. М.: МЕД-пресс-информ, 2015. 720 с.

14. Капустина С.В., Кирякова О.В., Капустина А.В., Лапина Л.А., Ступина А.А. Выбор информативных признаков для оценки тяжести заболевания // Современные проблемы науки и

образования. – 2015. – № 2-2.; URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=21955 (дата обращения: 22.11.2017).

15. Ковалевский Г.В. Развитие тимуса в постнатальном онтогенезе крыс. Онтогенез, 1996;2:100-107.

16. Копьева Т. Н., Кактурский Л. В. Определение диагностической информативности неспецифических морфологических признаков. Арх. пат. 1976. №12. С. 60–63.

17. Косырева А.М., Макарова О.В., Осмоловская Е.Ю. Возрастные особенности и половые различия морфофункциональных изменений тимуса у крыс Вистар при системном воспалительном ответе. Клиническая и экспериментальная морфология. 2016;1(17):18-26.

18. Косырева А.М., Симонова Е.Ю., Макарова О.В. Половые различия реакции иммунной системы и легких при экспериментальном остром эндотоксикозе. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012;153(3):318-321.

19. Косырева А.М., Хомякова Т.И., Макарова О.В. Морфологическая и иммунологическая характеристика системного воспалительного ответа у орхиэктомированных крыс Вистар. Иммунология. 2012;4:194-198.

20. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. NF-kB-, но не MAPK-сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4 + NOD2 или TLR9 + NOD2. Иммунология. 2017;38(2):76-82.

21. Ляликов С.А., Макарчик А.В., Евец Л.В. и соавт. Функциональное состояние эндокринной системы у детей из различных регионов Беларуси. Результаты пятилетнего наблюдения. Экологическая антропология (ежегодник). 1996: 160–67.

22. Макарова О.В., Постовалова Е.А. Морфологические изменения тимуса, состава его клеток и субпопуляций лимфоцитов периферической крови при экспериментальном остром язвенном колите. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 5. С. 641-646.

23. Мишнёв О.Д., Гринберг Л.М., Зайратьянц О.В. Актуальные проблемы патологии сепсиса: 25 лет в поисках консенсуса. Архив патологии. 2016. Т. 78. № 6. С. 3-8.

24. Мишнев О.Д., Щеголев А.И., Лысова Н.Л., Тинькова И.О. Печень и почки при эндотоксинемии. // М.: Издательство РГМУ, 2003. 211 с.

25. Мовет Г.З. Воспаление, иммунитет и гиперчувствительность. // М.: Медицина, 1975. 560 с.

26. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. // Волгоград: Издательство Вол. ГМУ, 2008. 208 с.

27. Поликар А. Воспалительные реакции и их динамика.// Новосибирск: Наука, 1969. 234 с.

28. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. Руководство для врачей. // М.: Медицина, 1995. 640 с.

29. Симонова Е.Ю., Косырева А.М. Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов и фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови у крыс Вистар. Иммунология. 2012;33(3):120-123.

30. Симонова Е.Ю., Косырева А.М., Макарова О.В., Диатроптов М.Е. Возрастные изменения морфофункционального состояния иммунной системы у крыс Вистар. Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 1 (9). С. 35-41.

31. Титова Н.Д. Развитие системы иммунитета плода, новорожденного и детей раннего возраста. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2007;4:38-46.

32. Хлыстова З.С., Калинина И.И., Шмелева С.П. и соавт. Последовательность встраивания лимфоидных органов в развивающуюся иммунную систему плода человека и ее значение в перинатальной патологии // Архив патологии, 2002, №2, С. 16-19.

33. Чернух А.М. Воспаление. // М.: Медицина, 1979, 448 с.

34. Aaby P., Ariyoshi K., Buckner M. et al. Age of wife as a major determinant of male-to-female transmission of HIV-2 infection: a community study from rural West Africa. AIDS. 1996 Nov;10(13):1585-90.

35. Adamik B., Zielinski S., Smiechowicz J., Kübler A. Endotoxin Elimination in Patients with Septic Shock: An Observation Study. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2015;63(6):475-83. doi: 10.1007/s00005-015-0348-8.

36. Adrie C., Azoulay E., Francais A. et al. Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. Chest. 2007;132(6):1786-93.

37. Adkins B., Guevara P., Rose S. Thymic and extrathymic contributions to T helper cell function in murine neonates. Haematol Rep. 2006;2(10):9-13.

38. Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. Nat Rev Immunol. 2004;4(7):553-64. doi: 10.1038/nri1394.

39. Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. Nat. Immunol. 2007; 8: 1188–93.

40. Aisemberg J., Vercelli C.A., Bariani M.V et al. Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone. PLoS One. 2013;8(2):e56161. doi: 10.1371/journal.pone.0056161.

41. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med. 1992;20:864–74.

42. Alexander J., Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. Immunol Lett. 2005;99(1):17-23.

43. Al-Hertani W., Yan S.R., Byers D.M., Bortolussi R. Human newborn polymorphonuclear neutrophils exhibit decreased levels of MyD88 and attenuated p38 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. Clin Invest Med. 2007;30(2):E44-53.

44. Al Nabhani Z., Dietrich G., Hugot J.P., Barreau F. Nod2: The intestinal gate keeper. PLoS Pathog. 2017;13(3):e1006177. doi: 10.1371/journal.ppat.1006177.

45. Andaluz-Ojeda D., Bobillo F., Iglesias V. et al. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. Cytokine. 2012;57:332–6.

46. Andersson T., Söderström I., Simonyté K., Olsson T. Estrogen reduces 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral, but not subcutaneous, adipose tissue in rats. Obesity (Silver Spring). 2010;18(3):470-5. doi: 10.1038/oby.2009.294.

47. Angele M.K., Catania R.A., Ayala A. et al. Dehydroepiandrosterone: an inexpensive steroid hormone that decreases the mortality due to sepsis following trauma-induced hemorrhage. Arch Surg. 1998;133(12):1281-8.

48. Angele M.K., Frantz M.C., Chaudry I.H. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. Clinics (Sao Paulo). 2006;61(5):479-88.

49. Angele M.K., Knöferl M.W., Ayala A., Bland K.I., Chaudry I.H. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. Cytokine. 2001;16(1):22-30.

50. Angele M.K., Nitsch S., Knoferl M.W. et al. Sex-specific p38 MAP kinase activation following trauma-hemorrhage: involvement of testosterone and estradiol. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285(1):E189-96.

51. Angele M.K., Pratschke S., Hubbard W.J., Chaudry I.H. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. Virulence. 2014;5(1):12-9. doi: 10.4161/viru.26982.

52. Angele M.K., Schwacha M.G., Ayala A., Chaudry I.H. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. Shock. 2000;14(2):81-90.

53. Angstwurm M.W., Gaertner R., Schopohl J. Outcome in elderly patients with severe infection is influenced by sex hormones but not gender. Crit Care Med. 2005;33(12):2786-93.

54. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001;29(7):1303-10.

55. Annane D. The role of ACTH and corticosteroids for sepsis and septic shock: an update. Front Endocrinol (Lausanne). 2016;7:70. doi: 10.3389/fendo.2016.00070.

56. Annane D., Fan E., Herridge M.S. Pro-con debate: steroid use in ACTH non-responsive septic shock patients with high baseline cortisol levels. Crit Care. 2006;10(2):210.

57. Araki T., Nishino M., Gao W. et al. Normal thymus in adults: appearance on CT and associations with age, sex, BMI and smoking. Eur Radiol. 2016;26(1):15-24. doi: 10.1007/s00330-015-3796-y.

58. Arens C., Bajwa S.A., Koch C. et al. Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. Crit Care. 2016;20:93. doi: 10.1186/s13054-016-1233-5.

59. Arnold A.P., Chen X., Itoh Y. What a difference an X or Y makes: sex chromosomes, gene dose, and epigenetics in sexual differentiation Handb Exp Pharmacol. 2012;214: 67–88.

60. Arnold A.P., Lusis A.J. Understanding the sexome. Endocrinol. 2011.

61. Arnold A.P. The end of gonad-centric sex determination in mammals. Trends Genet. 2012;28(2):55-61. doi: 10.1016/j.tig.2011.10.004.

62. Arnold A.P. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. Horm Behav. 2009b; 55:570–578.

63. Arnold A.P., van Nas A., Lusis A.J. Systems biology asks new questions about sex differences. Trends Endocrinol Metab. 2009; 20:471–476.

64. Arrieta M.C., Stiemsma L.T., Amenyogbe N., Brown E.M., Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. Front Immunol. 2014;5:427. doi: 10.3389/fimmu.2014.00427.

65. Arruvito L., Giulianelli S., Flores A.C. et al. NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. J Immunol. 2008;180(8):5746-53.

66. Artinger K., Kirsch A.H., Aringer I. et al. The Spleen Plays No Role in Nephrotoxic Serum Nephritis, but Constitutes a Place of Compensatory Haematopoiesis. PLoS One. 2015; 10(8): e0135087.

67. Asai K., Hiki N., Mimura Y. et al. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. Shock. 2001;16(5):340-3.

68. Aslan A.R., Kogan B.A., Gondos B. Testicular development. In: Polin R.A., Fox W.W., Abmans S.H., editors. Fetal and Neonatal Physiology. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004. pp. 1950–5.

69. Askanase A.D., Buyon J.P. Reproductive health in SLE. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2002;16(2):265-80.

70. Auerbach L., Hafner T., Huber J.C., Panzer S. Influence of low-dose oral contraception on peripheral blood lymphocyte subsets at particular phases of the hormonal cycle. Fertil Steril. 2002;78(1):83-9.

71. Aziz M., Yang W.L., Matsuo S. et al. Upregulation of GRAIL is associated with impaired CD4 T cell proliferation in sepsis. J Immunol. 2014;192(5):2305-14. doi: 10.4049/jimmunol.1302160.

72. Baeten J.M., Lavreys L., Overbaugh J. The influence of hormonal contraceptive use on HIV-1 transmission and disease progression. Clin Infect Dis. 2007;45(3):360-9.

73. Balk R. Roger C. Bone, MD and the evolving paradigms of sepsis. Contrib Microbiol. 2011;17:1–11.

74. Barakat R., Oakley O., Kim H., Jin J., Ko C.J. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. BMB Rep. 2016;49(9):488-96.

75. Barsness K.A., Bensard D.D., Partrick D.A. et al. IL-1beta induces an exaggerated pro- and anti-inflammatory response in peritoneal macrophages of children compared with adults. Pediatr Surg Int. 2004;20(4):238-42.

76. Bartlett J.A., Goldklang A.R., Schleifer S.J., Keller S.E. Immune function in healthy inner-city children. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8(4):740-6.

77. Battista JM., Tallmadge R.L., Stokol T., Felippe M.J. Hematopoiesis in the equine fetal liver suggests immune preparedness. Immunogenetics. 2014;66(11):635-49. doi: 10.1007/s00251-014-0799-9.

78. Beagley K.W., Gockel C.M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2003. http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00202-5.

79. Bebo B.F. Jr, Fyfe-Johnson A., Adlard K. et al. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. J Immunol. 2001;166(3):2080-9.

80. Beery T.A. Sex differences in infection and sepsis. Crit Care Nurs Clin North Am. 2003;15(1):55-62.

81. Beery A.K., Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. Neurosci Biobehav Rev. 2011;35:565–572.

82. Békési G., Kakucs R., Várbíró S. et al. In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. Steroids. 2000;65(12):889-94.

83. Bekesi G., Tulassay Z., Racz K. et al. The effect of estrogens on superoxide anion generation by human neutrophil granulocytes: possible consequences of the antioxidant defense. Gynecol Endocrinol. 2007;23(8):451-4.

84. Belderbos M.E., van Bleek G.M., Levy O. et al. Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life. Clin Immunol. 2009;133(2):228-37. doi: 10.1016/j.clim.2009.07.003.

85. Belot M.P., Abdennebi-Najar L., Gaudin F., Emilie D., Machelon V. Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation. J. Cell. Biochem. 2007a;102:1271–1280.

86. Belot, M.P., Abdennebi-Najar L., Gaudin F. et al. Progesterone reduces the migration of mast cells toward the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 with an accompanying decrease in CXCR4 receptors. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 2007b;292:E1410–E1417.

87. Benten W.P., Guo Z., Krücken J., Wunderlich F. Rapid effects of androgens in macrophages. Steroids. 2004;69(8-9):585-90.

88. Berletch J.B., Yang F., Disteche C.M. Escape from X inactivation in mice and humans. Genome Biol. 2010; 11:213.

89. Bernardi A.I., Andersson A., Stubelius A., Grahnemo L., Carlsten H., Islander U. Selective estrogen receptor modulators in T cell development and T cell dependent inflammation. Immunobiology. 2015;220(10):1122-8. doi: 10.1016/j.imbio.2015.05.009.

90. Billard M.J, Gruver A.L., Sempowski G.D. Acute endotoxin-induced thymic atrophy is characterized by intrathymic inflammatory and wound healing responses. PLoS One. 2011;6(3):e17940. doi: 10.1371/journal.pone.0017940.

91. Bindl L., Buderus S., Dahlem P. et al. Gender-based differences in children with sepsis and ARDS: the ESPNIC ARDS Database Group. Intensive Care Med. 2003;29(10):1770-3.

92. Bird M.D., Karavitis J., Kovacs E.J. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. Cell Immunol. 2008;252(1-2):57-67. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.09.007.

93. Blackwell T.S., Christman J.W. Sepsis and cytokines: current status. Br J Anaesth. 1996;77(1):110-7.

94. Blahnik M.J., Ramanathan R., Riley C.R., Minoo P. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates. Pediatr Res. 2001;50(6):726-31.

95. Blomkalns A.L., Stoll L.L., Shaheen W. et al. Low level bacterial endotoxin activates two distinct signaling pathways in human peripheral blood mononuclear cells. J Inflamm (Lond). 2011;8:4. doi: 10.1186/1476-9255-8-4.

96. Borchers A.T., Chang C., Gershwin M.E., Gershwin L.J. Respiratory syncytial virus—a comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol. 2013;45:331–79.

