

На правах рукописи

Косырева Анна Михайловна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2018

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном
учреждении
«Научно-исследовательский институт морфологии человека»**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Макарова Ольга Васильевна

Официальные оппоненты:

Доцент кафедры анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук

Галеева Эльвира Науфатовна

Заведующая кафедрой морфологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России

доктор медицинских наук, доцент **Калашникова Светлана Александровна**

Профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовского Университета)

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26)

Защита состоится _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Ober C. et al., 2008; Arnold A.P., 2010; Voskuhl R., 2011; Rizzetto L. et al., 2018). Половые различия морфофункционального состояния иммунной системы в норме и при антигенной стимуляции зависят от кариотипа и непосредственного влияния половых стероидов на рецепторы иммунокомпетентных клеток. X-хромосома кодирует более чем 1100 идентифицированных генов, часть из которых определяет функционирование иммунной системы (Fish E.N., 2008). Генотип XX снижает риск проявления X-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 иммуносупрессорное действие (Foo Y.Z. et al., 2016; Roved J. et al., 2017; Gubbels Bupp M.R., Jorgensen T.N., 2018). 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). Системные воспалительные реакции наиболее ярко выражены 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;

López-Mestanza C. et al., 2018). 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; Maug F.V. 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 эндотоксинемии, 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 I 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 Th1-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 Th1-, Th2-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 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено 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). Половозрелые животные были получены из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемой для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №5 от 12.03.2008 г.).

Определение фазы эстрального цикла. Фазу эстрального цикла у половозрелых самок крыс Вистар определяли по влажалищным мазкам. Для оценки влияния на выраженность проявлений воспалительного ответа физиологических колебаний эстрадиола и прогестерона в течение эстрального цикла отбирали самок с устойчивым 4-дневным эстральным циклом в фазу проэструса и диэструса. Изучение половых различий морфофункциональных изменений иммунной системы и воспалительного ответа проводили на самках в фазу проэструса.

Кастрация. С целью изучения влияния половых стероидных гормонов на тяжесть течения воспалительных реакций у половозрелых крыс Вистар проводили хирургическую билатеральную орхи- и овариэктомию. Кастрацию

осуществляли под эфирным наркозом. Системный воспалительный ответ (СВО) моделировали через 52 дня после хирургической кастрации. Выбор такого отдаленного срока после кастрации объясняется тем, что в этот период развиваются устойчивые морфологические изменения в гипофизе, которые сопровождаются повышением секреции лютеинизирующего гормона (ЛГ) (Алешин Б.В., 1971; Resko J.A. et al., 2000).

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

Доза вводимого ЛПС 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; Писарев В.Б. и соавт., 2008). Предварительно в эксперименте нами было показано, что при введении новорожденным и десятидневным крысам Вистар ЛПС в дозе 1,5 мг/кг, использованной для моделирования СВО у половозрелых особей, отсутствовали морфологические проявления СВО в органах-мишенях: дистрофические изменения и некрозы в печени, а в легких внутриальвеолярный отек и инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами. При введении ЛПС десятидневным крысам в более высокой дозе – 15 мг/кг в печени и легких выявлены патологические изменения, аналогичные половозрелым животным, которым моделировали СВО введением ЛПС в дозе 1,5 мг/кг. Поэтому в экспериментах для изучения СВО у половозрелых животных ЛПС вводили в дозах 1,5 и 15 мг/кг, а у новорожденных и препубертатных – 15 мг/кг.

Животных выводили из эксперимента 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 (Konkle A.T., McCarthy M.M., 2011). Новорожденных крыс с СВО выводили из эксперимента на 1-е сут.

Моделирование СВО у самок и самцов 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 всех контрольных групп внутрибрюшинно вводили физиологический раствор.

Материалы исследования. Для гистологического исследования проводили забор легких, печени, тимуса, селезенки. Кровь получали из шейных вен, центрифугировали при 200g в течение 20 мин, отбирали сыворотку, замораживали ее при температуре -70°C 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 и хлороформу, заливали в парафин, изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. Для определения тяжести воспалительного процесса в печени использовали трехцветную окраску MSB (Martius/Scarlet/Blue) для выявления фибрина разной степени зрелости («BioVitrum», Россия).

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 ступенчатых срезах органа (5 полей зрения на каждый срез). На гистологических препаратах легких проводили подсчет числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в стандартном поле зрения ($25\ 000\ \mu\text{m}^2$). Выраженность дистрофических и некротических изменений в печени определяли методом случайной выборки полуколичественно в баллах по шкале: 0 баллов – изменений нет; 0,5 баллов – дистрофические изменения менее 1/3 гепатоцитов; 1 – более 1/3; 2 – более 2/3; 3 – 100% гепатоцитов; 4 балла – сочетание дистрофии с единичными в препарате очаговыми некрозами; 5 – с обширными очаговыми некрозами. Площадь некрозов (μm^2) в печени оценивали на всей площади гистологического среза в программе Image Scope M в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290.

Выделение клеток селезенки и их культивирование. Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации 10^6 /мл культивировали 20 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением 5 мкг/мл конканавалина А (КонаА) в 24-луночных культуральных планшетах при 37°C и 5% CO_2 . Среда для культивирования состояла из RPMI-1640 (ООО «Компания ПанЭко») с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина.

Иммуноферментный анализ. В сыворотке крови методом твердофазного ИФА на спектрофотометре Anthos 2010 (Biochrom Ltd., Великобритания) оценивали содержание половых гормонов - общего и свободного тестостерона (DBC, Канада; DRG, Германия), эстрадиола (Adaltis, Италия; DBC, Канада; Cusabio, КНР) и прогестерона (DBC, Канада; DRG, Германия), кортикостерона (Assay designs, США; IBL, Германия), неоптерина (IBL, Германия) и TGF- β (eBioscience, Австрия). С помощью хромогенного LAL-теста определяли уровень эндотоксина (НВТ, 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 аланинаминотрансферазы (АлАТ) (КФ 2.6.1.2). Использовали наборы реактивов “DiaSys” (“Diagnostic Systems” GmbH, Германия) и полуавтоматический биохимический анализатор “Clima MC-15” (“RAL”, Испания).

Метод проточной цитофлуориметрии. Проводили цитофлуориметрическую оценку апоптотически гибнущих клеток тимуса (Annexin+PI-) с помощью набора Annexin V FITC Kit («Beckman Coulter») на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter»). Абсолютное число 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). Иммунофенотипический анализ основных субпопуляций лимфоцитов проводили с помощью антител 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). Субпопуляцию регуляторных Т-лимфоцитов выявляли с помощью набора Foxp3 Staining Buffer Set («eBioscience»). Проводили подсчет абсолютного и относительного количества различных субпопуляций лимфоцитов.

Статистический метод. Цифровые данные проверяли на нормальность распределения 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 среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего ($M \pm SE$) или медиану и интерквартильный размах (Med; 25%-75%). 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). Значения информативности ранжировали по убыванию и выбирали первые 5 признаков с максимальной значимостью.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