97. Boomer J.S., To K., Chang K.C. et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. JAMA. 2011;306(23):2594-605. doi: 10.1001/jama.2011.1829.

98. Boonen E., Vervenne H., Meersseman P. et al. Reduced cortisol metabolism during critical illness. N Engl J Med. 2013;368(16):1477-88. doi: 10.1056/NEJMoa1214969.

99. Bouman A., Schipper M., Heineman M.J., Faas M.M. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. Am J Reprod Immunol. 2004;52(1):19-26.

100. Brabin L. Interactions of the female hormonal environment, susceptibility to viral infections, and disease progression. AIDS Patient Care STDS. 2002 May;16(5):211-21.

101. Brandenberger A.W., Tee M.K., Lee J.Y., Chao V., Jaffe R.B. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(10):3509-12.

102. Breda L., Miulli E., Marzetti V., Chiarelli F., Marcovecchio M.L. Rheumatic fever: a disease still to be kept in mind. Rheumatology (Oxford) 2013;52:953.

103. Breithaupt-Faloppa A.C., Ferreira S.G., Kudo G.K. et al. Sex-related differences in lung inflammation after brain death. J Surg Res. 2016;200(2):714-21. doi: 10.1016/j.jss.2015.09.018.

104. Brereton C.F., Sutton C.E., Ross P.J. et al. Escherichia coli heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production. J. Immunol. 2011; 186:5896–5906.

105. Bronte V., Pittet M.J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. Immunity. 2013;39(5):806-18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010.

106. Brubaker A.L., Rendon J.L., Ramirez L., Choudhry M.A., Kovacs E.J. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. J Immunol. 2013;190(4):1746-57. doi: 10.4049/jimmunol.1201213.

107. Burgio G.R., Nespoli L., Varrasi G., Buzzi F. Bone marrow transplantation in children: between therapeutic and medico-legal problems. Bone Marrow Transplant. 1989;4(Suppl. 4):34-7.

108. Burgoyne P.S., Lovell-Badge R., Rattigan A. Evidence that the testis determination pathway interacts with a non-dosage compensated, X-linked gene. Int J Dev Biol. 2001;45(3):509-12.

109. Burgoyne P.S.; Mitchell M.J. The role of mouse Y chromosome genes in spermatogenesis. In: Lau, YFC.; Chan, WY., editors. Y Chromosome and Male Germ Cell Biology. Hackensack NJ: World Scientific Publishers; 2007. p. 27-45.

110. Burl S., Townend J., Njie-Jobe J. et al. Age-dependent maturation of Toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants. PLoS One. 2011;6(4):e18185. doi: 10.1371/journal.pone.0018185.

111. Butterworth M., McClellan B., Allansmith M. Influence of sex in immunoglobulin levels. Nature. 1967;214(5094):1224-5.

112. Butts C.L., Shukair S.A., Duncan K.M. et al. Evaluation of steroid hormone receptor protein expression in intact cells using flow cytometry. Nucl Recept Signal. 2007;5:e007.

113. Butts C.L., Shukair S.A., Duncan K.M. et al. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. Int Immunol. 2007;19(3):287-96.

114. Byskov A.G., Westergaard L.G. Differentiation of the ovary. In: Polin R.A., Fox W.W., Abman S.H. editors. Fetal and Neonatal Physiology. 3rd ed. Philadelphila: WB Saunders; 2004. pp. 1941–9.

115. Cabrera-Perez J. Condotta S.A., Badovinac V.P., Griffith T.S. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. J Leukoc Biol. 2014;96(5):767-77. doi: 10.1189/jlb.5MR0114-067R.

116. Cai J.J., Wen J., Jiang W.H. et al. Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. Geriatr Cardiol. 2016;13(2):183-96. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2016.02.003.

117. Calil I.L., Zarpelon A.C., Guerrero A.T. et al. Lipopolysaccharide induces inflammatory hyperalgesia triggering a TLR4/MyD88-dependent cytokine cascade in the mice paw. PLoS One. 2014;9(3):e90013. doi: 10.1371/journal.pone.0090013.

118. Canaday D.H., Amponsah N.A., Jones L. et al. Influenza-induced production of interferon-alpha is defective in geriatric individuals. J. Clin. Immunol. 2010; 30:373–383.

119. Caraty A., Locatelli A. Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. J Reprod Fertil.1988;82(1):263-9.

120. Carcillo J.A. Pediatric septic shock and multiple organ failure. Crit Care Clin. 2003;19(3):413-40, viii.

121. Card J.W., Carey M.A., Bradbury J.A. et al. Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation. J Immunol. 2006;177(1):621-30.

122. Carrel L., Willard H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. Nature. 2005; 434:400–404.

123. Carreras E., Turner S., Paharkova-Vatchkova V. et al. Estradiol acts directly on bone marrow myeloid progenitors to differentially regulate GM-CSF or Flt3 ligand-mediated dendritic cell differentiation. J Immunol. 2008;180(2):727-38.

124. Carvalho P.R., Feldens L., Seitz E.E. et al. Prevalence of systemic inflammatory syndromes at a tertiary pediatric intensive care unit. J Pediatr (Rio J). 2005;81(2):143-8.

125. Case L.K., Teuscher C. Y genetic variation and phenotypic diversity in health and disease. Biol Sex Differ. 2015;6:6. doi: 10.1186/s13293-015-0024-z.

126. Casimir G.J., Duchateau J. Gender differences in inflammatory processes could explain poorer prognosis for males. J Clin Microbiol. 2011;49(1):478-9. doi: 10.1128/JCM.02096-10.

127. Casimir G.J., Heldenbergh F., Hanssens L. Gender differences and inflammation: an in vitro model of blood cells stimulation in prepubescent children. J Inflamm (Lond). 2010;7:28. doi: 10.1186/1476-9255-7-28.

128. Cassidy R.A. Influence of steroids on oxidant generation in activated human granulocytes and mononuclear leukocytes. Shock. 2003;20:85–90.

129. Celentano L.P., Massari M., Paramatti D., Salmaso S., Tozzi A.E. Resurgence of pertussis in Europe. EUVAC-NET Group. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(9):761-5.

130. Chandra R., Federici S., Haskó G., Deitch E.A., Spolarics Z. Female X-chromosome mosaicism for gp91phox expression diversifies leukocyte responses during endotoxemia. Crit Care Med. 2010;38:2003–10.

131. Chang B.A., Huang Q., Quan J. et al. Early inflammation in the absence of overt infection in preterm neonates exposed to intensive care. Cytokine. 2011;56(3):621-6. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.028.

132. Chang C., Yeh S., Lee S.O., Chang T. Androgen receptor (AR) pathophysiological roles in androgen-related diseases in skin, bone/muscle, metabolic syndrome and neuron/immune systems: lessons learned from mice lacking AR in specific cells. Nucl Recept Signal. 2013; 11: e001. doi: 10.1621/nrs.11001.

133. Chao T.C., Chao H.H., Chen M.F., Greager J.A., Walter R.J. Female sex hormones modulate the function of LPS-treated macrophages. Am. J. Reprod. Immunol. 2000;44:310–318.

134. Chapman K.E., Coutinho A.E., Zhang Z. et al. Changing glucocorticoid action: 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation. J Steroid Biochem Mol Biol. 2013;137:82-92. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.02.002.

135. Charrel-Dennis M., Latz E., Halmen K.A. et al. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. Cell Host Microbe. 2008; 4:543–554.

136. Chassot A.A., Gregoire E.P., Magliano M., Lavery R., Chaboissier M.C. Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player. Sex Dev. 2008; 2:219–227.

137. Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y. et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. In Vivo. 2013;27(6):669-84.

138. Chen L.-C., Lan H., Sun L. et al. Genomic organization of the crested ibis MHC provides new insight into ancestral avian MHC structure. Sci. Rep. 2015;5:7963.Chen R.-Y., Fan Y.-M., Zhang

Q. et al. Estradiol inhibits Th17 cell differentiation through inhibition of RORγT transcription by recruiting the ERα/REA complex to estrogen response elements of the RORγT promoter. J. Immunol. 2015;194:4019–4028.

139. Chen Z., Ding T., Ma C.G. Dexmedetomidine (DEX) protects against hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury by suppressing inflammation and oxidative stress in NLRC5 deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2017. pii: S0006-291X(17)31553-X. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.017.

140. Chen Z., Shao Z., Mei S., et al. Sepsis Up-Regulates CD14 Expression in a MyD88 Dependent and Trif Independent Pathway. Shock. 2017. doi: 10.1097/SHK.0000000000000913.

141. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18:383–416.

142. Cheng C.C., Huang L.M., Kao C.L. et al. Molecular and clinical characteristics of adenoviral infections in Taiwanese children in 2004-2005. Eur J Pediatr. 2008;167(6):633-40.

143. Cheung G.Y., Otto M. Understanding the significance of Staphylococcus epidermidis bacteremia in babies and children. Curr. Opin. Infect. Dis. 2010; 23:208–216.

144. Chirico G. Development of the immune system in neonates. J Arab Neonatal Forum. 2005;2:5-11.

145. Choudhry M.A., Bland K.I., Chaudry I.H. Gender and susceptibility to sepsis following trauma. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2006;6(2):127-35.

146. Choudhry M.A., Bland K.I., Chaudry I.H. Trauma and immune response--effect of gender differences. Injury. 2007;38(12):1382-91.

147. Chuang K.H., Altuwaijri S., Li G. et al. Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor. J Exp Med. 2009;206(5):1181-99. doi: 10.1084/jem.20082521.

148. Cioffi M., Esposito K., Vietri M.T. et al. Cytokine pattern in postmenopause. Maturitas. 2002;41(3):187-92.

149. Claesson M.J., Cusack S., O'Sullivan O. et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108 Suppl 1:4586-91. doi: 10.1073/pnas.1000097107.

150. Clement L.T., Vink P.E., Bradley G.E. Novel immunoregulatory functions of phenotypically distinct subpopulations of CD4+ cells in the human neonate. J Immunol. 1990;145(1):102-8.

151. Clinton C. Development of the infant immune function and the effect of breast milk. Nat Med J.2010;2:3-6.

152. Coimbra R., Hoyt D.B., Potenza B.M., Fortlage D., Hollingsworth-Fridlund P. Does sexual dimorphism influence outcome of traumatic brain injury patients? The answer is no! J Trauma. 2003;54(4):689-700.

153. Coldewey S.M., Rogazzo M., Collino M., Patel N.S., Thiemermann C. Inhibition of IκB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. Dis Model Mech. 2013;6(4):1031-42. doi: 10.1242/dmm.012435.

154. Combes A., Luyt C.E., Trouillet J.L., Nieszkowska A., Chastre J. Gender impact on the outcomes of critically ill patients with nosocomial infections. Crit Care Med. 2009;37(9):2506-11. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181a569df.

155. Condotta S.A., Rai D., James B.R., Griffith T.S., Badovinac V.P. Sustained and incomplete recovery of naive CD8+ T cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8+ T cell responses to infection. J Immunol. 2013;190(5):1991-2000. doi: 10.4049/jimmunol.1202379.

156. Corbett N.P., Blimkie D., Ho K.C. et al. Ontogeny of Toll-like receptor mediated cytokine responses of human blood mononuclear cells. PLoS One. 2010;5(11):e15041. doi: 10.1371/journal.pone.0015041.

157. Corrales J.J., Almeida M., Miralles J.M., Orfao A. Persistence of androgenic effects on the production of proinflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells after withdrawal of testosterone treatment in aging type 2 diabetic men with partial androgen deficiency. Fertil Steril. 2009;92(1):311-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.040.

158. Couse J.F., Korach K.S. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. Ann Endocrinol (Paris). 1999;60(2):143-8.

159. Cresci G.A., Bawden E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. Nutr Clin Pract. 2015;30(6):734-46. doi: 10.1177/0884533615609899.

160. Cristofaro P.A., Opal S.M., Palardy J.E., et al. WAY-202196, a selective estrogen receptor-beta agonist, protects against death in experimental septic shock. Crit Care Med. 2006;34:2188–93.

161. Cui K., Luheshi G.N., Boksa P. Effects of endogenous glucocorticoid secretion on the interleukin-6 response to bacterial endotoxin in pregnant and non-pregnant rats. J Endocrinol. 2011;209(1):95-103. doi: 10.1530/JOE-10-0436.

162. Currie A.J., Curtis S., Strunk T. et al. Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. Infect. Immun. 2011; 79:1588–1596.

163. Cutolo M., Sulli A., Capellino S. et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. Lupus. 2004;13(9):635-8.

164. Dallman M.F. Moments in time--the neonatal rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Endocrinology. 2000;141(5):1590-2.

165. Danis B., George T.C., Goriely S. et al. Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol. 2008;38(2):507-17. doi: 10.1002/eji.200737760.

166. Dasari P., Zola H., Nicholson I.C. Expression of Toll-like receptors by neonatal leukocytes. Pediatr Allergy Immunol. 2011;22(2):221-8. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01091.x.

167. Davis D.P., Douglas D.J., Smith W. et al. Traumatic brain injury outcomes in pre- and post- menopausal females versus age-matched males. J Neurotrauma. 2006;23(2):140-8.

168. Davis S.M., Sweet L.M., Oppenheimer K.H., Suratt B.T., Phillippe M. Estradiol and progesterone influence on influenza infection and immune response in a mouse model. Am J Reprod Immunol. 2017. doi: 10.1111/aji.12695.

169. Davison S.L., Bell R. Androgen physiology. Semin Reprod Med. 2006;24(2):71-7.

170. Day Noorbibi K.B., Pickering R.J., Gewurz H., Good R A. Ontogenetic development of the complement system. Immunology. 1969; 16(3): 319–326.

171. De Kleer I., Willems F., Lambrecht B., Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. Front Immunol. 2014;5:423. doi: 10.3389/fimmu.2014.00423.

172. De León-Nava M.A., Nava K., Soldevila G. et al. Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009;113(1-2):57-64. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.11.003.

173. de Man Y.A., Dolhain R.J., van de Geijn F.E., Willemsen S.P., Hazes J.M. Disease activity of rheumatoid arthritis during pregnancy: results from a nationwide prospective study. Arthritis Rheum. 2008;59(9):1241-8. doi: 10.1002/art.24003.

174. de Melker H., Pebody R.G., Edmunds W.J., et al. The seroepidemiology of measles in Western Europe. Epidemiol Infect. 2001;126:249–59.

175. De Paepe M.E., Hanley L.C., Lacourse Z., Pasquariello T., Mao Q. Pulmonary dendritic cells in lungs of preterm infants: neglected participants in bronchopulmonary dysplasia? Pediatr Dev Pathol. 2011;14(1):20-7. doi: 10.2350/09-09-0709-OA.1.

176. De Vries G.J., Rissman E.F., Simerly R.B. et al. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. J Neurosci. 2002;22(20):9005-14.

177. De Wit D., Olislagers V., Goriely S., et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. Blood. 2004;103(3):1030-2.

178. Deasy B.M., Corsi K.A., Huard J. The sex of muscle stem cells: must it be taken into account? Med Sci (Paris). 2007;23(10):798-800.

179. Death A.K., McGrath K.C., Sader M.A. et al. Dihydrotestosterone promotes vascular cell adhesion molecule-1 expression in male human endothelial cells via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. Endocrinology. 2004;145(4):1889-97.

180. Delyani J.A., Murohara T., Nossuli T.O., Lefer A.M. Protection from myocardial reperfusion injury by acute administration of 17 beta-estradiol. J Mol Cell Cardiol. 1996;28(5):1001-8.

181. Derikx J.P., Luyer M.D., Heineman E., Buurman W.A. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. World J Gastroenterol. 2010;16(42):5272-9.

182. Diczfalusy E. Endocrine functions of the human fetoplacental unit. 1964. Am J Obstet Gynecol. 2005;193:2024

183. Dinapoli L, Capel B. SRY and the standoff in sex determination. Mol Endocrinol. 2008; 22:1–9.

184. Dominguez A., Plans P., Costa J., et al. Seroprevalence of measles, rubella, and mumps antibodies in Catalonia, Spain: results of a cross-sectional study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25:310–7.

185. Dominguez J.A., Samocha A.J., Liang Z. et al. Inhibition of IKKβ in enterocytes exacerbates sepsis-induced intestinal injury and worsens mortality. Crit Care Med. 2013;41(10):e275-85. doi: 10.1097/CCM.0b013e31828a44ed.

186. Donald P.R., Marais B.J., Barry C.E. 3rd. Age and the epidemiology and pathogenesis of tuberculosis. Lancet. 2010; 375:1852–1854.

187. Dossett L.A., Swenson B.R., Heffernan D. et al. High levels of endogenous estrogens are associated with death in the critically injured adult. J Trauma. 2008;64(3):580-5. doi: 10.1097/TA.0b013e31816543dd.

188. Dorshkind K., Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. Nat Rev Immunol. 2007;7(3):213-9.

189. Dulos J., Vijn P., van Doorn C., et al. Suppression of the inflammatory response in experimental arthritis is mediated via estrogen receptor alpha but not estrogen receptor beta. Arthritis Res Ther. 2010;12(3):R101. doi: 10.1186/ar3032.

190. Dursun H., Albayrak F., Uyanik A. et al. Effects of hypertension and ovariectomy on rat hepatocytes. Are amlodipine and lacidipine protective? (A stereological and histological study). Turk J Gastroenterol. 2010;21(4):387-95.

191. Eachempati S.R., Hydo L., Barie P.S. Gender-based differences in outcome in patients with sepsis. Arch Surg. 1999;134(12):1342-7.

192. Ely E.W., Angus D.C., Williams M.D. et al. Drotrecogin alfa (activated) treatment of older patients with severe sepsis. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2003;37:187-195,

193. Endo Y., Aharonoff G.B., Zuckerman J.D., Egol K.A., Koval K.J. Gender differences in patients with hip fracture: a greater risk of morbidity and mortality in men. J Orthop Trauma. 2005;19(1):29-35.

194. Engeland C.G., Sabzehei B., Marucha P.T. Sex hormones and mucosal wound healing. Brain Behav Immun. 2009;23(5):629-35. doi: 10.1016/j.bbi.2008.12.001.

195. Erickson R.P., Blecher S.R. Genetics of sex determination and differentiation. In: Polin R.A., Fox W.W., Abman S.H., editors. Fetal and Neonatal Physiology. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004. pp. 1935–41.

196. Erikoğlu M., Sahin M., Ozer S., Avunduk M.C. Effects of gender on the severity of sepsis. Surg Today. 2005;35(6):467-72.

197. Erlandsson M.C., Ohlsson C., Gustafsson J.A., Carlsten H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. Immunology. 2001;103(1):17-25.

198. Eshima N., Tokumaru O., Hara S. et al. Age-specific sex-related differences in infections: a statistical analysis of national surveillance data in Japan. PLoS One. 2012;7(7):e42261. doi: 10.1371/journal.pone.0042261.

199. Esteban E., Ferrer R., Alsina L., Artigas A. Immunomodulation in sepsis: the role of endotoxin removal by polymyxin B-immobilized cartridge. Mediators Inflamm. 2013;2013:507539. doi: 10.1155/2013/507539.

200. Faas M., Bouman A., Moesa H. et al. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? Fertil. Steril. 2000;74:1008–1013.

201. Faix J.D. Biomarkers of sepsis. Crit Rev Clin Lab Sci. 2013;50(1):23-36. doi: 10.3109/10408363.2013.764490.

202. Falagas M.E., Mourtzoukou E.G., Vardakas K.Z. Sex differences in the incidence and severity of respiratory tract infections. Respir Med. 2007;101:1845–63.

203. Fang H., Jiang W., Cheng J., Lu Y., Liu A., Kan L., Dahmen U. Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. J Immunol Res. 2015:187048. doi: 10.1155/2015/187048.

204. Feng J.Y., Liu K.T., Abraham E. et al. Serum estradiol levels predict survival and acute kidney injury in patients with septic shock--a prospective study. PLoS One. 2014;9(6):e97967. doi: 10.1371/journal.pone.0097967.

205. Filias A., Theodorou G.L., Mouzopoulou S. et al. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. BMC Pediatr. 2011;11:29. doi: 10.1186/1471-2431-11-29.

206. Finnerty C.C., Herndon D.N., Chinkes D.L., Jeschke M.G. Serum cytokine differences in severely burned children with and without sepsis. Shock. 2007;27(1):4-9.

207. Fish E.N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. Nat Rev Immunol. 2008;8(9):737-44. doi: 10.1038/nri2394.

208. Fleming D.M., Cross K.W., Cobb W.A., Chapman R.S. Gender difference in the incidence of shingles. Epidemiol Infect. 2004;132:1–5.

209. Fleming D.M., Elliot A.J. The impact of influenza on the health and health care utilisation of elderly people. Vaccine. 2005; 23(Suppl 1):S1–S9.

210. Foo Y.Z., Nakagawa S., Rhodes G., Simmons L.W. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. Biol Rev Camb Philos Soc. 2017;92(1):551-571. doi: 10.1111/brv.12243.

211. Förster-Waldl E., Sadeghi K., Tamandl D. et al. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. Pediatr Res. 2005;58(1):121-4.

212. Frink M., Hsieh Y.C., Thobe B.M. et al. TLR4 regulates Kupffer cell chemokine production, systemic inflammation and lung neutrophil infiltration following trauma-hemorrhage. Mol Immunol. 2007;44(10):2625-30.

213. Frink M., Pape H.C., van Griensven M. et al. Influence of sex and age on mods and cytokines after multiple injuries. Shock. 2007b;27(2):151-6.

214. Fry T.J, Mackall C.L. Current concepts of thymic aging. Springer Semin Immunopathol. 2002;24:7-22.

215. Fuller A., Yahikozawa H., So E.Y. et al. Castration of male C57L/J mice increases susceptibility and estrogen treatment restores resistance to Theiler's virus-induced demyelinating disease. J Neurosci Res. 2007;85(4):871-81.

216. Fulton N., Martins da Silva S.J., Bayne R.A., Anderson R.A. Germ cell proliferation and apoptosis in the developing human ovary. J Clin Endocrinol Metab.2005;90:4664–70.

217. Gabehart K., Correll K.A., Loader J.E., White C.W., Dakhama A. The lung response to ozone is determined by age and is partially dependent on toll-like receptor 4. Respir Res. 2015;16:117. doi: 10.1186/s12931-015-0279-2.

218. Gabrielli L., Bonasoni M.P., Santini D. et al. Congenital cytomegalovirus infection: patterns of fetal brain damage. Clin Microbiol Infect. 2012;18(10):E419-27. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03983.x.

219. Gaffen S.L., Hernández-Santos N., Peterson A.C. IL-17 signaling in host defense against Candida albicans. Immunol. Res. 2011; 50:181–187.

220. Gallichan W.S., Rosenthal K.L. Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract. Virology. 1996;224(2):487-97.

221. Gan Y.H. Interaction between Burkholderia pseudomallei and the host immune response: sleeping with the enemy? J. Infect. Dis. 2005; 192:1845–1850.

222. Gannon C.J., Pasquale M., Tracy J.K., McCarter R.J., Napolitano L.M. Male gender is associated with increased risk for postinjury pneumonia. Shock. 2004;21(5):410-4.

223. Garenne M. Sex differences in measles mortality: a world review. Int J Epidemiol. 1994;23:632–42.

224. Gasparoni A., Ciardelli L., Avanzini A. et al. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. Biol Neonate. 2003;84(4):297-303.

225. Gathings W.E., Lawton A.R., Cooper M.D. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. Eur J Immunol. 1977;7(11):804-10.

226. Gentile L.F., Nacionales D.C., Lopez M.C. et al. Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis. J Immunol. 2014;192(7):3156-65. doi: 10.4049/jimmunol.1301726.

227. George R.L., McGwin G. Jr, Metzger J., Chaudry I.H., Rue L.W. The association between gender and mortality among trauma patients as modified by age. J Trauma. 2003;54(3):464-71.

228. German J.B., Dillard C.J., Ward R.E. Bioactive components in milk. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2002;5(6):653-8.

229. Ghuman A.K., Newth C.J., Khemani R.G. Impact of gender on sepsis mortality and severity of illness for prepubertal and postpubertal children. J Pediatr. 2013;163(3):835-40.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.04.018.

230. Giannoni E., Guignard L., Knaup Reymond M. et al. Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. Infect Immun. 2011;79(7):2690-8. doi: 10.1128/IAI.00076-11.

231. Gibbons D., Fleming P., Virasami A. et al. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. Nat Med. 2014;20(10):1206-10. doi: 10.1038/nm.3670.

232. Giefing-Kröll C., Berger P., Lepperdinger G., Grubeck-Loebenstein B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. Aging Cell. 2015;14(3):309-21. doi: 10.1111/acel.12326.

233. Giglio T., Imro M.A., Filaci G. et al. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. Life Sci. 1994;54(18):1305-12.

234. Gillgrass A.E., Ashkar A.A., Rosenthal K.L., Kaushic C. Prolonged exposure to progesterone prevents induction of protective mucosal responses following intravaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. J Virol. 2003;77(18):9845-51.

235. Gilliver S.C. Sex steroids as inflammatory regulators. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;120(2-3):105-15. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.015.

236. Gilmore W.J., Hartmann G., Piquette-Miller M., Marriott J., Kirby G.M. Effects of lipopolysaccharide-stimulated inflammation and pyrazole-mediated hepatocellular injury on mouse hepatic Cyp2a5 expression. Toxicology. 2003;184(2-3):211-26.

237. Gilmore W.J., Kirby G.M. Endoplasmic reticulum stress due to altered cellular redox status positively regulates murine hepatic CYP2A5 expression. J Pharmacol Exp Ther. 2004;308(2):600-8.

238. Girard T.D., Opal S.M., Ely E.W. Insights into severe sepsis in older patients: from epidemiology to evidence-based management. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;40:719-727.

239. Girón-González J.A., Moral F.J., Elvira J. et al. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. Eur J Endocrinol. 2000;143(1):31-6.

240. Goldstein D.R. Role of aging on innate responses to viral infections. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2012; 67:242–246.

241. Gómez E., Ortiz V., Saint-Martin B. et al. Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: estradiol- and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle. Am J Reprod Immunol. 1993;29(4):219-23.

242. Gong S.L., Dong L.H., Liu G.W. et al. Effects of corticosterone, cAMP, cGMP, Ca2+, and protein kinase C on apoptosis of mouse thymocytes induced by X-ray irradiation. Biomed Environ Sci. 2008;21(2):167-72. doi: 10.1016/S0895-3988(08)60024-0.

243. Goodfellow P.N., Lovell-Badge R. SRY and sex determination in mammals. Annu Rev Genet. 1993;27:71-92.

244. Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. Development. 2011;138(18):3865-78. doi: 10.1242/dev.059998.

245. Goriely S., Van Lint C., Dadkhah R. et al. A defect in nucleosome remodeling prevents IL-12(p35) gene transcription in neonatal dendritic cells. J Exp Med. 2004;199(7):1011-6.

246. Gouel-Chéron A., Venet F., Allaouchiche B., Monneret G. CD4+ T-lymphocyte alterations in trauma patients. Crit Care. 2012;16(3):432. doi: 10.1186/cc11376.

247. Gow N.A., van de Veerdonk F.L., Brown A.J., Netea M.G. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat. Rev. Microbiol. 2011; 10:112–122.

248. Green M.S. The male predominance in the incidence of infectious diseases in children: a postulated explanation for disparities in the literature. Int J Epidemiol. 1992;21:381–6.

249. Grégoire M., Tadié J.M., Uhel F. et al. Frontline Science: HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock. J Leukoc Biol. 2017;101(6):1281-1287. doi: 10.1189/jlb.5HI0316-128RR.

250. Griffin D.E., Ward B.J., Esolen L.M. Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. J Infect Dis. 1994;170(Suppl 1):S24–31.

251. Griffin D.O., Holodick N.E., Rothstein T.L. Human B1 cells are CD3-: A reply to "A human equivalent of mouse B-1 cells?" and "The nature of circulating CD27+CD43+ B cells". J Exp Med. 2011;208(13):2566-9. doi: 10.1084/jem.20111761.