1. Самки

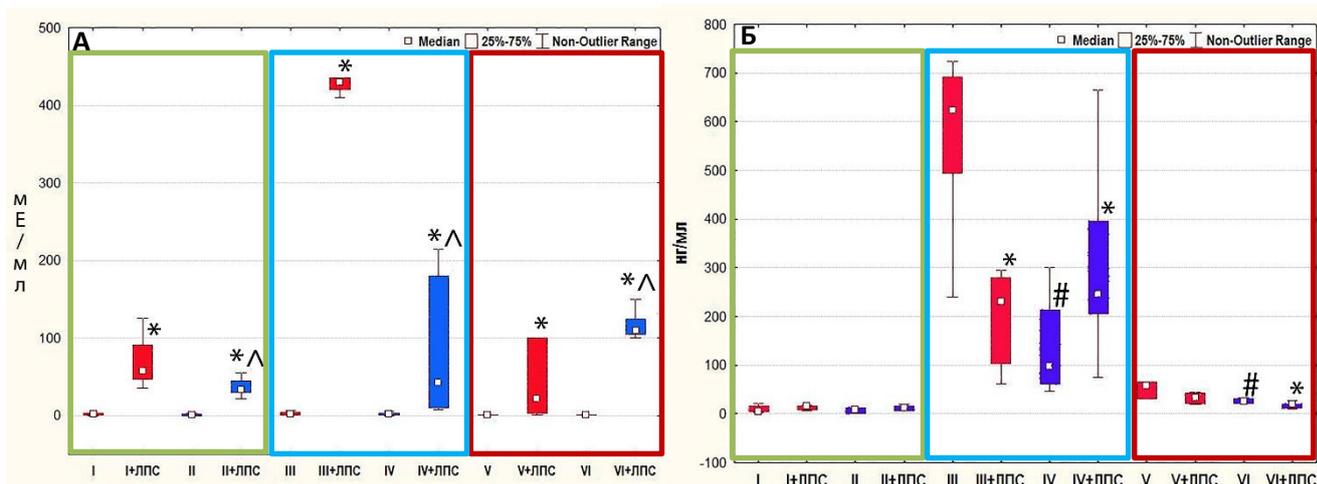
С целью моделирования воспалительного ответа у самок крыс Вистар трех возрастных групп – новорожденных, препубертатных и половозрелых в фазе проэструса, внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 15 мг/кг. Через сутки после введения ЛПС во всех возрастных группах наблюдалась гибель животных, и ее показатели составили: $22 \pm 7\%$ (9/40) у новорожденных, $23 \pm 12\%$ (3/18) у препубертатных и $56 \pm 10\%$ (15/27) у половозрелых крыс. Воспалительный ответ, индуцированный ЛПС, во всех возрастных периодах характеризовался эндотоксинемией (рис. 1А), развитием воспалительной реакции в легких с увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (рис. 2А), альтеративными изменениями в печени разной степени выраженности (рис. 2Б), а также изменениями продукции клетками селезенки провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

По сравнению с препубертатными и половозрелыми самками у новорожденных крыс через сутки после введения ЛПС воспалительные изменения в органах-мишенях – печени и легких были минимальными (рис. 2А, Б). В легких у 50% животных выявлен внутриальвеолярный отек, а в печени у всех крыс – дистрофические изменения гепатоцитов, которые сочетались с увеличением уровня активности АлАТ в сыворотке крови [контрольная группа – 22 (13-41) Е/л, ЛПС – 107 (83-222) Е/л; $p = 0,04$]. Минимально выраженные патологические изменения в органах-мишенях у новорожденных самок сочетались с повышением уровня эндотоксина в сыворотке крови (рис. 1А), тогда как содержание кортикостерона не изменялось (рис. 1Б). На фоне высокого уровня эндотоксина развитие минимальных морфологических изменений в печени и легких у новорожденных самок, по-видимому, обусловлено низким уровнем экспрессии TLR4 на макрофагах печени и легких

у новорожденных крыс (Gabehart K. et al., 2015). Введение высокой дозы ЛПС новорожденным самкам приводило к развитию акцидентальной инволюции тимуса I-II стадии и гиперплазии белой пульпы селезенки [контрольная группа – 11% (9-15), ЛПС – 28,13% (27,5-29,7), $p=0,01$], и снижением продукции *ex vivo* ИЛ-2 и ФНО- α (табл. 1, рис. 3). Через сутки после введения ЛПС в периферической крови у новорожденных самок не было обнаружено изменений количества субпопуляций лимфоцитов, что, по-видимому, связано с функциональной незрелостью иммунной системы (рис. 4). По данным литературы новорожденные дети более подвержены риску возникновения и развития синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), так как у них наблюдается физиологическое иммунодефицитное состояние (Carcillo J.A., 2003; Wynn J. et al., 2010).

Наиболее выраженные воспалительные изменения, индуцированные введением высокой дозы ЛПС, выявлены в препубертатном периоде, который по сравнению с новорожденными и половозрелыми самками характеризовался низким содержанием эстрадиола в сыворотке крови (рис. 5А) на фоне интенсивных процессов постнатального развития иммунной системы и увеличением уровня продукции ИЛ-2 и ИЛ-4 (рис. 3). В этот период у самок выявлялась высокая концентрация кортикостерона (рис. 1Б), что согласуется с данными С.А. Ляликова и соавт. (1996) и S. Moriceau et al. (2004). Через сутки после введения ЛПС у десятидневных самок наблюдалось максимальное увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови по сравнению с другими возрастными периодами (рис. 1А). На фоне выраженной эндотоксинемии у крыс препубертатного периода снижалось содержание кортикостерона (рис. 1Б) и прогестерона [контрольная – 17,6 (14,8-18,9) нг/мл; ЛПС – 4,3 (2,8-10,6) нг/мл; $p=0,003$].

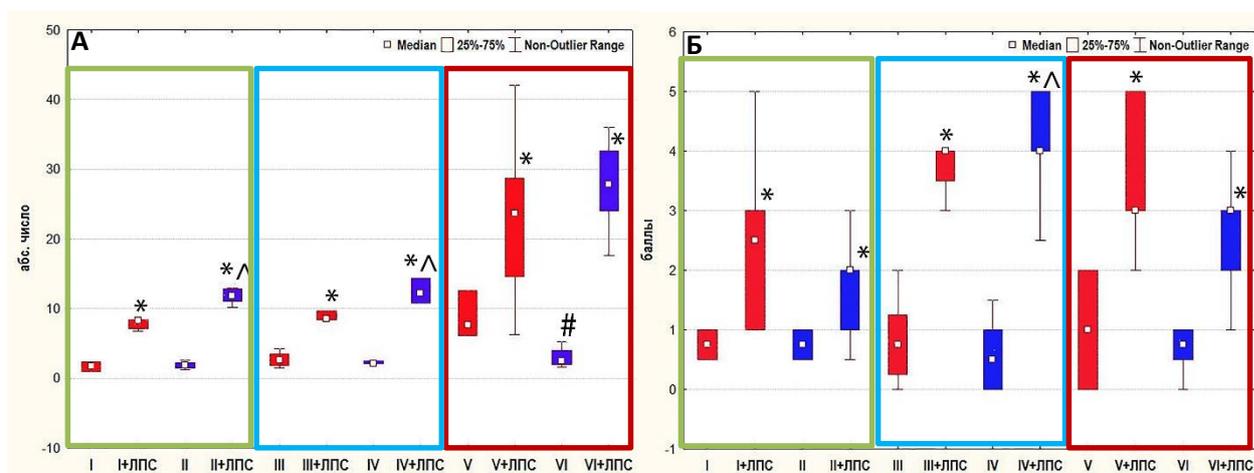
Выявленные изменения гормонального профиля могут быть связаны со снижением синтеза половых гормонов вследствие нарушения оси гипоталамус-гипофиз-гонады (Калашникова С.А. и соавт., 2007; Денисов А.Г. и соавт., 2010) и нарушениями метаболизма стероидных половых гормонов поврежденными клетками печени. Так, нами показано, что по сравнению с другими возрастными периодами у десятидневных самок системная воспалительная реакция проявлялась выраженными альтеративными изменениями гепатоцитов –очаговыми обширными некрозами у 70% самок (рис. 2).



- Новорожденные
- Препубертатные
- Половозрелые

Рис. 1. Изменение уровня эндотоксина (А) и кортикостерона (Б) в сыворотке крови у самок (■) и самцов (■) крыс Вистар разных возрастных групп на 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг).

Рамками обозначены возрастные периоды: новорожденные (I-самки, II – самцы), препубертатные (III-самки, IV – самцы) и половозрелые (V – самки, VI – самцы). Различия статистически значимы по сравнению с * - соответствующей контрольной группой; # - контрольной группой самок, ^ - опытной группой самок соответствующего возрастного периода



- Новорожденные
- Препубертатные
- Половозрелые

Рис. 2. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких (А) и выраженность патологических изменений в печени (Б) у самок (■) и самцов (■) крыс Вистар разных возрастных групп на 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг).