252. Griffioen A.W., Rijkers G.T., Janssens-Korpela P., Zegers B.J. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. Infect Immun. 1991; 59(5): 1839–1845.

253. Grimaldi C.M., Cleary J., Dagtas A.S., Moussai D., Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. J Clin Invest. 2002;109(12):1625-33.

254. Grossman C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. J Steroid Biochem. 1989;34(1-6):241-51.

255. Grubeck-Loebenstein B., Berger P., Saurwein-Teissl M., Zisterer K., Wick G. No immunity for the elderly. Nature medicine. 1998;4:870.

256. Grubeck-Loebenstein B., Wick G. The aging of the immune system. Adv Immunol. 2002;80: 243-284.

257. Guerra-Silveira F., Abad-Franch F. Sex bias in infectious disease epidemiology: patterns and processes. PLoS One. 2013 Apr 24;8(4):e62390. doi: 10.1371/journal.pone.0062390.

258. Guibourdenche J., Fournier T., Malassiné A., Evain-Brion D. Development and hormonal functions of the human placenta. Folia Histochem Cytobiol. 2009;47(5): S35-40. doi: 10.2478/v10042-009-0110-3.

259. Guo S., Dipietro L.A. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010;89(3):219-29. doi: 10.1177/0022034509359125.

260. Gupta S., Kumar N., Singhal N., Kaur R., Manektala U. Vaginal microflora in postmenopausal women on hormone replacement therapy. Indian J Pathol Microbiol. 2006;49(3):457-61.

261. Gutierrez J., Issacson R.S., Koppel B.S. Subacute sclerosing panencephalitis: an update. Dev Med Child Neurol. 2010;52:901–7.

262. Haberling D.L., Holman R.C., Paddock C.D., Murphy T.V. Infant and maternal risk factors for pertussis-related infant mortality in the United States, 1999 to 2004. Pediatr Infect Dis J. 2009 Mar;28(3):194-8. doi: 10.1097/INF.0b013e31818c9032.

263. Haddad R., Guimiot F., Six E. et al. Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. Immunity. 2006;24(2):217-30.

264. Hannet I, Erkeller-Yuksel F., Lydyard P., Deneys V., DeBruyère M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. Immunol Today. 1992;13(6):215, 218.

265. Haque S.F., Matsubayashi H., Izumi S. et al. Sex difference in platelet aggregation detected by new aggregometry using light scattering. Endocr J. 2001;48(1):33-41.

266. Härkönen P.L., Väänänen H.K. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators. Ann N Y Acad Sci. 2006;1089:218-27.

267. Harley V.R., Clarkson M.J., Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 (SRY-related high-mobility group (HMG) Box9) Endocr Rev. 2003;24:466–87.

268. Hebel K., Weinert S., Kuropka B. et al. CD4+ T cells from human neonates and infants are poised spontaneously to run a nonclassical IL-4 program. J Immunol. 2014;192(11):5160-70. doi: 10.4049/jimmunol.1302539.

269. Heldring N., Pike A., Andersson S. et al Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev. 2007;87(3):905-31.

270. Heng T.S., Goldberg G.L., Gray D.H. et al. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. J. Immunol. 2005;175(5):2982-93.

271. Hepworth M.R., Hardman M.J., Grencis R.K. The role of sex hormones in the development of Th2 immunity in a gender-biased model of Trichuris muris infection. Eur J Immunol. 2010;40(2):406-16. doi: 10.1002/eji.200939589.

272. Herold M.J., McPherson K.G., Reichardt H.M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. Cell Mol Life Sci. 2006;63(1):60-72.

273. Heymann D.L. NPHIs as focal points for leadership in prevention and control of infectious diseases. J Public Health Policy. 2008;29(3):374-6. doi: 10.1057/jphp.2008.19.

274. Hickey M., Emery L.I., Gregson J., Doherty D.A., Saunders C.M. The multidisciplinary management of menopausal symptoms after breast cancer: a unique model of care. Menopause. 2010;17(4):727-33. doi: 10.1097/gme.0b013e3181d672f6.

275. Hildebrand F., Hubbard W.J., Choudhry M.A. et al. Kupffer cells and their mediators: the culprits in producing distant organ damage after trauma-hemorrhage. Am J Pathol. 2006;169(3):784-94.

276. Hince M., Sakkal S., Vlahos K. et al. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. Cell Immunol. 2008;252(1-2):122-38. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.10.007.

277. Hirabayashi K., Shiohara M., Saito S. et al. Polymyxin-direct hemoperfusion for sepsis-induced multiple organ failure. Pediatr Blood Cancer. 2010;55(1):202-5. doi: 10.1002/pbc.22447.

278. Hirsiger S., Simmen H.P., Werner C.M., Wanner G.A., Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. Mediators Inflamm. 2012;2012:315941. doi: 10.1155/2012/315941.

279. Holley H.S., Behan M., Wenninger J.M. Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. Respir Physiol Neurobiol. 2012;180(1):79-87. doi: 10.1016/j.resp.2011.10.012.

280. Holt P.G. The role of genetic and environmental factors in the development of T-cell mediated allergic disease in early life. Paediatr Respir Rev. 2004;5 Suppl A:S27-30.

281. Hong M., Bertoletti A. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection. Semin Immunopathol. 2017. doi: 10.1007/s00281-017-0641-1.

282. Horeczko T., Green J.P., Panacek E.A. Epidemiology of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in the emergency department. West J Emerg Med. 2014;15(3):329-36. doi: 10.5811/westjem.2013.9.18064.

283. Hoser G.A., Skirecki T., Złotorowicz M., Zielińska-Borkowska U., Kawiak J. Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepsis and pneumonia-derived sepsis: a pilot study. Folia Histochem Cytobiol. 2012;50(3):420-6. doi: 10.5603/19751.

284. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. Lancet Infect Dis. 2013;13(3):260-8. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70001-X.

285. Hubacek J.A., Stüber F., Fröhlich D. et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. Crit Care Med. 2001;29(3):557-61.

286. Hughes G.C., Clark E.A. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. Autoimmunity. 2007;40:470–481.

287. Hughes G.C., Thomas S., Li C., Kaja M.K., Clark E.A. Cutting edge: progesterone regulates IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. J Immunol. 2008;180(4):2029-33.

288. Hviid A., Rubin S., Muhlemann K. Mumps. Lancet. 2008;371:932–44.

289. Igarashi H., Kouro T., Yokota T., Comp P.C., Kincade P.W. Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(26):15131-6.

290. Martin K.N., Osuchowski M.F., Stearns-Kurosawa D.J., et al. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. Physiol Rev. 2013; 93(3):1247–1288. doi: 10.1152/physrev.00037.2012.

291. Ishii T., Nishimura K., Nishimura M. Administration of xenobiotics with anti-estrogenic effects results in mRNA induction of adult male-specific cytochrome P450 isozymes in the livers of adult female rats. J Pharmacol Sci. 2006;101(3):250-5.

292. Iskander K.N., Osuchowski M.F., Stearns-Kurosawa D.J. et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. Physiol Rev. 2013;93(3):1247-88. doi: 10.1152/physrev.00037.2012.

293. Ivarsson M.A., Loh L., Marquardt N. et al. Differentiation and functional regulation of human fetal NK cells. J Clin Invest. 2013;123(9):3889-901. doi: 10.1172/JCI68989.

294. Jaffer U., Wade R.G., Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth. 2010;2(3):161-75.

295. Jaillon S., Berthenet K., Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. Clin Rev Allergy Immunol. 2017 Sep 30. doi: 10.1007/s12016-017-8648-x.

296. Jarrar D., Wang P., Cioffi W.G., Bland K.I., Chaudry I.H. The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;279(3):H1015-21.

297. Jennewein C., Tran N., Kanczkowski W. et al. Mortality of Septic Mice Strongly Correlates With Adrenal Gland Inflammation. Crit Care Med. 2016;44(4):e190-9. doi: 10.1097/CCM.0000000000001373.

298. Jia W., Cao L., Yang S. et al. Regulatory T cells are protective in systemic inflammation response syndrome induced by zymosan in mice. PLoS One. 2013;8(5):e64397. doi: 10.1371/journal.pone.0064397.

299. Jiang P.P., Hartl D.L., Lemos B. Y not a dead end: epistatic interactions between Y-linked regulatory polymorphisms and genetic background affect global gene expression in Drosophila melanogaster. Genetics. 2010; 186:109–118.

300. Jones L.A., Anthony J.P., Henriquez F.L. et al. Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. Immunology. 2008;125(1):59-69. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02820.x.

301. Josso N., Belville C., Dicard J.Y. Mutations in AMH and its receptors. Endocrinology. 2003;13:247–51.

302. Kahlke V., Dohm C., Mees T. et al. Early interleukin-10 treatment improves survival and enhances immune function only in males after hemorrhage and subsequent sepsis. Shock. 2002;18(1):24-8.

303. Kamada M., Irahara M., Maegawa M. et al. B cell subsets in postmenopausal women and the effect of hormone replacement therapy. Maturitas. 2001;37(3):173-9.

304. Kanczkowski W., Sue M., Bornstein S.R. Adrenal Gland Microenvironment and Its Involvement in the Regulation of Stress-Induced Hormone Secretion during Sepsis. Front Endocrinol (Lausanne). 2016;7:156. doi: 10.3389/fendo.2016.00156.

305. Kanda N., Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. J. Allergy Clin. Immunol. 1999;103:282–288.

306. Kanda N., Tsuchida T., Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. Clin. Exp. Immunol. 1996;106:410–415.

307. Kane S.V., Reddy D. Hormonal replacement therapy after menopause is protective of disease activity in women with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2008;103(5):1193-6. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01700.x.

308. Kangelaris K.N., Prakash A., Liu K.D. et al. Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015;308(11):L1102-13. doi: 10.1152/ajplung.00380.2014.

309. Karpuzoglu E., Phillips R.A., Dai R., Graniello C., Gogal R.M., Ahmed S.A. Signaltransducer and activation of transcription (STAT) 4beta, a shorter isoform of interleukin-12-induced STAT4, is preferentially activated by estrogen. Endocrinology. 2009;150:1310–1320.

310. Karpuzoglu E., Phillips R.A., Gogal R.M., Ansar Ahmed S. IFN-gamma-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12. Mol. Immunol. 2007;44:1808–1814. http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2006.08.005.

311. Kauffman A.S. Gonadal and non-gonadal regulation of sex differences in hypothalamic kiss1 neurons. J Neuroendocrinol. 2010; 22(7): 682–691.

312. Kelly-Scumpia K.M., Scumpia P.O., Weinstein J.S. et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. J Exp Med. 2011;208(8):1673-82. doi: 10.1084/jem.20101715.

313. Keselman A., Heller N. Estrogen Signaling Modulates Allergic Inflammation and Contributes to Sex Differences in Asthma. Front Immunol. 2015;6:568. doi: 10.3389/fimmu.2015.00568.

314. Kessler W., Diedrich S., Menges P. et al. The role of the vagus nerve: modulation of the inflammatory reaction in murine polymicrobial sepsis. Mediators Inflamm. 2012;467620. doi: 10.1155/2012/467620.

315. Khan K.N., Masuzaki H., Fujishita A. et al. Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. Hum Reprod. 2005;20(7):2004-13.

316. Khlystova Z.S., Kalinina I.I., Shmeleva S.P., Ryabchikov O.P. Development of endocrine and lymphocytopoietic functions of the thymus in human embryogenesis. Bull Exp Biol Med. 2000;130(10):1001-4.

317. Kinsella K. Urban and rural dimensions of global population aging: an overview. J Rural Health. 2001;17(4):314-22.

318. Kirsten T.B., Lippi L.L., Bevilacqua E., Bernardi M.M. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism. PLoS One. 2013;8(12):e82244. doi: 10.1371/journal.pone.0082244.

319. Kissick H.T., Sanda M.G., Dunn L.K. et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(27):9887-92. doi: 10.1073/pnas.1402468111.

320. Kitchens R.L., Thompson P.A., Viriyakosol S., O'Keefe G.E., Munford R.S. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. J Clin Invest. 2001;108(3):485-93.

321. Kittan N.A., Bergua A., Haupt S. et al. Impaired plasmacytoid dendritic cell innate immune responses in patients with herpes virus-associated acute retinal necrosis. J. Immunol. 2007; 179:4219–4230.

322. Kliegman R.M., Behrman R.E., Jenson H.B., Stanton B.F. Nelson Text Book of Pediatrics. 18th ed. Philadelphia:Saunders Elsevier; 2007. 3147 p.

323. Klein S.L., Flanagan K.L. Sex differences in immune responses. Nat Rev Immunol. 2016;16(10):626-38. doi: 10.1038/nri.2016.90.

324. Klein S.L., Marriott I., Fish E.N. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2015;109(1):9-15. doi: 10.1093/trstmh/tru167.

325. Klein S.L., Roberts C.W. Sex Hormones and Immunity to Infection // Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg – 2010 – Pp. 1-319.

326. Knöferl M.W., Angele M.K., Diodato M.D. et al. Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. Ann Surg. 2002;235(1):105-12.

327. Koch A., Meesters M.I., Scheller B., Boer C., Zacharowski K. Systemic endotoxin activity correlates with clot formation: an observational study in patients with early systemic inflammation and sepsis. Crit Care. 2013;17(5):R198. doi: 10.1186/cc12892.

328. Koh Y.T., Gray A., Higgins S.A., Hubby B., Kast W.M. Androgen ablation augments prostate cancer vaccine immunogenicity only when applied after immunization. Prostate. 2009;69(6):571-84. doi: 10.1002/pros.20906.

329. Kollmann T.R., Crabtree J., Rein-Weston A. et al. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. J Immunol. 2009;183(11):7150-60. doi: 10.4049/jimmunol.0901481.

330. Kollmann T.R., Levy O., Montgomery R.R., Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. Immunity. 2012;37(5):771-83. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.014.

331. Kong K.-F., Delroux K., Wang X. et al. Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. J.Virol. 2008; 82:7613–7623.

332. Konkle A.T., McCarthy M.M. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. Endocrinology. 2011;152(1):223-35. doi: 10.1210/en.2010-0607.

333. Koopman P. The delicate balance between male and female sex determining pathways: potential for disruption of early steps in sexual development. Int J Androl. 2010; 33:252–258.

334. Koskinas J., Gomatos I.P., Tiniakos D.G. et al. Liver histology in ICU patients dying from sepsis: a clinico-pathological study. World J Gastroenterol. 2008;14(9):1389-93.

335. Kosyreva A.M. The Sex Differences of Morphology and Immunology of SIRS of Newborn Wistar Rats. Int Sch Res Notices. 2014;2014:190749. doi: 10.1155/2014/190749.

336. Koziol-White C.J., Goncharova E.A., Cao G. et al. DHEA-S inhibits human neutrophil and human airway smooth muscle migration. Biochim Biophys Acta. 2012;1822(10):1638-42. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.06.012.

337. Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N. et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. PLoS Pathog. 2015;11(3):e1004651. doi: 10.1371/journal.ppat.1004651.

338. Kuypers E., Wolfs T.G., Collins J.J. et al. Intraamniotic lipopolysaccharide exposure changes cell populations and structure of the ovine fetal thymus. Reprod Sci. 2013;20(8):946-56. doi: 10.1177/1933719112472742.

339. Kyurkchiev D., Ivanova-Todorova E., Hayrabedyan S., Altankova I., Kyurkchiev S. Female sex steroid hormones modify some regulatory properties of monocytederived dendritic cells. Am. J. Reprod. Immunol. 2007;58:425–433.

340. Laffont S., Seillet C., Guéry J.C. Estrogen Receptor-Dependent Regulation of Dendritic Cell Development and Function. Front Immunol. 2017;8:108. doi: 10.3389/fimmu.2017.00108.

341. Lakhani S.A., Bogue C.W. Toll-like receptor signaling in sepsis. Curr. Opin. Pediatr. 2003;1:278–282.

342. Lang C., Gross U., Lüder C.G. Subversion of innate and adaptive immune responses by Toxoplasma gondii. Parasitol Res. 2007;100(2):191-203.

343. Lavoie P.M., Lavoie J.C., Watson C. et al. Inflammatory response in preterm infants is induced early in life by oxygen and modulated by total parenteral nutrition. Pediatr Res. 2010;68(3):248-51. doi: 10.1203/00006450-201011001-00485.

344. Lee C.E., Kim N.Y., Kim K.I. Effects of gender and gonadectomy on growth and plasma cholesterol levels in pigs. Nutr Res Pract. 2009;3(1):38-42. doi: 10.4162/nrp.2009.3.1.38.

345. Lee M.M. Molecular genetic control of sex differentiation. In: Pescovitz O.H., Eugster E.A., editors. Pediatric Endocrinology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004. pp. 231–42.

346. Lee S., Kim J., Jang B. et al. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. J Immunol. 2010;185(1):756-62. doi: 10.4049/jimmunol.0904192.

347. Leeansyah E., Loh L., Nixon D.F., Sandberg J.K. Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. Nat Commun. 2014;5:3143. doi: 10.1038/ncomms4143.

348. Lefèvre N., Noyon B., Biarent D. et al. Sex Differences in Inflammatory Response and Acid-Base Balance in Prepubertal Children with Severe Sepsis. Shock. 2017;47(4):422-428. doi: 10.1097/SHK.0000000000000773.

349. Lemos B., Branco A.T., Hartl D.L. Epigenetic effects of polymorphic Y chromosomes modulate chromatin components, immune response, and sexual conflict. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:15826–15831.

350. Leng J., Goldstein D.R. Impact of aging on viral infections. Microbes Infect. 2010; 12:1120–1124.

351. Lévêque M., Simonin-Le Jeune K., Jouneau S. et al. Soluble CD14 acts as a DAMP in human macrophages: origin and involvement in inflammatory cytokine/chemokine production. FASEB J. 2017;31(5):1891-1902. doi: 10.1096/fj.201600772R.

352. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. Nat Rev Immunol. 2007;7(5):379-90.

353. Lezama-Dávila C.M., Isaac-Márquez A.P., Barbi J. et al. Role of phosphatidylinositol-3-kinase-gamma (PI3Kgamma)-mediated pathway in 17beta-estradiol-induced killing of L. mexicana in macrophages from C57BL/6 mice. Immunol Cell Biol. 2008;86(6):539-43. doi: 10.1038/icb.2008.39.

354. Li L., Huang L., Sung S.S. et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN production and renal ischemia-reperfusion injury. J. Immunol. 2007;178:5899–5911.

355. Li L., Ma P., Liu Y. et al. Intermedin attenuates LPS-induced inflammation in the rat testis. PLoS One. 2013;8(6):e65278. doi: 10.1371/journal.pone.0065278.

356. Li S., Li X., Li J. et al. Experimental arterial thrombosis regulated by androgen and its receptor via modulation of platelet activation. Thromb Res. 2007;121(1):127-34.

357. Link J.C., Chen X., Prien C. et al. Increased high-density lipoprotein cholesterol levels in mice with XX versus XY sex chromosomes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(8):1778-86. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305460.

358. Lisciandro J.G., Prescott S.L., Nadal-Sims M.G. et al. Ontogeny of Toll-like and NOD-like receptor-mediated innate immune responses in Papua New Guinean infants. PLoS One. 2012;7(5):e36793. doi: 10.1371/journal.pone.0036793.

359. Lissauer D., Eldershaw S.A., Inman C.F. et al. Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. Eur J Immunol. 2015;45(10):2858-72. doi: 10.1002/eji.201445404.

360. Lisse I.M., Aaby P., Whittle H. et al. T-lymphocyte subsets in West African children: impact of age, sex, and season. J Pediatr. 1997;130(1):77-85.

361. Liu Z., Pelfrey C.M., Cotleur A., Lee J.C., Rudick R.A. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2001;112(1-2):153-62.

362. Loftus T.J., Mira J.C., Ozrazgat-Baslanti T., et al. Center investigators: protocols and standard operating procedures for a prospective cohort study of sepsis in critically ill surgical patients. BMJ Open 2017;7:e015136. doi:10.1136/bmjopen-2016-015136.

363. Looijer-van Langen M., Hotte N., Dieleman L.A. et al. Estrogen receptor-β signaling modulates epithelial barrier function. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(4):G621-6. doi: 10.1152/ajpgi.00274.2010.

364. Louw-du Toit R., Hapgood J.P., Africander D. Medroxyprogesterone acetate differentially regulates interleukin (IL)-12 and IL-10 in a human ectocervical epithelial cell line in a glucocorticoid receptor (GR)-dependent manner. J Biol Chem. 2014;289(45):31136-49. doi: 10.1074/jbc.M114.587311.

365. Lozupone C.A., Stombaugh J., Gonzalez A. et al. Meta-analyses of studies of the human microbiota. Genome Res. 2013;23(10):1704-14. doi: 10.1101/gr.151803.112.

366. Love P.E., Bhandoola A. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. Nat Rev Immunol. 2011;11(7):469-77. doi: 10.1038/nri2989.

367. Lv B., Huang J., Yuan H. et al. Tumor necrosis factor-α as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a meta-analysis. ScientificWorldJournal. 2014;2014:471463. doi: 10.1155/2014/471463.

368. Lu F.X., Abel K., Ma Z. et al. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8(+) T cells under the influence of ovarian steroid hormones. Clin. Exp. Immunol. 2002;128:10–20.

369. Luan Y.Y., Yao Y.M., Xiao X.Z., Sheng Z.Y. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. J Interferon Cytokine Res. 2015;35(1):17-22. doi: 10.1089/jir.2014.0069.

370. Lucki N.C., Sewer M.B. Multiple roles for sphingolipids in steroid hormone biosynthesis. Subcell Biochem. 2008;49:387-412. doi: 10.1007/978-1-4020-8831-5_15.

371. Luster A.D. Chemokines regulate lymphocyte homing to the intestinal mucosa. Gastroenterology. 2001;120(1):291-4.

372. Machado F.R., Cavalcanti A.B., Bozza F.A. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. Lancet Infect Dis. 2017. pii: S1473-3099(17)30322-5. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30322-5.

373. Mackroth M.S., Malhotra I., Mungai P., Koech D., Muchiri E., King C.L. Human cord blood CD4+CD25hi regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to Plasmodium falciparum antigens. J Immunol. 2011;186(5):2780-91. doi: 10.4049/jimmunol.1001188.

374. Magata F., Horiuchi M., Miyamoto A., Shimizu T. Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. J Reprod Dev. 2014;60(4):280-7.

375. Magoffin D.A. Ovarian theca cell. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(7):1344-9.

376. Majetschak M., Christensen B., Obertacke U. et al. Sex differences in posttraumatic cytokine release of endotoxin-stimulated whole blood: relationship to the development of severe sepsis. J Trauma. 2000 May;48(5):832-9.

377. Maki D.G., Stolz S.M., Wheeler S., Mermel L.A. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter. Arandomized, controlled trial. Ann Intern Med. 1997;127: 257-266.

378. Manayani D.J., Abraham M., Gnanamuthu C. et al. SSPE—the continuing challenge: a study based on serological evidence from a tertiary care centre in India. Indian J Med Microbiol. 2002;20:16–8.

379. Mancuso G., Gambuzza M., Midiri A. et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. Nat. Immunol. 2009; 10:587–594.

380. Mani V.R., Pradhan L., Gray S. Development of pneumoperitoneum after CPR. Int J Surg Case Rep. 2015;6C:40-2. doi: 10.1016/j.ijscr.2014.11.034.

381. Margaryan S, Hyusyan A, Martirosyan A, Sargsian S, Manukyan G. Differential modulation of innate immune response by epinephrine and estradiol. Horm Mol Biol Clin Investig.

2017;30(3). pii: /j/hmbci.2017.30.issue-3/hmbci-2016-0046/hmbci-2016-0046.xml. doi: 10.1515/hmbci-2016-0046.

382. Marik P.E., Zaloga G.P. The effect of aging on circulating levels of proinflammatory cytokines during septic shock. Norasept II Study Investigators. J Am Geriatr Soc. 2001;49:5-9.

383. Marinda E., Humphrey J.H., Iliff P.J., et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. Pediatr Infect Dis J. 2007;26:519–26.

384. Marriott I., Bost K.L., Huet-Hudson Y.M. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: a possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. J Reprod Immunol. 2006;71(1):12-27.

385. Markwart R., Condotta S.A, Requardt R.P. Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naïve T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. PLoS One. 2014;9(12):e115094. doi: 10.1371/journal.pone.0115094.

386. Marshall J.C., Foster D., Vincent J.L. et al. Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. J Infect Dis. 2004;190(3):527-34.

387. Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. 2003;348(16):1546-54.

388. Martin G.S., Mannino D.M., Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. Critical care medicine. 2006;34:15-21.

389. Matamoros S., Gras-Leguen C., Le Vacon F., Potel G., de La Cochetiere M.F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. Trends Microbiol. 2013;21(4):167-73. doi: 10.1016/j.tim.2012.12.001.

390. Matter M.L., Shvetsov Y.B., Dugay C. et al. High mortality due to sepsis in Native Hawaiians and African Americans: The Multiethnic Cohort. PLoS One. 2017;12(5):e0178374. doi: 10.1371/journal.pone.0178374.

391. Mayo J.C., Sáinz R.M., Antolín I. et al. Androgen-dependent mast cell degranulation in the Harderian gland of female Syrian hamsters: in vivo and organ culture evidence. Anat Embryol (Berl). 1997;196(2):133-40.

392. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. 2014;5(1):4-11. doi: 10.4161/viru.27372.

393. Mayr S., Walz C.R., Angele P. et al. Castration prevents suppression of MHC class II (Ia) expression on macrophages after trauma-hemorrhage. J Appl Physiol (1985). 2006;101(2):448-53.

394. McCarthy M., Auger D., Whittemore S.R. Human cytomegalovirus causes productive infection and neuronal injury in differentiating fetal human central nervous system neuroepithelial precursor cells. J Hum Virol. 2000;3(4):215-28.

395. McCarthy M.M. Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. Dialogues Clin Neurosci. 2016;18(4):361-372.

396. McGreal E.P., Hearne K., Spiller O.B. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. Immunobiology. 2012;217(2):176-86. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.027.

397. McMurray R.W., Suwannaroj S., Ndebele K., Jenkins J.K. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. Pathobiology. 2001;69(1):44-58.

398. Medina K.L., Strasser A., Kincade P.W. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. Blood. 2000;95(6):2059-67.

399. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997;388(6640):394-7.

400. Megremis S.D., Vlachonikolis I.G., Tsilimigaki A.M. Spleen length in childhood with US: normal values based on age, sex, and somatometric parameters. Radiology. 2004;231(1):129-34.

401. Melchjorsen J. Sensing herpes: More than toll. Rev. Med. Virol. 2012; 22:106–121.

402. Merkel S.M., Alexander S., Zufall E., Oliver J.D., Huet-Hudson Y.M. Essential role for estrogen in protection against Vibrio vulnificus-induced endotoxic shock. Infect Immun. 2001;69(10):6119-22.

403. Meseguer A., Puche C., Cabero A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. Horm Metab Res. 2002;34(11-12):731-6.

404. Mesiano S., Jaffe R.B. Neuroendocrine-metabolic regulation of pregnancy. In: Strauss JF 3rd, Barbieri R.L. editors. Reproductive Endocrinology. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004. pp. 327–66.

405. Migeon B.R. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. JAMA. 2006;295(12):1428-33.

406. Miller R.A. The aging immune system: primer and prospectus. Science 1996;273:70-74.

407. Minderhoud T.C., Spruyt C., Huisman S. et al. Microbiological outcomes and antibiotic overuse in Emergency Department patients with suspected sepsis. The Netherlands Journal of Medicine. 2017;75(5):196-203.

408. Mira J.P., Max A., Burgel P.R. The role of biomarkers in community-acquired pneumonia: predicting mortality and response to adjunctive therapy. Crit. Care. 2008; 12(Suppl 6):S5.