Рамками обозначены возрастные периоды: новорожденные (I-самки, II – самцы), препубертатные (III-самки, IV – самцы) и половозрелые (V – самки, VI – самцы). Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; # - контрольной группой самок, ^ - опытной группой самок соответствующего возрастного периода

Таблица 1

Морфометрическая характеристика тимуса у самок и самцов крыс Вистар разных возрастных периодов на 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг) [Ме; 25-75%]

Группа наблюдения		Объемная доля коркового вещества тимуса, %		Ширина субкапсулярной зоны, мкм		Апоптоз клеток тимуса, %		Статистическая значимость половых различий (p)
		Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	
Новорожденные	Контрольная	74,39 ^{1*} (68,49-75,57)	62,75 ¹ (55,67-69,04)	не выявл.	не выявл.	2,00 ¹¹ (1,40-3,10)	2,15 ¹¹ (1,50-2,60)	0,008 ¹⁻¹
	ЛПС	62,42 ² (44,84-69,50)	58,64 ² (57,24-63,08)	не выявл.	не выявл.	3,45 ¹² (2,50-4,50)	3,45 ¹² (1,95-8,70)	
Препубертатный период	Контрольная	86,36 ³ (86,66-88,82)	81,62 ³ (80,65-86,15)	46,52 ⁷ (43,82-47,72)	40,60 ⁷ (38,51-41,84)	15,1 ¹³ (6,1-20,0)	5,0 ¹³ (4,7-6,8)	0,07 ¹⁵⁻¹⁵ 0,008 ⁸⁻⁸
	ЛПС	74,58 ⁴ (69,14-80,53)	76,78 ⁴ (71,43-80,25)	17,78 ⁸ (7,96-19,15)	41,40 ⁸ (37,74-42,16)	33,1 ¹⁴ (22,6-53,4)	27,9 ¹⁴ (16,1-38,8)	
Половозрелые	Контрольная	49,17 ⁵ (47,40-54,00)	55,19 ⁵ (50,80-57,59)	30,66 ⁹ (28,43-31,75)	25,75 ⁹ (21,58-29,16)	1,3 ¹⁵ (1,1-1,3)	0,4 ¹⁵ (0,1-1,0)	0,02 ⁵⁻⁵ 0,04 ⁹⁻⁹ 0,05 ¹⁵⁻¹⁵
	ЛПС	32,81 ⁶ (29,41-41,13)	46,25 ⁶ (39,37-53,30)	0,00 ¹⁰ (0,0-15,6)	0,00 ¹⁰ (0,0-0,0)	1,4 ¹⁶ (0,4-1,6)	1,5 ¹⁶ (0,9-2,3)	
Статистическая значимость различий показателей в разных возрастных группах (p)		0,01 ¹⁻² 0,006 ³⁻⁴ 0,003 ⁵⁻⁶	0,003 ³⁻⁴ 0,002 ⁵⁻⁶	0,014 ⁷⁻⁸ 0,0001 ⁹⁻¹⁰	0,0001 ⁹⁻¹⁰ 0,03 ⁷⁻⁹ 0,000007 ⁸⁻¹⁰	0,04 ¹³⁻¹⁴ 0,0002 ¹¹⁻¹³ 0,0003 ¹³⁻¹⁵ 0,0004 ¹²⁻¹⁴ 0,002 ¹²⁻¹⁶ 0,00001 ¹⁴⁻¹⁶	0,001 ¹³⁻¹⁴ 0,04 ¹⁵⁻¹⁶ 0,03 ¹¹⁻¹³ 0,05 ¹¹⁻¹⁵ 0,003 ¹³⁻¹⁵ 0,001 ²⁻¹⁴ 0,0004 ¹⁴⁻¹⁶	

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

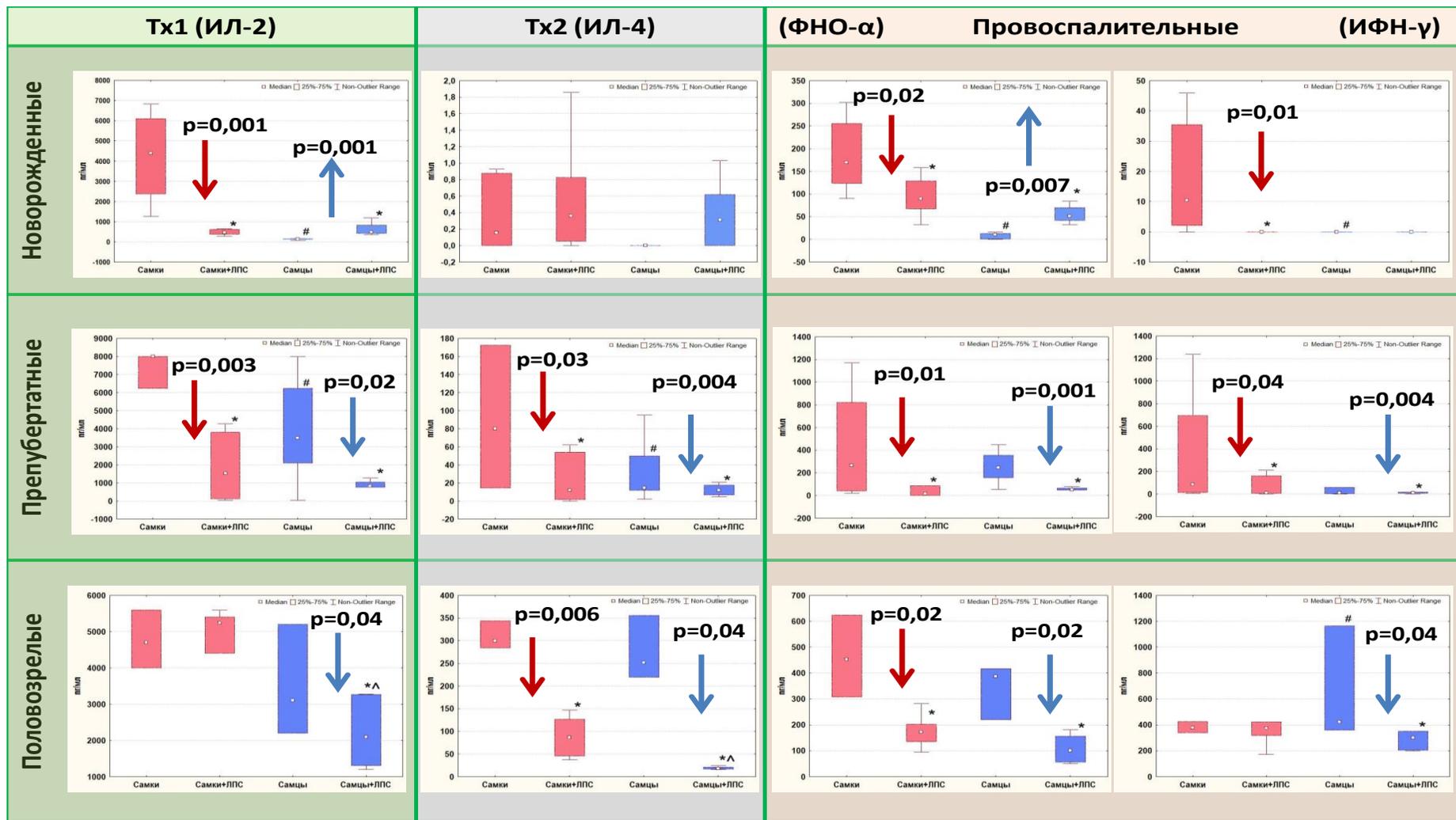


Рис. 3. Изменение уровня продукции цитокинов клетками селезенки у самок (■) и самцов (■) крыс Вистар разных возрастных групп на 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг). Стрелки указывают на статистически значимые изменения продукции цитокинов в результате введения ЛПС: ↓ - снижение, ↑ - повышение. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; ^ - опытной группой самок соответствующего возрастного периода