409. Mohamed A.K.S., Mehta A.A., James P. Predictors of mortality of severe sepsis among adult patients in the medical Intensive Care Unit. Lung India. 2017;34(4):330-335. doi: 10.4103/lungindia.lungindia_54_16.

410. Mold J.E., Venkatasubrahmanyam S., Burt T.D. et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. Science. 2010;330(6011):1695-9. doi: 10.1126/science.1196509.

411. Molloy E.J., O'Neill A.J., Grantham J.J. et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. Blood. 2003;102(7):2653-9.

412. Monteiro R., Teixeira D., Calhau C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. Mediators Inflamm. 2014:615917. doi: 10.1155/2014/615917.

413. Mook P., Patel B., Gillespie I.A. Risk factors for mortality in non-pregnancy-related listeriosis. Epidemiol. Infect. 2012; 140:706–715.

414. Moriceau S., Roth T.L., Okotoghaide T., Sullivan R.M. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. Int J Dev Neurosci. 2004;22(5-6):415-22.

415. Mossong J., O'Callaghan C.J., Ratnam S. Modelling antibody response to measles vaccine and subsequent waning of immunity in a low exposure population. Vaccine. 2000;19:523–9.

416. Moxley G., Stern A.G., Carlson P. et al. Premenopausal sexual dimorphism in lipopolysaccharide-stimulated production and secretion of tumor necrosis factor. J Rheumatol. 2004;31(4):686-94.

417. Mueller N.H., Gilden D.H., Cohrs R.J., Mahalingam R., Nagel M.A. Varicella zoster virus infection: Clinical features, molecular pathogenesis of disease, and latency. Neurol. Clin. 2008; 26:675–697. viii.

418. Muenchhoff M., Goulder P.J. Sex differences in pediatric infectious diseases. J Infect Dis. 2014;209 Suppl 3:S120-6. doi: 10.1093/infdis/jiu232.

419. Munoz-Cruz S., Togno-Pierce C., Morales-Montor J. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. Curr. Top. Med. Chem. 2011;11:1714–1727.

420. Muszynski J.A., Nofziger R., Greathouse K. et al. Early adaptive immune suppression in children with septic shock: a prospective observational study. Crit Care. 2014;18(4):R145. doi: 10.1186/cc13980.

421. Nabhani Z.A., Dietrich G., Hugot J.-P., Barreau F. Nod2: The intestinal gate keeper. PLoS Pathog. 2017;13(3): e1006177. doi: 10.1371/journal.ppat.1006177.

422. Nachtigall I., Tafelski S., Rothbart A. et al. Gender-related outcome difference is related to course of sepsis on mixed ICUs: a prospective, observational clinical study. Crit Care. 2011;15(3):R151. doi: 10.1186/cc10277.

423. Nagayama Y., Tsubaki T., Nakayama S., et al. Gender analysis in acute bronchiolitis due to respiratory syncytial virus. Pediatr Allergy Immunol. 2006;17:29–36.

424. Nair H., Nokes D.J., Gessner B.D, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2010;375:1545–55.

425. Nalbandian G., Kovats S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. Immunol Res. 2005;31(2):91-106.

426. Napolitano L.M., Greco M.E., Rodriguez A. et al. Gender differences in adverse outcomes after blunt trauma. J Trauma. 2001;50(2):274-80.

427. Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A. Kupffer Cell Metabolism and Function. J Enzymol Metab. 2015;1(1). pii: 101.

428. Nichols H.B., Trentham-Dietz A., Hampton J.M. et al. From menarche to menopause: trends among US Women born from 1912 to 1969. Am J Epidemiol. 2006;164(10):1003-11.

429. Nieschlag E., Kumar N., Sitruk-Ware R. 7α-methyl-19-nortestosterone (MENTR): the population council's contribution to research on male contraception and treatment of hypogonadism. Contraception. 2013;87(3):288-95. doi: 10.1016/j.contraception.2012.08.036.

430. Norata G.D., Tibolla G., Seccomandi P.M., Poletti A., Catapano A.L. Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(2):546-54.

431. Nussbaum C., Gloning A., Pruenster M. et al. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. J Leukoc Biol. 2013;93(2):175-84. doi: 10.1189/jlb.0912468.

432. O'Brien J.M.Jr., Abraham E. New approaches to the treatment of sepsis. Clin. Chest Med. 2003;24:521–548.

433. O'Connor M.-F., Motivala S.J., Valladares E.M., Olmstead R., Irwin M.R. Sex differences in monocyte expression of IL-6: role of autonomic mechanisms. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007;293:R145–R151.

434. O'Connor T.G., Moynihan J.A., Wyman P.A. et al. Depressive symptoms and immune response to meningococcal conjugate vaccine in early adolescence. Dev Psychopathol. 2014;26:1567-76. doi: 10.1017/S0954579414001242.

435. O'Hara A.M., O'Regan P., Fanning A. et al. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius. Immunology. 2006;118:202–215.

436. Ober C., Loisel D.A., Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. Nat Rev Genet. 2008;9:911–922.

437. Oertelt-Prigione S. Immunology and the menstrual cycle. Autoimmun Rev. 2012;11(6-7):A486-92. doi: 10.1016/j.autrev.2011.11.023.

438. Oettel M., Mukhopadhyay A.K. Progesterone: the forgotten hormone in men? Aging Male. 2004;7(3):236-57.

439. Offner P.J., Moore E.E., Biffl W.L. Male gender is a risk factor for major infections after surgery. Arch Surg. 1999;134(9):935-8.

440. Olsen N.J., Kovacs W.J. Evidence that androgens modulate human thymic T cell output. J Investig Med. 2011;59(1):32-5.

441. Omran M.H., Ibrahim N.E., Youssef S.S. et al. Relation of interleukin-1β gene to treatment response in chronic patients infected with HCV genotype 4. J Infect Dev Ctries. 2013 Nov 15;7(11):851-8. doi: 10.3855/jidc.3823.

442. Ono Y., Sakamoto K. Lipopolysaccharide inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts through the Toll-like receptor 4-nuclear factor-κB signaling pathway and myoblast-derived tumor necrosis factor-α. PLoS One. 2017;12(7):e0182040. doi: 10.1371/journal.pone.0182040.

443. Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines. Chest. 2000;117:1162–1172.

444. Opal S.M., Huber C.E. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. Crit. Care. 2002;6:125–136.

445. Openshaw P.J., Tregoning J.S. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. Clin Microbiol Rev. 2005;18:541–55.

446. Ottenhoff T.H., Verreck F.A., Hoeve M.A., van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. Tuberculosis (Edinb.). 2005; 85:53–64.

447. Page S.T., Plymate S.R., Bremner W.J. et al. Effect of medical castration on CD4+ CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-gamma expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290(5):E856-63.

448. Palaszynski K.M., Smith D.L., Kamrava S. et al. A yin-yang effect between sex chromosome complement and sex hormones on the immune response. Endocrinology. 2005;146(8):3280-5.

449. Palmer A.C. Nutritionally mediated programming of the developing immune system. Adv Nutr. 2011;2(5):377-95. doi: 10.3945/an.111.000570.

450. Pålsson-McDermott E.M., O'Neill L.A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology. 2004 Oct;113(2):153-62.

451. Paquette A., Wang D., Jankowski M., Gutkowska J., Lavoie J.M. Effects of ovariectomy on PPAR alpha, SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. Menopause. 2008;15(6):1169-75. doi: 10.1097/gme.0b013e31817b8159.

452. Park S.Y., Jameson J.L. Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. Endocrinology. 2005;146:1035–42

453. Pauklin S., Sernández I.V., Bachmann G., Ramiro A.R., Petersen-Mahrt S.K. Estrogen directly activates AID transcription and function. J. Exp.Med. 2009;206:99–111.

454. Paul W. E. Fundamental immunology. – Lippincott-Raven, New-York, 1999.

455. Pavare J., Grope I., Gardovska D. Prevalence of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in hospitalized children: a point prevalence study. BMC Pediatr. 2009;9:25. doi: 10.1186/1471-2431-9-25.

456. Pejcić-Karapetrović B., Kosec D., Leposavić G. Differential effects of male and female gonadal hormones on the intrathymic T cell maturation. Dev Immunol. 2001;8(3-4):305-17.

457. Peltier M.R., Tee S.C., Smulian J.C. Effect of progesterone on proinflammatory cytokine production by monocytes stimulated with pathogens associated with preterm birth. Am. J. Reprod. Immunol. 2008;60:346–353.

458. Pena O.M., Hancock D.G., Lyle N.H. et al. An endotoxin tolerance signature predicts sepsis and organ dysfunction at initial clinical presentation. EBioMedicine. 2014;1(1):64-71.

459. Pena O.M., Pistolic J., Raj D., Fjell C.D., Hancock R.E. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. J Immunol. 2011;186(12):7243-54. doi: 10.4049/jimmunol.1001952.

460. Pereira C.D., Azevedo I., Monteiro R., Martins M.J. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Diabetes Obes Metab. 2012;14(10):869-81. doi: 10.1111/j.1463-1326.2012.01582.x.

461. Perl M., Chung C.S., Garber M., Huang X., Ayala A. Contribution of anti-inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis. Front. Biosci. 2006;11:272–299.

462. Pernis A.B. Estrogen and CD4+ T cells. Curr Opin Rheumatol. 2007;19(5):414-20.

463. Phiel K.L., Henderson R.A., Adelman S.J., Elloso M.M. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. Immunol Lett. 2005;97(1):107-13.

464. Picone O., Costa J.M., Dejean A., Ville Y. Is fetal gender a risk factor for severe congenital cytomegalovirus infection? Prenat Diagn. 2005;25(1):34-8.

465. Pihlgren M., Friedli M., Tougne C., Rochat A.F., Lambert P.H., Siegrist C.A. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. J Immunol. 2006;176(1):165-72.

466. Pinsky M.R., Hellstrom W.J. Hypogonadism, ADAM, and hormone replacement. Ther Adv Urol. 2010;2(3):99-104. doi: 10.1177/1756287210369805.

467. Pioli P.A., Jensen A.L., Weaver L.K. et al. Estradiol attenuates lipopolysaccharide-induced CXC chemokine ligand 8 production by human peripheral blood monocytes. J. Immunol. 2007;179:6284–6290.

468. Pisetsky D.S., Spencer D.M. Effects of progesterone and estradiol sex hormones on the release of microparticles by RAW 264.7 macrophages stimulated by poly(I:C). Clin. Vaccine Immunol. 2011;18:1420–1426.

469. Plitas G., Rudensky A.Y. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. Cancer Immunol Res. 2016 Sep 2;4(9):721-5. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0193.

470. Ploder M., Kurz K., Spittler A. et al. Early increase of plasma homocysteine in sepsis patients with poor outcome. Mol Med. 2010;16(11-12):498-504. doi: 10.2119/molmed.2010.00008.

471. Pomara C., Riezzo I., Bello S. et al. A Pathophysiological Insight into Sepsis and Its Correlation with Postmortem Diagnosis. Mediators Inflamm. 2016;2016:4062829. doi: 10.1155/2016/4062829.

472. Posfay-Barbe K.M., Wald E.R. Listeriosis. Semin. Fetal Neonatal Med. 2009; 14:228–233.

473. Posma E., Moes H., Heineman M.J., Faas M.M. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. Am. J. Reprod. Immunol. 2004;52:237–243. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00216.x.

474. Pourakbari B., Mamishi S., Zafari J. et al. Evaluation of procalcitonin and neopterin level in serum of patients with acute bacterial infection. Braz J Infect Dis. 2010;14(3):252-5.

475. Pozzesi N., Fierabracci A., Liberati A.M. et al. Role of caspase-8 in thymus function. Cell Death Differ. 2014;21(2):226-33. doi: 10.1038/cdd.2013.166.

476. Pravda J. Metabolic theory of septic shock. World J Crit Care Med. 2014;3(2):45-54. doi: 10.5492/wjccm.v3.i2.45.

477. Purves H., Griesbach W. The significance of the gomory staining of the basophils of the rat pituitary // Endocrinol.1957;49:652-662.

478. Quach C., Piché-Walker L., Platt R., Moore D. Risk factors associated with severe influenza infections in childhood: implication for vaccine strategy. Pediatrics. 2003;112(3 Pt 1):e197-201.

479. Quintar A.A., Roth F.D., De Paul A.L., Aoki A., Maldonado C.A. Toll-like receptor 4 in rat prostate: modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. Biol Reprod. 2006;75(5):664-72.

480. Rajagopalan S., Yoshikawa T.T. Antimicrobial therapy in the elderly. Med Clin North Am. 2001;85:133-147.

481. Raju R., Bland K.I., Chaudry I.H. Estrogen: a novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. Mol Med. 2008;14(3-4):213-21. doi: 10.2119/2008-00001.

482. Rayamajhi M., Humann J., Kearney S., Hill K.K., Lenz L.L. Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. Virulence. 2010; 1:418–422.

483. Ramsey J.M., Schwarz E., Guest P.C. et al. Molecular sex differences in human serum. PLoS One. 2012;7(12):e51504. doi: 10.1371/journal.pone.0051504.

484. Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. Development of secondary lymphoid organs. Annu Rev Immunol. 2008;26:627-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090257.

485. Rappold J.F., Coimbra R., Hoyt D.B. et al. Female gender does not protect blunt trauma patients from complications and mortality. J Trauma. 2002;53(3):436-41.

486. Reece P., Thanendran A., Crawford L.J. et al. Maternal allergy modulates cord blood hematopoietic progenitor Toll-like receptor expression and function. Allergy Clin Immunol. 2011 Feb;127(2):447-53. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.006.

487. Regitz-Zagrosek V., Lehmkuhl E., Weickert M.O. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. Clin Res Cardiol. 2006; 95:136–147.

488. Reichert T.A., Simonsen L., Sharma A. et al. Influenza and the winter increase in mortality in the United States, 1959–1999. Am. J. Epidemiol. 2004; 160:492–502.

489. Reinhart K., Brunkhorst F.M., Bone H.G. et al. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). Ger Med Sci. 2010;8:Doc14. doi: 10.3205/000103.

490. Resko J.A., Pereyra-Martinez A.C., Stadelman H.L., Roselli C.E. Cellular observations and hormonal correlates of feedback control of luteinizing hormone secretion by testosterone in long-term castrated male rhesus monkeys. Biol Reprod.2000;63(3):872-8.

491. Rettew J.A., Huet-Hudson Y.M., Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. Biol Reprod. 2008;78(3):432-7.

492. Rettew J.A., Huet Y.M., Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. Endocrinology. 2009;150(8):3877-84. doi: 10.1210/en.2009-0098.

493. Rezzani R., Nardo .L, Favero G., Peroni M., Rodella L.F. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. Age (Dordr). 2014;36(1):313-51. doi: 10.1007/s11357-013-9564-5.

494. Rhee R.J., Carlton S., Chung C.S. et al. Inhibition of CD1d activation suppresses septic mortality: a role for NK-T cells in septic immune dysfunction. J. Surg. Res. 2003;115:74–81.

495. Rimmelé T., Payen D., Cantaluppi V. et al. Immune cell phenotype and function in sepsis. Shock. 2016;45(3):282-91. doi: 10.1097/SHK.0000000000000495.

496. Rittirsch D., Flierl M.A., Ward P.A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. Nat. Rev. Immunol. 2008;8:776–787.

497. Rivero J.C., Inoue Y., Murakami N., Horii Y. Age- and sex-related changes in susceptibility of Wistar rats to Strongyloides venezuelensis infection. J Vet Med Sci. 2002;64(6):519-21.

498. Roberts C.W., Walker W., Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):476-88.

499. Rosas L.E., Barbi J., Lu B. et al. CXCR3-/- mice mount an efficient Th1 response but fail to control Leishmania major infection. Eur J Immunol. 2005;35(2):515-23.

500. Roved J., Westerdahl H., Hasselquist D. Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. Horm Behav. 2017;88:95-105. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.017.

501. Ruel T.D., Zanoni B.C., Ssewanyana I. et al. Sex differences in HIV RNA level and CD4 cell percentage during childhood. Clin Infect Dis. 2011;53(6):592-9. doi: 10.1093/cid/cir484.

502. Sadeghi K., Berger A., Langgartner M. et al. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. J Infect Dis. 2007;195(2):296-302.

503. Sajjad Y., Quenby S., Nickson P., Lewis-Jones D.I., Vince G. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the urogenital tracts of human embryos. Reproduction. 2004;128:331–9.

504. Sakiani S., Olsen N.J., Kovacs W.J. Gonadal steroids and humoral immunity. Nat Rev Endocrinol. 2013;9(1):56-62. doi: 10.1038/nrendo.2012.206.

505. Sakr Y., Elia C., Mascia L. et al. The influence of gender on the epidemiology of and outcome from severe sepsis. Crit Care. 2013 Mar 18;17(2):R50. doi: 10.1186/cc12570.

506. Salazar N., Arboleya S., Valdés L. et al. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. Front Genet. 2014;5:406. doi: 10.3389/fgene.2014.00406.

507. Sands K.E., Bates D.W., Lanken P.N. et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. JAMA, 1997278 (3): 234-40.

508. Sanz E., Muñoz-A N., Monserrat J. et al. Ordering human CD34+CD10-CD19+ pre/pro-B-cell and CD19- common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(13):5925-30. doi: 10.1073/pnas.0907942107.

509. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. PLoS Pathog. 2006;2(6):e62.

510. Schefold J.C., Hasper D., Reinke P., Monneret G., Volk H.D. Consider delayed immunosuppression into the concept of sepsis. Crit Care Med. 2008;36(11):3118. doi: 10.1097/CCM.0b013e31818bdd8f.

511. Schröder J., Kahlke V., Staubach K.H., Zabel P., Stüber F. Gender differences in human sepsis. Arch Surg. 1998;133(11):1200-5.

512. Schüller S.S., Sadeghi K., Wisgrill L. et al. Preterm neonates display altered plasmacytoid dendritic cell function and morphology. J Leukoc Biol. 2013;93(5):781-8. doi: 10.1189/jlb.1011525.

513. Schulte W., Bernhagen J., Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. Mediators Inflamm. 2013;2013:165974. doi: 10.1155/2013/165974.

514. Seale J.V., Wood S.A., Atkinson H.C., Harbuz M.S., Lightman S.L. Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. J Neuroendocrinol. 2004;16(12):989-98.

515. Seeley E.J., Matthay M.A., Wolters P.J. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012;303(5):L355-63. doi: 10.1152/ajplung.00069.2012.

516. Segal A.O., Crighton E.J., Moineddin R., Mamdani M., Upshur R.E. Croup hospitalizations in Ontario: a 14-year time-series analysis. Pediatrics. 2005;116:51–5.

517. Senogles D.R., Paul P.S., Johnson D.W., Muscoplat C.C. Ontogeny of T cells, B cells and monocytes in the bovine foetus. Clin Exp Immunol. 1979;36(2):299-303.

518. Sharma A., Yang W.L., Matsuo S., Wang P. Differential alterations of tissue T-cell subsets after sepsis. Immunol Lett. 2015;168(1):41-50. doi: 10.1016/j.imlet.2015.09.005.

519. Shearer W.T., Rosenblatt H.M., Gelman R.S. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(5):973-80.

520. Sheridan P.J. Can a single androgen receptor fill the bill? Mol Cell Endocrinol. 1991;76(1-3):C39-45.

521. Shevach E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity. 2009;30(5):636-45. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.

522. Shimizu T., Miyauchi K., Shirasuna K. et al. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. Toxicol In Vitro. 2012;26(7):1134-42. doi: 10.1016/j.tiv.2012.06.014.

523. Shin Y.J., Ki M., Foxman B. Epidemiology of neonatal sepsis in South Korea. Pediatr Int. 2009;51(2):225-32. doi: 10.1111/j.1442-200X.2008.02685.x.

524. Shukla P., Rao G.M., Pandey G. et al. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents. Br J Pharmacol. 2014;171(22):5011-31. doi: 10.1111/bph.12829.

525. Silva-Santos B., Schamel W.W., Fisch P., Eberl M. γδ T-cell conference 2012: close encounters for the fifth time. Eur J Immunol. 2012;42(12):3101-5. doi: 10.1002/eji.201270101.

526. Simon A.K., Hollander G.A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. Proc Biol Sci. 2015;282(1821):20143085. doi: 10.1098/rspb.2014.3085.

527. Simpson A.J., Newton P.N., Chierakul W., Chaowagul W., White N.J. Diabetes mellitus, insulin, and melioidosis in Thailand. Clin. Infect. Dis. 2003; 36:e71–e72.

528. Singer M. The new sepsis consensus definitions (Sepsis-3): the good, the not-so-bad, and the actually-quite-pretty. Intensive Care Med. 2016;42(12):2027-2029.

529. Skibsted S., Bhasin M.K., Aird W.C., Shapiro N.I. Bench-to-bedside review: future novel diagnostics for sepsis - a systems biology approach. Crit Care. 2013;17(5):231. doi: 10.1186/cc12693.

530. Slominski A., Zbytek B., Nikolakis G. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. J Steroid Biochem Mol Biol. 2013;137:107-23. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.02.006.

531. Smeekens S.P., Plantinga T.S., van de Veerdonk F. et al. STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12R/IL23R signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. PLoS ONE. 2011; 6:e29248.

532. Smith-Bouvier D.L., Divekar A.A., Sasidhar M. et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. J Exp Med. 2008;205(5):1099-108. doi: 10.1084/jem.20070850.

533. Snider H., Lezama-Davila C., Alexander J., Satoskar A.R. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. Neuroimmunomodulation. 2009;16(2):106-13. doi: 10.1159/000180265.

534. Solti I., Kvell K., Talaber G. et al. Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4+CD8+ Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. PLoS One. 2015;10(6):e0129217. doi: 10.1371/journal.pone.0129217.

535. Soucy G., Boivin G., Labrie F., Rivest S. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. J Immunol. 2005;174(10):6391-8.

536. Souza S.S., Castro F.A., Mendonça H.C. et al. Influence of menstrual cycle on NK activity. J Reprod Immunol. 2001;50(2):151-9.

537. Spasojević I., Obradović B., Spasić S. Bench-to-bedside review: Neonatal sepsis-redox processes in pathogenesis. Crit Care. 2012;16(3):221. doi: 10.1186/cc11183.

538. Speyer C.L., Rancilio N.J., McClintock S.D. et al. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. Am J Physiol Cell Physiol. 2005;288(4):C881-90.

539. Spitzer J.A. Gender differences in some host defense mechanisms. Lupus. 1999;8(5):380-3.

540. Spolarics Z. The X-files of inflammation: cellular mosaicism of X-linked polymorphic genes and the female advantage in the host response to injury and infection. Shock. 2007;27(6):597-604.

541. Sprung C.L., Annane D., Keh D. et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. N Engl J Med. 2008;358(2):111-24. doi: 10.1056/NEJMoa071366.

542. Stites D.P., Siiteri P.K. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. Immunol Rev. 1983;75:117-38.

543. Stringer E.M., Kaseba C., Levy J. et al. A randomized trial of the intrauterine contraceptive device vs hormonal contraception in women who are infected with the human immunodeficiency virus. Am J Obstet Gynecol. 2007;197(2):144.e1-8.

544. Strunk T., Doherty D., Richmond P. et al. Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2009; 94:F230–F231.

545. Strunk T., Power Coombs M.R., Currie A.J. et al. TLR2 mediates recognition of live Staphylococcus epidermidis and clearance of bacteremia. PLoS ONE. 2010; 5:e10111.

546. Strunk T., Prosser A., Levy O. et al. Responsiveness of human monocytes to the commensal bacterium Staphylococcus epidermidis develops late in gestation. Pediatr. Res. 2012; 72:10–18.

547. Strunk T., Richmond P., Simmer K. et al. Neonatal immune responses to coagulase-negative staphylococci. Curr. Opin. Infect. Dis. 2007; 20:370–375.

548. Sugiura K., Nishikawa M., Ishiguro K. et al. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. Immunobiology. 2004;209(8):619-27.

549. Sullivan R.M., Holman P.J. Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: the role of corticosterone. Neurosci Biobehav Rev. 2010;34(6):835-44. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.11.010.

550. Sun J., Shigemi H., Tanaka Y. et al. Tetracyclines downregulate the production of LPS-induced cytokines and chemokines in THP-1 cells via ERK, p38, and nuclear factor-κB signaling pathways. Biochem Biophys Rep. 2015;4:397-404. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.11.003.

551. Sun T., Plutynski A., Ward S., Rubin J.B. An integrative view on sex differences in brain tumors. Cell Mol Life Sci. 2015;72(17):3323-42. doi: 10.1007/s00018-015-1930-2.

552. Sun Y., Li H., Yang M.F. et al. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli. PLoS One. 2012;7(6):e39224. doi: 10.1371/journal.pone.0039224.

553. Suzuki T., Shimizu T., Yu H.P. et al. Estrogen receptor-alpha predominantly mediates the salutary effects of 17beta-estradiol on splenic macrophages following trauma-hemorrhage. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;293(3):C978-84.

554. Szekeres-Bartho J., Kinsky R., Chaouat G. The effect of a progesterone-induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. Am J Reprod Immunol. 1990;24(4):105-7.

555. Takahata Y., Nomura A., Takada H. et al. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. Exp Hematol. 2004;32(7):622-9.

556. Tallmadge R.L., Tseng C.T., Felippe M.J. Diversity of immunoglobulin lambda light chain gene usage over developmental stages in the horse. Dev Comp Immunol. 2014;46(2):171-9. doi: 10.1016/j.dci.2014.04.001.

557. Tang Y., Peitzsch C., Charoudeh H.N. et al. Emergence of NK-cell progenitors and functionally competent NK-cell lineage subsets in the early mouse embryo. Blood. 2012;120(1):63-75. doi: 10.1182/blood-2011-02-337980.

558. Tasker L., Marshall-Clarke S. Functional responses of human neonatal B lymphocytes to antigen receptor cross-linking and CpG DNA. Clin Exp Immunol. 2003; 134(3): 409–419. doi: 10.1111/j.1365-2249.2003.02318.x

559. Tatura R., Zeschnigk M., Hansen W. et al. Relevance of $Foxp3^{+}$ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. Immunology. 2015;146(1):144-56. doi: 10.1111/imm.12490.

560. Taylor K.E., Vallejo-Giraldo C., Schaible N.S., Zakeri R., Miller V.M. Reporting of sex as a variable in cardiovascular studies using cultured cells. Biol Sex Differ. 2011; 2:11.

561. Theivanthiran B., Batra S., Balamayooran G., et al. NOD2 signaling contributes to host defense in the lungs against Escherichia coli infection. Infect Immun. 2012;80:2558–69. doi: 10.1128/IAI.06230-11.

562. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E. et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. JAMA. 2003; 289:179–186.

563. Thongngarm T., Jenkins J.K., Ndebele K., McMurray R.W. Estrogen and progesterone modulate monocyte cell cycle progression and apoptosis. Am J Reprod Immunol. 2003;49(3):129-38.

564. Torfadottir H., Freysdottir J., Skaftadottir I. et al. Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy. Clin Exp Immunol. 2006;145(3):407-12.

565. Torio C.M., Andrews R.M. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006 Feb-2013 Aug.

566. Torres M.B., Trentzsch H., Stewart D. et al. Protection from lethal endotoxic shock after testosterone depletion is linked to chromosome X. Shock. 2005;24(4):318-23.

567. Tozzi J. America has a $27 billion sepsis crisis. Bloomberg. 2017. https://www.bloomberg.com/news/articles/2017-07-14/america-has-a-27-billion-sepsis-crisis

568. Tsuji T., Asano Y., Handa T. Induction of apoptosis in lymphoid tissues of mice after intramuscular injection of enterotoxigenic Escherichia coli enterotoxin. Immunobiology. 2000;201(3-4):377-90.

569. Tsuyuguchi K., Suzuki K., Matsumoto H. et al. Effect of oestrogen on Mycobacterium avium complex pulmonary infection in mice. Clin Exp Immunol. 2001;123(3):428-34.