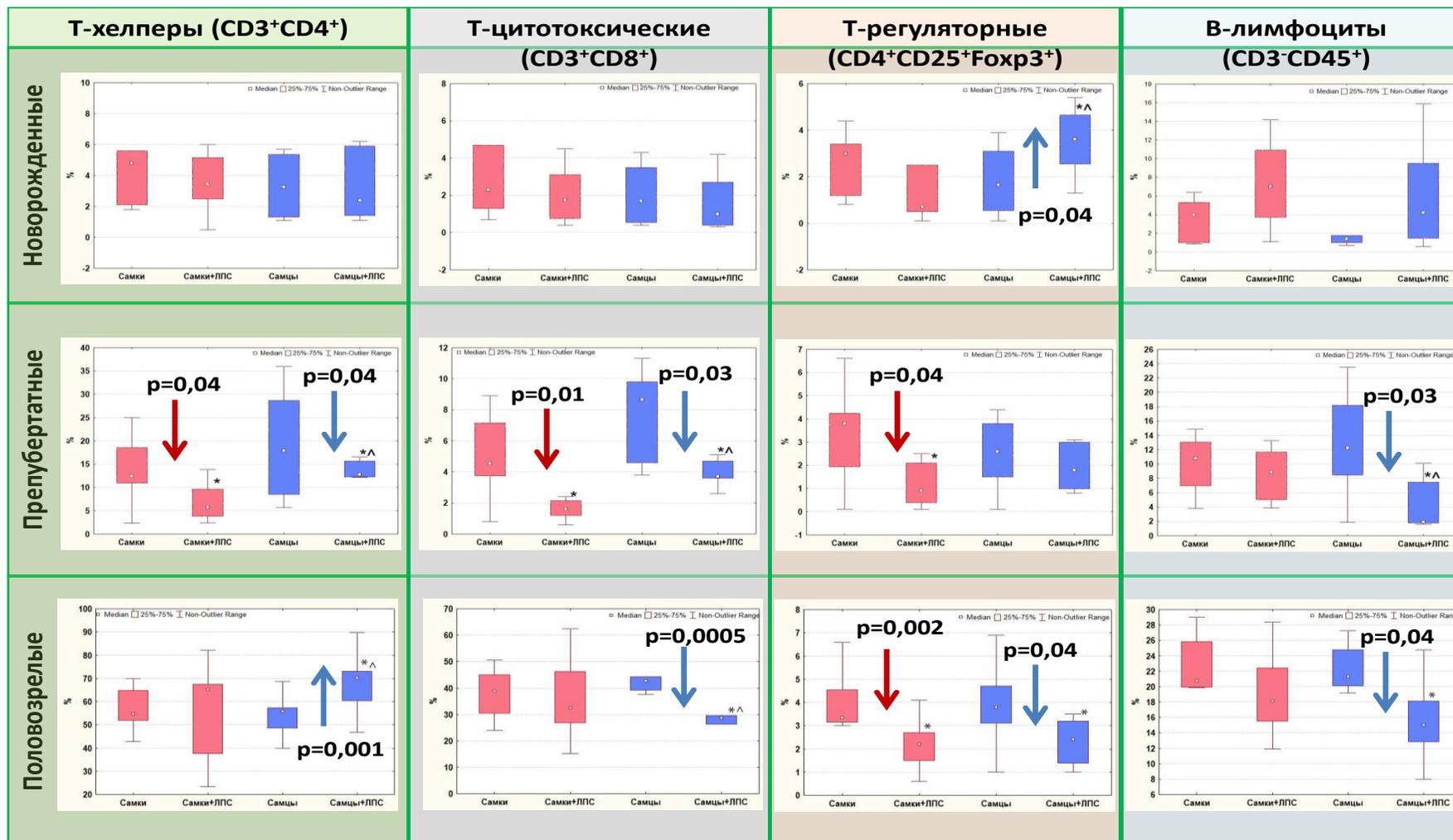


Рис. 4. Изменение относительного числа субпопуляций лимфоцитов у самок (■) и самцов (■) крыс Вистар разных возрастных групп на 1-е сут после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг). Стрелки указывают на статистически значимые изменения продукции цитокинов в результате введения ЛПС: ↓ - снижение, ↑ - повышение. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; ^ - опытной группой самок соответствующего возрастного периода

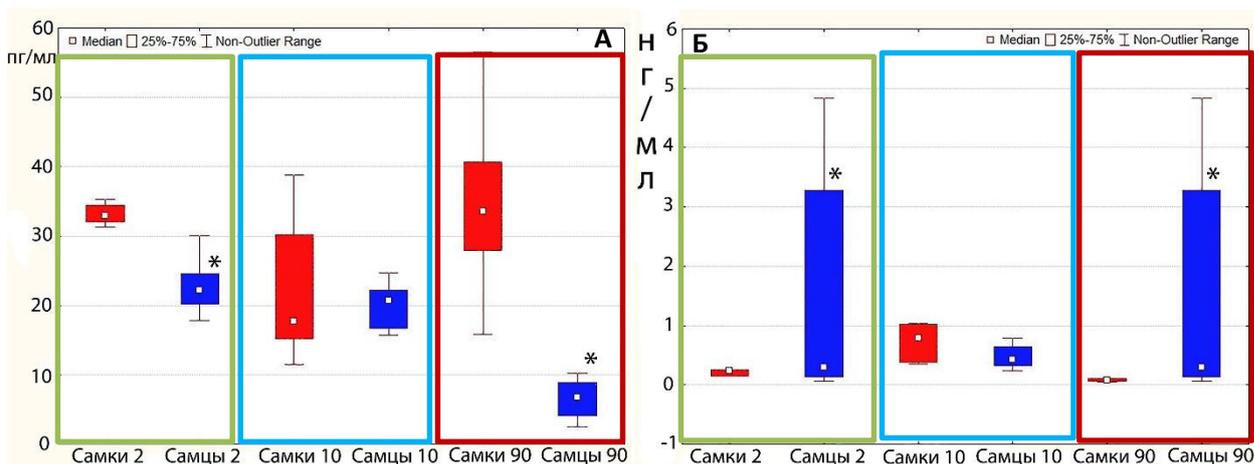


Рис. 5. Возрастные изменения содержания эстрадиола (А) и общего тестостерона (Б) в сыворотке крови у самок (■) и самцов (■) крыс Вистар контрольных групп. Рамками обозначены возрастные периоды: новорожденные, препубертатные и половозрелые. * - различия статистически значимы по сравнению с самками соответствующего возрастного периода

По сравнению с новорожденными у десятидневных крыс Вистар в ответ на введение высокой дозы ЛПС развивалась акцидентальная инволюция тимуса более поздних стадий с наличием выраженной картины «звездного неба», опустошением и сужением коркового вещества, увеличением числа апоптотически гибнущих клеток, в том числе и CD3⁺-лимфоцитов, что сочеталось со снижением уровня продукции ИЛ-2 и ИЛ-4, тогда как концентрация ИФН-γ и ФНО-α не изменялась, что свидетельствует о супрессии иммунного ответа (табл. 1, рис. 3). В периферической крови у препубертатных самок через сутки после введения высокой дозы ЛПС наблюдалось снижение всех субпопуляций Т-лимфоцитов – хелперов, цитотоксических, двойных позитивных и регуляторных, что отражает супрессию иммунного ответа у самок препубертатного периода (рис. 4).

По сравнению с группами новорожденных и десятидневных самок воспалительный ответ у половозрелых крыс сопровождался выраженным увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких (рис. 2А). По данным литературы хемотаксис нейтрофилов наиболее выражен у животных репродуктивного возраста, что связано с высоким уровнем экспрессии хемокинов CXCR2, ICAM-1 и G-CSF (Brubaker A.L. et al., 2013). Содержание стероидных половых гормонов в сыворотке крови у половозрелых самок в ответ на введение ЛПС не изменилось, что, возможно, по данным А.Г. Денисова и соавт. (2010) и Т. Shimizu et al. (2012) связано с угнетением синтеза эстрадиола в яичниках и снижением метаболизма половых стероидов поврежденными эндотоксином гепатоцитами. По сравнению с препубертатными животными у половозрелых самок эндотоксинемия была

менее выражена (рис. 1А), что, возможно, определяется активацией продукции антиэндотоксиновых антител и элиминацией эндотоксина в печени.

В периоде половой зрелости, также как и в препубертатном, введение ЛПС приводило к развитию акцидентальной инволюции тимуса II-III стадий, наблюдалось опустошение и сужение его коркового вещества, однако число апоптотически гибнущих клеток не изменялось по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Введение высокой дозы ЛПС половозрелым самкам не приводило к изменению объемной доли белой пульпы селезенки, но наблюдалась активация В-зоны: расширение герминативных центров [контрольная группа – 15,5% (7,6-18,6); ЛПС – 66,6% (60,9-69,5); $p=0,0006$] и сужение маргинальной зоны лимфоидных узелков [контрольная группа – 40,8% (35-43,2); ЛПС – 22,9% (10,2-27,5), $p=0,001$]. На фоне высокого уровня эстрадиола в сыворотке крови у половозрелых самок в ответ на введение ЛПС наблюдалось снижение уровня продукции клетками селезенки Тх-2 цитокина ИЛ-4 и провоспалительного цитокина – ФНО- α (рис. 3). В периферической крови у половозрелых самок воспалительная реакция сочеталась с активацией врожденного звена иммунного ответа с повышением числа НК-клеток [контрольная группа – 4,9% (3-6,1), ЛПС – 26,3% (16,2-52,2); $p=0,0002$], и супрессией противовоспалительного иммунного ответа с уменьшением количества Т-регуляторных клеток (рис. 4).

Таким образом, по сравнению с новорожденными и половозрелыми крысами Вистар у самок крыс препубертатного периода индуцированный ЛПС воспалительный ответ наиболее тяжелый, что сочетается с низким содержанием эстрадиола в сыворотке крови и выраженной супрессией иммунного ответа, характеризующейся апоптозом клеток тимуса, снижением *ex vivo* продукции цитокинов – ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН- γ , ФНО- α , в периферической крови числа Т-лимфоцитов – регуляторных, цитотоксических и хелперов.

2. Самцы

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС (15 мг/кг) часть животных погибла от эндотоксинового шока, а показатели смертности в период новорожденности ($24\pm 7\%$, 9 из 37) были ниже, чем у препубертатных (43 ± 14 , 6 из 14) и половозрелых (56 ± 13 , 9 из 16) самцов крыс Вистар. Воспалительный ответ был наиболее выражен у самцов препубертатного периода – у них был выше показатель площади некрозов в печени (рис. 2Б), повышение уровня активности АлАТ и АсАТ, эндотоксина и содержания кортикостерона в сыворотке крови (рис. 1), а также выраженная супрессия иммунного ответа, характеризующаяся подавлением продукции всех исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов (рис. 3), повышением содержания апоптотически гибнущих тимоцитов (табл. 1) и выраженным снижением числа Т-лимфоцитов в периферической крови (рис. 4). В отличие от

других возрастных периодов у десятидневных самцов крыс Вистар воспалительный процесс сопровождался повышением концентрации кортикостерона, тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови, что, по-видимому, связано с активацией их секреции и/или снижением метаболизма.

Через сутки после введения ЛПС внутриальвеолярный отек легких чаще наблюдался у десятидневных самцов (80%), тогда как у новорожденных и половозрелых крыс он выявлялся в 50-56% наблюдений. По данным патологоанатомических исследований показано, что у детей при воспалительных процессах преобладают экссудативные реакции (Ивановская Т.Е., Гусман Б.С., 1981; Серов В.В., Пауков В.С., 1995). Выраженность воспалительных изменений в легких в ответ на введение ЛПС у новорожденных и крыс препубертатного возраста не различалась (рис. 2А). По сравнению с этими двумя возрастными группами у половозрелых самцов количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было максимальным (рис. 2А). Миграция нейтрофилов и их активация – основной механизм развития острого воспаления, в том числе острого респираторного дистресс-синдрома (Kruger P. et al., 2015). Функциональная зрелость иммунной системы у половозрелых самцов обеспечивает развитие эффективных механизмов миграции и активации нейтрофилов по сравнению с новорожденными и десятидневными крысами (Симонова Е.Ю. и соавт., 2014; Klein S.L., Roberts C.W., 2010).

При развитии индуцированной ЛПС системной воспалительной реакции наиболее выраженные патологические изменения гепатоцитов наблюдались 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 (рис. 2Б). После введения ЛПС уровень активности АлАТ и АсАТ повышался в сыворотке крови у крыс препубертатного [АлАТ: контрольная группа – 31 (19-31) Е/л, ЛПС – 154 (75-180) Е/л, $p=0,02$; АсАТ: контрольная группа – 143 (73-167) Е/л, ЛПС – 529 (398-660) Е/л, $p=0,02$] и половозрелого периодов [АлАТ: контрольная группа – 78 (69-87) Е/л, ЛПС – 297 (145-398) Е/л, $p=0,02$; АсАТ: контрольная группа – 103 (100-119) Е/л, ЛПС – 425 (188-604) Е/л, $p=0,01$], а у новорожденных не отличался от значений контрольной группы [АлАТ: контрольная группа – 51 (29-74) Е/л, ЛПС – 102 (52-174) Е/л, $p=0,1$; АсАТ: контрольная группа – 197 (133-372) Е/л, ЛПС – 294 (179-343) Е/л, $p=0,3$].

На 1-е сут после введения ЛПС содержание эндотоксина в сыворотке крови у крыс всех трех исследованных возрастных групп повышалось (рис. 1А). Однако в отличие от новорожденных более выраженное повышение уровня эндотоксина наблюдалось у крыс препубертатного и половозрелого периодов постнатального развития. Одним из процессов, приводящих к увеличению уровня эндотоксина в сыворотке крови, является повышение проницаемости

эпителиального барьера толстой кишки вследствие возрастания концентрации кортикостерона, что приводит к транслокации бактерий, в том числе и грамотрицательных (Zheng G. et al., 2013). По нашим данным у десятидневных самцов через сутки после введения ЛПС выраженное повышение содержания кортикостерона сочеталось с высоким уровнем эндотоксина и тяжестью воспалительного процесса (рис. 1, рис. 2).

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). В экспериментальных исследованиях J.L. Wynn и соавт. (2007) было показано, что выраженность проявления воспалительной реакции 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.

По сравнению с новорожденными самцами у десятидневных и половозрелых крыс при введении ЛПС развивалась выраженная акцидентальная инволюция тимуса. Однако в отличие от половозрелых у самцов препубертатного возраста резкое опустошение коркового вещества тимуса сочеталось с картиной «звездного неба» и повышением числа апоптотически гибнущих тимоцитов, в том числе и CD3⁺ Т-лимфоцитов (табл. 1). 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 определялась гиперплазия белой пульпы [контрольная группа – 11,8% (10,4-13,15), ЛПС – 35,9% (32,2-39,6), $p=0,03$].

Через сутки после введения ЛПС у десятидневных и половозрелых самцов крыс Вистар снижалось содержание TGF- β в сыворотке крови [препубертатные: контрольная группа - 57,3 (43,0-63,5) нг/мл, ЛПС – 20,1 (17,4-31,3) нг/мл, $p=0,01$; половозрелые: контрольная группа – 50,8 (43,0-64,0), ЛПС – 20,2 (19,2-29,4) нг/мл, $p=0,009$], тогда как у новорожденных его концентрация не изменялась [контрольная группа – 18,9 (16,8-27,1) нг/мл, ЛПС – 17,0 (15,2-18,2) нг/мл, $p=0,09$]. Развитие менее выраженного воспалительного процесса у новорожденных самцов сочеталось с увеличением уровня продукции Тх1-цитокина ИЛ-2 и провоспалительного – ФНО- α (рис. 3). Тяжелое течение СВО у крыс препубертатного возраста сопровождалось супрессией иммунного ответа и выраженным снижением *ex vivo* продукции и секреции клетками селезенки ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО- α и TGF- β (рис. 3). В половозрелом периоде воспалительный

ответ протекал на фоне снижения содержания ИЛ-2, ИЛ-4, провоспалительных – ФНО- α и ИФН- γ , противовоспалительного цитокина TGF- β .