570. Tulic M.K., Andrews D., Crook M.L. et al. Changes in thymic regulatory T-cell maturation from birth to puberty: differences in atopic children. J Allergy Clin Immunol. 2012;129(1):199-206.e1-4. doi: 10.1016/j.jaci.2011.10.016.

571. Tyagi A.M., Srivastava K., Mansoori M.N. et al. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. PLoS One 7. 2012. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044552.

572. Uciechowski P., Imhoff H., Lange C. et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. J. Leukoc. Biol. 2011; 90:377–388.

573. Unsinger J., Kazama H., McDonough J.S., Hotchkiss R.S., Ferguson T.A. Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. J Leukoc Biol. 2009;85(3):382-90. doi: 10.1189/jlb.0808491.

574. van de Pavert S.A., Mebius R.E. New insights into the development of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol. 2010;10(9):664-74. doi: 10.1038/nri2832.

575. van de Veerdonk F.L., Plantinga T.S., Hoischen A. et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. N. Engl. J. Med. 2011; 365:54–61.

576. van den Brandt J., Wang D., Reichardt H.M. Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. Mol Endocrinol. 2004;18(3):687-95.

577. van Nas A., GuhaThakurta D., Wang S.S. et al. Elucidating the role of gonadal hormones in sexually dimorphic gene coexpression networks. Endocrinol. 2009; 150:1235–1249.

578. van Vliet M.J., Harmsen H.J., de Bont E.S., Tissing W.J. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. PLoS Pathog. 2010;6(5):e1000879. doi: 10.1371/journal.ppat.1000879.

579. Vasiadi M., Kempuraj D., Boucher W., Kalogeromitros D., Theoharides T.C. Progesterone inhibits mast cell secretion. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2006;19:787–794.

580. Velilla P.A., Rugeles M.T., Chougnet C.A. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. Clin Immunol. 2006;121(3):251-9.

581. Venet F., Chung C.S., Kherouf H. et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. Intensive Care Med. 2009;35(4):678-86. doi: 10.1007/s00134-008-1337-8.

582. Venet F., Chung C.S., Monneret G., et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. J. Leukoc. Biol. 2008;83:523–535.

583. Venkatesh M.P., Placencia F., Weisman L.E. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: An update. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 2006;17:120–127

584. Vento S., Tanko M.N. The bacterium that could cause cancer. Lancet Oncol. 2009;10(5):528. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70038-5.

585. Villacres M.C., Longmate J., Auge C., Diamond D.J. Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion. Hum Immunol. 2004;65(5):476-85.

586. Vincent J.L., Abraham E., Annane D. et al. Reducing mortality in sepsis: new directions. Crit. Care 2002;6:S1–S18.

587. Viselli S.M., Olsen N.J., Shults K., Steizer G., Kovacs W.J. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. Mol Cell Endocrinol. 1995;109(1):19-26.

588. Vishwanathan S.A., Guenthner P.C., Lin C.Y. et al. High susceptibility to repeated, low-dose, vaginal SHIV exposure late in the luteal phase of the menstrual cycle of pigtail macaques. J Acquir Immune Defic Syndr. 2011;57(4):261-4. doi: 10.1097/QAI.0b013e318220ebd3.

589. Vivier E., Raulet D.H., Moretta A. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science. 2011;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687.

590. Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008;9(5):503-10. doi: 10.1038/ni1582.

591. von Bruhl M.L., Stark K., Steinhart A. et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. J Exp Med. 2012;209:819–35.doi:10.1084/jem.20112322

592. Voskuhl R. Sex differences in autoimmune diseases. Biol Sex Differ. 2011; 2:1.

593. Walker J.M., Slifka M.K. Longevity of T-cell memory following acute viral infection. Adv Exp Med Biol. 2010;684:96-107.

594. Walmer D.K., Wrona M.A., Hughes C.L., Nelson K.G. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. Endocrinology. 1992;131(3):1458-66.

595. Wang C., Dehghani, B. Li Y., Kaler L.J., Vandenbark A.A., Offner H. Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. Immunology. 2009;126:329–335.

596. Wang D., Müller N., McPherson K.G., Reichardt H.M. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. J Immunol. 2006;176(3):1695-702.

597. Wang H., Yang L.L., Hu Y.F. et al. Maternal LPS exposure during pregnancy impairs testicular development, steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring. PLoS One. 2014;9(9):e106786. doi: 10.1371/journal.pone.0106786.

598. Wang P., Han X., Mo B., Huang G., Wang C. LPS enhances TLR4 expression and IFN‑γ production via the TLR4/IRAK/NF‑κB signaling pathway in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. Mol Med Rep. 2017. doi: 10.3892/mmr.2017.6983.

599. Wang Q., Fang C.H., Hasselgren P.O. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001;281(3):R1013-23.

600. Wang X., Teng D., Mao R. et al. Combined systems approaches reveal a multistage mode of action of a marine antimicrobial peptide against pathogenic escherichia coli and its protective effect against bacterial peritonitis and endotoxemia. Antimicrob Agents Chemother. 2016;61(1). pii: e01056-16. doi: 10.1128/AAC.01056-16.

601. Ward T.L., Spencer W.J., Davis L.D. et al. Ingested soluble CD14 from milk is transferred intact into the blood of newborn rats. Pediatr Res. 2014;75(2):252-8. doi: 10.1038/pr.2013.225.

602. Watanabe K., Hamano S., Noda K., Koga M., Tada I. Strongyloides ratti: additive effect of testosterone implantation and carbon injection on the susceptibility of female mice. Parasitol Res. 1999;85(7):522-6.

603. Watson R.S., Carcillo J.A., Linde-Zwirble W.T et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167(5):695-701.

604. Watson R.S., Carcillo J.A. Scope and epidemiology of pediatric sepsis. Pediatr Crit Care Med. 2005;6(3 Suppl):S3-5.

605. Weiss G., Murr C., Zoller H. et al. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. Clin Exp Immunol. 1999;116(3):435-40.

606. Weksler M.E., Goodhardt M., Szabo P. The effect of age on B cell development and humoral immunity. Springer Semin Immunopathol.2002;24:35-52.

607. Wessendorf G., Scheibl P., Zerbe P.S. Effect of estrogens on the immune system with regard to bovine placental retention. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1998;105(1):32-4.

608. White N.J. Melioidosis. Lancet. 2003; 361:1715–1722.

609. Wichmann M.W., Ayala A., Chaudry I.H. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. Am J Physiol. 1997;273(4 Pt 1):C1335-40.

610. Wichmann M.W., Müller C., Meyer G. et al. Different immune responses to abdominal surgery in men and women. Langenbecks Arch Surg. 2003;387(11-12):397-401.

611. Wiegering V., Eyrich M., Wunder C. et al. Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children. Eur Cytokine Netw. 2009;20(2):75-80. doi: 10.1684/ecn.2009.0149.

612. Wiersinga W.J., van der Poll T., White N.J., Day N.P., Peacock S.J. Melioidosis: Insights into the pathogenicity of Burkholderia pseudomallei. Nat. Rev. Microbiol. 2006; 4:272–282.

613. Wildin R.S., Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. J Autoimmun. 2005;25 Suppl:56-62.

614. Willems F., Vollstedt S., Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. Eur J Immunol. 2009;39(1):26-35. doi: 10.1002/eji.200838391.

615. Willey A.R., Anderson R.I., Morales M., Ramirez R.L., Spear L.P. Effects of ethanol administration on corticosterone levels in adolescent and adult rats. Alcohol. 2012;46(1):29-36. doi: 10.1016/j.alcohol.2011.08.005.

616. Wu H.P., Chung K., Lin C.Y. et al. Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis. Inflamm Res. 2013;62(8):751-63. doi: 10.1007/s00011-013-0630-3.

617. Wu J.H., Chen C.Y., Tsao P.N., Hsieh W.S., Chou H.C. Neonatal sepsis: a 6-year analysis in a neonatal care unit in Taiwan. Pediatr Neonatol. 2009;50(3):88-95. doi: 10.1016/S1875-9572(09)60042-5.

618. Wunderlich F., Benten W.P., Lieberherr M. et al. Testosterone signaling in T cells and macrophages. Steroids. 2002;67(6):535-8.

619. Wynn J., Cornell T.T., Wong H.R., Shanley T.P., Wheeler D.S. The host response to sepsis and developmental impact. Pediatrics. 2010;125(5):1031-41. doi: 10.1542/peds.2009-3301.

620. Wynn J.L., Wong H.R. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. Clin Perinatol. 2010;37(2):439-79. doi: 10.1016/j.clp.2010.04.002.

621. Xiao N., Eidenschenk C., Krebs P. et al. The Tpl2 mutation Sluggish impairs type I IFN production and increases susceptibility to group B streptococcal disease. J. Immunol. 2009; 183:7975–7983.

622. Xing K., Murthy S., Liles W.C., Singh J.M. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis--a systematic review. Crit Care. 2012;16(1):R7. doi: 10.1186/cc11145.

623. Yaguchi A., Yuzawa J., Klein D.J., Takeda M., Harada T. Combining intermediate levels of the Endotoxin Activity Assay (EAA) with other biomarkers in the assessment of patients with sepsis: results of an observational study. Crit Care. 2012;16(3):R88. doi: 10.1186/cc11350.

624. Yamamoto Y., Saito H., Setogawa T., Tomioka H. Sex differences in host resistance to Mycobacterium marinum infection in mice. Infect Immun. 1991;59(11):4089-96.

625. Yan S.R., Qing G., Byers D.M. et al. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. Infect Immun. 2004;72(3):1223-9.

626. Yang J.H., Chen C.D., Wu M.Y. et al. Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women. Fertil Steril. 2000;74(2):261-7.

627. Yang K.H., Lee M.G. Effects of endotoxin derived from Escherichia coli lipopolysaccharide on the pharmacokinetics of drugs. Arch Pharm Res. 2008;31(9):1073-86. doi: 10.1007/s12272-001-1272-8.

628. Yao G., Liang J., Han X., Hou Y. In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen. International Immunopharmacology. 2003;3:1853–1860.

629. Yatsunenko T., Rey F.E., Manary M.J. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature. 2012;486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.

630. Yazdany J., Trupin L., Kaiser R. et al. Contraceptive counseling and use among women with systemic lupus erythematosus: a gap in health care quality? Arthritis Care Res (Hoboken). 2011;63(3):358-65. doi: 10.1002/acr.20402.

631. Yekeler E., Tambag A., Tunaci A. et al. Analysis of the thymus in 151 healthy infants from 0 to 2 years of age. J Ultrasound Med. 2004;23(10):1321-6.

632. Yovel G., Shakhar K., Ben-Eliyahu S. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. Gynecol Oncol. 2001;81(2):254-62.

633. Yu H.P., Chaudry I.H. The role of estrogen and receptor agonists in maintaining organ function after trauma-hemorrhage. Shock. 2009;31(3):227-37. doi: 10.1097/SHK.0b013e31818347e7.

634. Yu H.P., Shimizu T., Hsieh Y.C. et al. Tissue-specific expression of estrogen receptors and their role in the regulation of neutrophil infiltration in various organs following trauma-hemorrhage. J Leukoc Biol. 2006;79(5):963-70.

635. Zacharowski K., Zacharowski P.A., Koch A. et al. Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(16):6392-7.

636. Zellweger R., Wichmann M.W., Ayala A. et al. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. Crit Care Med. 1997;25(1):106-10.

637. Zhang H., Liu Y., Wang L. et al. Differential effects of estrogen/androgen on the prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the male rat. J Lipid Res. 2013;54(2):345-57. doi: 10.1194/jlr.M028969.

638. Zhang J.P., Yang Y., Levy O., Chen C. Human neonatal peripheral blood leukocytes demonstrate pathogen-specific coordinate expression of TLR2, TLR4/MD2, and MyD88 during bacterial infection in vivo. Pediatr Res. 2010;68(6):479-83. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181f90810.

639. Zhang S.Y., Boisson-Dupuis S., Chapgier A. et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: Insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. Immunol. Rev. 2008; 226:29–40.

640. Zheng G., Wu S.P., Hu Y. et al. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. Neurogastroenterol Motil. 2013;25(2):e127-39. doi: 10.1111/nmo.12066.

641. Zheng R., Pan G., Thobe B.M. et al. MyD88 and Src are differentially regulated in Kupffer cells of males and proestrus females following hypoxia. Mol Med. 2006;12(4-6):65-73.

642. Zheng S.G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? Am J Clin Exp Immunol. 2013;2(1):94-106.

643. Zhou Y.J., Peng H., Chen Y., Liu Y.L. Alterations of thymic epithelial cells in lipopolysaccharide-induced neonatal thymus involution. Chin Med J (Engl). 2016;129(1):59-65. doi: 10.4103/0366-6999.172577.

644. Zhu W., Bao R., Fan X. et al. PD-L1 blockade attenuated sepsis-induced liver injury in a mouse cecal ligation and puncture model. Mediators Inflamm. 2013;361501. doi: 10.1155/2013/361501.

645. Zhu Z., Shang X., Qi P., Ma S. Sex-based differences in outcomes after severe injury: an analysis of blunt trauma patients in China. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2017;25(1):47. doi: 10.1186/s13049-017-0389-6.

646. Zinkernagel R.M. What is missing in immunology to understand immunity? Nat Immunol. 2000;1(3):181-5.

647. Zlotoff D.A., Schwarz B.A., Bhandoola A. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. Semin Immunopathol. 2008;30(4):371-82. doi: 10.1007/s00281-008-0133-4.

648. Zolin S.J., Vodovotz Y., Forsythe R.M. et al. The early evolving sex hormone environment is associated with significant outcome and inflammatory response differences after injury. J Trauma Acute Care Surg. 2015;78(3):451-7.

649. Zonneveld R., Martinelli R., Shapiro N.I. et al. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. Crit Care. 2014;18(2):204. doi: 10.1186/cc13733.

650. Zouali M., Richard Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. Front Immunol. 2011;2:63. doi: 10.3389/fimmu.2011.00063.