При введении высокой дозы ЛПС 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 Th2-типу (Adkins B. et al., 2004; Levy O., 2007).

Выраженные проявления воспалительного ответа у десятидневных самцов сопровождались снижением числа Т-цитотоксических и В-лимфоцитов, а у половозрелых самцов в периферической крови выявлено повышение относительного [контрольная 5,6 (2,9-9,6)%, ЛПС 28,3 (21,0-38,7)%, $p=0,0001$] и абсолютного числа [контрольная 0,5 (0,2-0,8) млн/мл, ЛПС 5,1 (3,3-10,4)% млн/мл, $p=0,002$] NK-клеток – компонента врожденного звена иммунитета, и снижение – Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических и регуляторных (рис. 4).

Таким образом, воспалительный ответ, индуцированный введением ЛПС, наиболее выражен у самцов в препубертатном периоде: 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 продукции про- и противовоспалительных цитокинов и снижение числа Т-хелперов, цитотоксических и В-лимфоцитов в периферической крови.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ЛПС ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС ВИСТАР В РАЗНЫЕ ФАЗЫ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

По данным литературы, циклические изменения содержания половых гормонов в течение менструального/эстрального цикла у особей женского пола оказывают влияние на устойчивость и восприимчивость к инфекционно-воспалительным заболеваниям (Vishwanathan S.A. et al., 2011). Введение низкой дозы ЛПС самкам крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла, характеризующиеся различным уровнем половых стероидов в крови, приводило к развитию системных проявлений воспалительного ответа разной тяжести. По сравнению с фазой проэструса, введение ЛПС самкам в фазу диэструса, характеризовалось более выраженными воспалительными изменениями органов-мишеней – легких и печени (рис. 6), что, по-видимому,

обусловлено более высоким содержанием эндотоксина в сыворотке крови. Полученные данные согласуются с литературными (Jarrar D. et al., 2000).

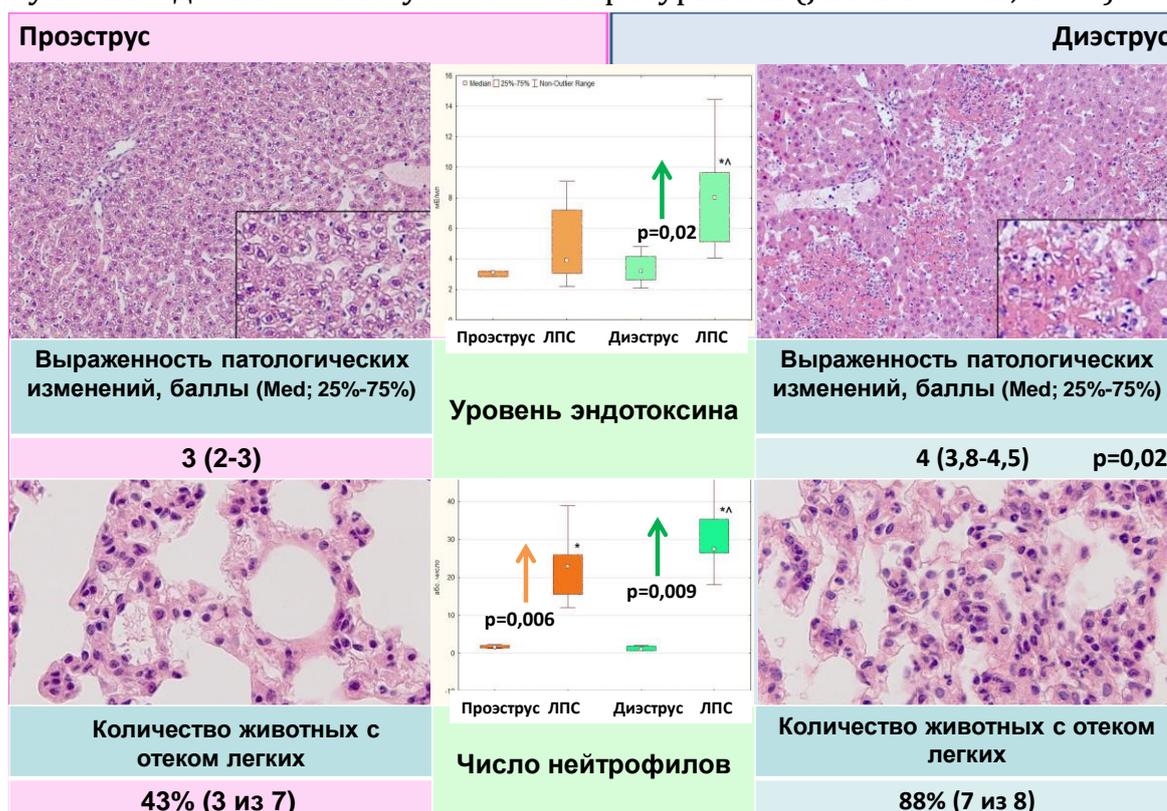


Рис. 6. Выраженность воспалительных реакций в печени и легких, уровень эндотоксина в сыворотке крови у самок крыс Вистар на 1-е сут после введения низкой (1,5 мг/кг) дозы ЛПС в фазу проэструса (■) и диэструса (■)

В тимусе у самок крыс Вистар, которым вводили ЛПС в фазу диэструса, наблюдались минимальные изменения ширины коркового вещества, а в селезенке - выраженные изменения функциональных зон: опустошение ПАЛМ и расширение герминативных центров лимфоидных узелков. Вероятно, это связано с иммунорегуляторными свойствами прогестерона, концентрация 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). 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 выявлено снижение продукции ИФН-γ и повышение – ИЛ-2, ИЛ-4.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

1. Новорожденные

По сравнению с новорожденными самцами контрольной группы у самок уровень эстрадиола в сыворотке крови был выше (рис. 5А). По содержанию прогестерона, тестостерона и кортикостерона, уровню эндотоксина и активности ферментов печени в сыворотке крови статистически значимых различий между группами самок и самцов выявлено не было.

На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок и самцов крыс Вистар на фоне уменьшения содержания эстрадиола в сыворотке крови наблюдалось повышение активности АлАТ и уровня эндотоксина (рис. 1А). По сравнению с самками у самцов в сыворотке крови выявлялось более выраженное снижение содержания эстрадиола.

Через сутки после введения ЛПС у новорожденных самок и самцов в легких наблюдался внутриальвеолярный отек у 67% и 56% животных соответственно и воспалительная реакция, характеризующаяся увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, количество которых у самцов было в 1,3 раза выше, чем у самок (рис. 2А). В печени у крыс обоего пола обнаруживалась 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 (табл. 1). Однако половых различий по показателям объемной доли белой и красной пульпы селезенки выявлено не было. На 1-е сут после введения ЛПС в тимусе как у новорожденных самок, так и самцов наблюдалась акцидентальная инволюция II стадии, а в селезенке - гиперплазия белой пульпы. В отличие от самцов у самок обнаружено уменьшение показателя объемной доли коркового вещества тимуса (табл. 1).

При исследовании цитокинового профиля у новорожденных крыс Вистар обнаружено, что у самок по сравнению с самцами уровень продукции клетками селезенки Тх1-цитокинов ИЛ-2 и ИФН- γ и провоспалительного цитокина ФНО- α был выше (рис. 3). По уровню продукции Тх2-цитокина ИЛ-4 и провоспалительного цитокина ИЛ-6 статистически значимых различий между группами самок и самцов выявлено не было. У самок наблюдалось снижение уровня продукции ИЛ-2, ИФН- γ и ФНО- α , что сопровождалось увеличением концентрации неоптерина в сыворотке крови, а у самцов, напротив, – повышением ИЛ-2 и ФНО- α на фоне снижения ИФН- γ (рис. 3).

У новорожденных крыс контрольных групп обоего пола относительное и абсолютное количество субпопуляций лимфоцитов в периферической крови не различалось. На 1-е сут после введения ЛПС у самцов относительное число CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных лимфоцитов было в 3 раза выше, чем у самок (рис. 4).

На 1-е сут после введения ЛПС у новорожденных самок в механизмах развития системной воспалительной реакции наиболее значимыми были иммунные 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 (рис. 7). При введении ЛПС новорожденным самцам наибольшую патогенетическую значимость имели изменения уровня эндотоксина в сыворотке крови, повышение уровня продукции T α 1-цитокина ИЛ-2 и провоспалительного ФНО- α , гиперплазия белой пульпы селезенки и воспалительные изменения в легких (рис. 7).

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.

Оценка информативности диагностически значимых различий показала, что при развитии системной воспалительной реакции у новорожденных самок основную роль играют иммунные нарушения, в первую очередь снижение выраженности провоспалительных реакций, тогда как у самцов, наибольшая патогенетическая значимость принадлежит эндотоксинемии и активации продукции провоспалительных цитокинов.

2. Препубертатные

На 1-е сут после введения ЛПС у препубертатных самцов на фоне эндотоксинемии в сыворотке крови повышалось содержание эстрадиола, тестостерона и кортикостерона, в отличие от самок, у которых было выявлено снижение концентрации прогестерона и кортикостерона, а показатель уровня эндотоксина был в 10 раз выше, чем у самцов (рис. 1). На 4-е сут после введения ЛПС 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 выраженной. Содержание кортикостерона на 4-е сут развития после введения ЛПС в сыворотке крови у крыс обоего пола было высоким и превышало значения соответствующих показателей у животных контрольных групп в 2 раза.

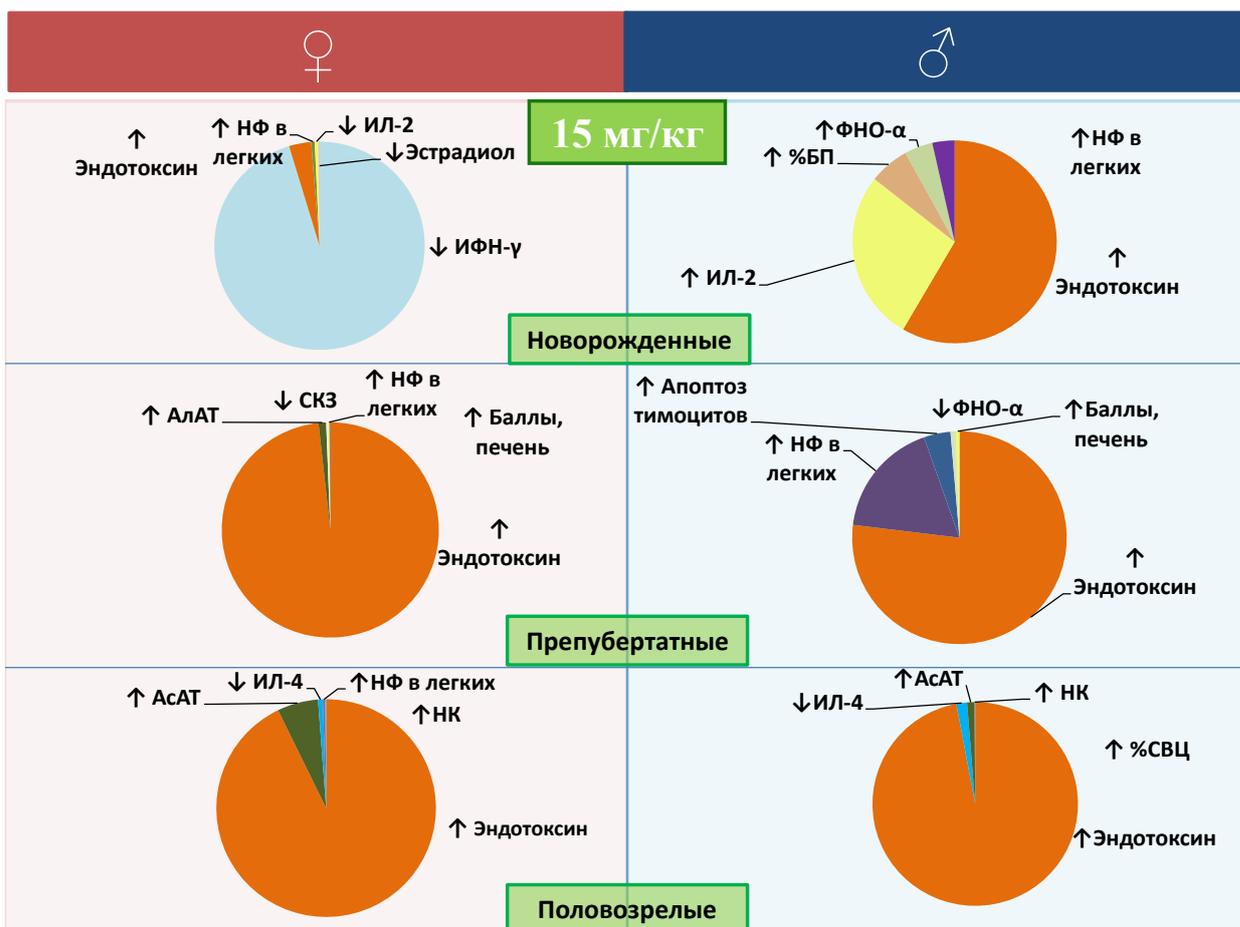


Рис. 7. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е сутки после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг) новорожденным, препубертатным и половозрелым самкам и самцам крыс Вистар. На диаграммах представлены пять максимальных значений информативности

Несмотря на выраженную эндотоксинемию, через сутки после введения ЛПС у десятидневных самок тяжесть воспалительного процесса в органах-мишенях была менее выраженной, чем у самцов (рис. 2). Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких увеличивалось у крыс обоего пола, однако более выраженная инфильтрация нейтрофилами выявлена у самцов (рис. 2А). В печени у крыс обоего пола обнаруживались обширные некрозы, площадь которых у самцов была выше. 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 после введения ЛПС у десятидневных крыс обоего пола в тимусе развивалась выраженная акцидентальная инволюция, которая характеризовалась сужением объемной доли коркового вещества, картиной «звездного неба» и повышением содержания апоптотически гибнущих

тимоцитов (табл. 1). Инволюция тимуса у самок сопровождалась сужением субкапсулярной зоны, а у самцов в эти сроки ее ширина статистически значимо не изменялась (табл. 1). На 4-е сут у самок морфологическая структура тимуса восстанавливалась, а у самцов наблюдалось расширение субкапсулярной зоны, и у части животных – в корковом веществе выявлялась картина «звездного неба». В селезенке у десятидневных самок и самцов в разные сроки развития воспалительного ответа 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 обнаружено снижение *ex vivo* продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО- α клетками селезенки (рис. 3) и содержания TGF- β в сыворотке крови. В отличие от самцов у самок в крови наблюдалось повышение концентрации неоптерина, что свидетельствует об активации T χ 1-типа иммунного ответа. На 4-е сут после введения ЛПС у крыс обоего пола определялось уменьшение 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 [самки 0,8 (0,4-1,7) млн/мл, самцы 0,2 (0,04-0,3) млн/мл, $p=0,01$]. 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 уменьшалось количество только Т-цитотоксических и В-лимфоцитов, что, по-видимому, свидетельствует о менее выраженной миграции и гибели лимфоцитов (рис. 4).

В работе L.F. Gentile et al. (2014) показано, что по сравнению с животными репродуктивного возраста у самцов мышей препубертатного периода при развитии, так называемого, абдоминального сепсиса отмечается более высокая смертность, что сопровождается как снижением уровня продукции про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-10), так и хемокинов MCP-1 и MIP-1 α , низким количеством перитонеальных нейтрофилов и макрофагов, а также продукцией реактивных форм кислорода, что согласуется с полученными нами данными. 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).

Однако данные литературы о половых различиях морфофункционального состояния иммунной системы и органов-мишеней при системном воспалительном ответе 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 сепсис в 2,8 раз чаще встречается у мальчиков по сравнению с девочками. 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 оценки информативности статистически значимо изменяющихся показателей при введении ЛПС показано, что у препубертатных крыс обоего пола максимальную патогенетическую значимость в развитии воспалительного ответа имела эндотоксинемия, что сочеталось с выраженной тяжестью альтерации и воспаления в печени и легких (рис. 7). Среди иммунных нарушений при введении ЛПС 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 было информативным только в поздние сроки эксперимента.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР С ЭНДОТОКСИНЕМИЕЙ, ИНДУЦИРОВАННОЙ РАЗНЫМИ ДОЗАМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

После введения высокой дозы (15 мг/кг) ЛПС самкам и самцам содержание всех половых стероидных гормонов в сыворотке крови не изменялось, тогда как введение низкой дозы (1,5 мг/кг) вызывало снижение содержания эстрадиола у самок и тестостерона у самцов.

Как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС внутриальвеолярный отек выявлялся чаще у самцов (низкая доза: самки – 3 из 7, самцы – 7 из 8 животных; высокая доза: самки – 3 из 10, самцы – 9 из 14). 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 (рис. 2А). Тогда как при введении низкой дозы ЛПС, количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у самцов [10,29 (8,14-13,86)] было выше по сравнению с самками [5,71 (4,71-7,57); $p=0,002$].

По сравнению с низкой введение высокой дозы ЛПС приводило к развитию более выраженных альтеративных изменений в печени и повышению уровня активности АЛАТ и АсАТ в сыворотке крови, однако

половых различий тяжести патологических изменений в печени как при введении высокой, так и низкой дозы, не обнаружено.

Через сутки после введения высокой дозы ЛПС в сыворотке крови как у самцов, так и у самок наблюдалось более выраженное увеличение уровня эндотоксина по сравнению с группами животных, которым вводили низкую дозу ЛПС (рис. 8А). Показатели эндотоксина были выше его значений в контрольной группе более чем в 100 раз у самцов, и в 40 раз – у самок. По данным литературы высокий уровень эндотоксина в сыворотке крови является неблагоприятным прогностическим критерием тяжести течения септического шока, а его терапевтическая элиминация повышает выживаемость и снижает риск развития полиорганной недостаточности, содержание С-реактивного белка и прокальцитонина в сыворотке крови, нормализует артериальное давление (Yaguchi A. et al. 2012; Adamik B. et al., 2015).

На 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС у самок повышалось содержание кортикостерона в сыворотке крови. При введении высокой дозы ЛПС у самцов наблюдалось снижение концентрации кортикостерона в сыворотке крови, тогда как у самок этот показатель статистически значимо не отличался от значений контрольной группы (рис. 8Б).

При введении низкой дозы ЛПС у самцов по сравнению с самками выявлена более выраженная акцидентальная инволюция тимуса, однако повышение числа апоптотически гибнущих тимоцитов в равной мере наблюдалось у особей обоего пола (табл. 2). На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС как у самцов, так и у самок выявлена акцидентальная инволюция более поздних II-III стадий, причем у самцов её проявления оказались более выраженными, что сопровождалось высокими показателями относительного содержания апоптотически гибнущих клеток (табл. 2).

На 1-е сут после введения высокой дозы ЛПС по сравнению с низкой в селезенке у самцов и самок наблюдалось более выраженное расширение герминативных центров лимфоидных узелков и уменьшение объемной доли маргинальных зон (табл. 3). Однако при введении высокой дозы ЛПС у животных изменений показателей объемной доли ПАЛМ-зоны выявлено не было, тогда как введение низкой дозы ЛПС приводило к снижению этого показателя. По данным морфометрической оценки как при введении низкой, так и высокой дозы ЛПС в селезенке у крыс обоего пола морфофункциональных изменений обнаружено не было.

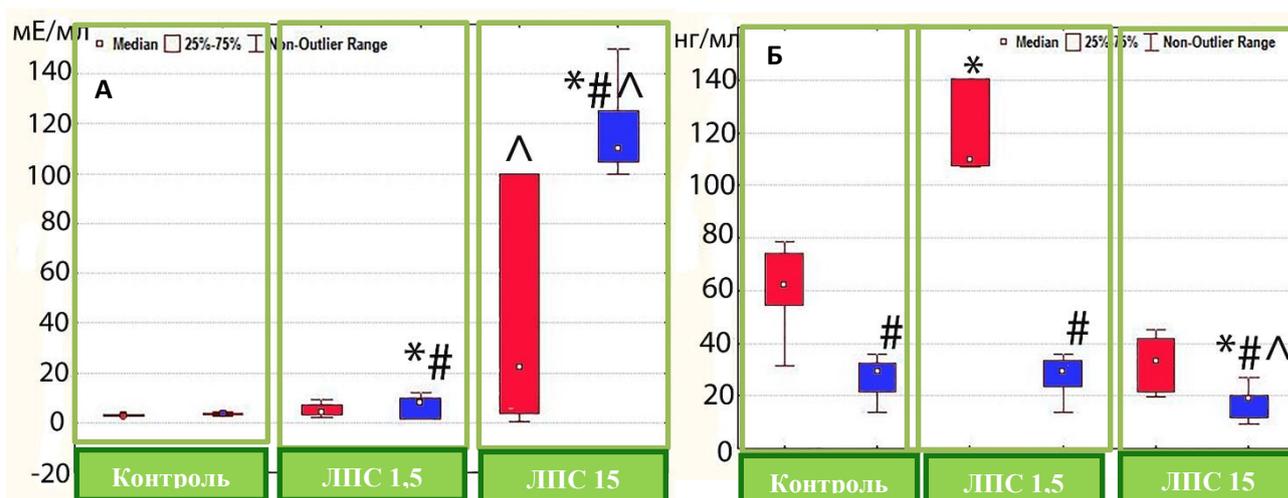


Рис. 8. Изменения уровня эндотоксина (А) и содержания кортикостерона (Б) в сыворотке крови у половозрелых самок (■) и самцов (■) на 1-е сут после введения ЛПС в низкой (1,5 мг/кг) и высокой (15 мг/кг) дозах. Статистически значимые различия по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; # - самками соответствующей группы; ^ - группой крыс того же пола после введения низкой дозы ЛПС

Низкая доза ЛПС приводила к повышению уровня *ex vivo* продукции ФНО- α и снижению ИЛ-2 у самок, тогда как у самцов содержание ИЛ-2 в культуре клеток селезенки увеличивалось, а продукция ИЛ-4, напротив, уменьшалась, что свидетельствует о преимущественной поляризации иммунного ответа по Тх1-типу у самцов. При введении высокой дозы ЛПС у самцов наблюдалось выраженное снижение продукции всех цитокинов, тогда как у самок уменьшался только уровень ИЛ-4 и ФНО- α (рис. 3). При введении как низкой, так и высокой дозы ЛПС в периферической крови по сравнению с самками у самцов выявлено более выраженное снижение цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов. Снижение числа Т-лимфоцитов в периферической крови у больных сепсисом и септическим шоком свидетельствуют об иммуносупрессии (Pravda J., 2014), причем более выраженное снижение числа CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на ранних сроках сепсиса и септического шока коррелируют с неблагоприятным прогнозом (Rimmelè T. et al., 2016).

При введении низкой дозы ЛПС наиболее значимыми в механизмах развития воспалительного ответа у самок и самцов были иммунные 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 по показателям информативности нивелируются (рис. 9).

Таблица 2

Морфометрическая характеристика тимуса у некастрированных и кастрированных половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС, (Med; 25-75%)

Группа наблюдения		Объемная доля коркового вещества тимуса, %		Ширина субкапсулярной зоны, мкм		Апоптоз клеток тимуса, %		Статистическая значимость (p)
		Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	
Некастрированные	Контрольная	49,17 ^{1*} (46,17-54,00)	55,19 ¹ (50,8-57,6)	34,1 ⁶ (31,3-37,2)	25,75 ⁶ (21,58-29,16)	1,3 ¹¹ (1,1-1,3)	0,4 ¹¹ (0,1-1,0)	0,01 ¹⁻¹ 0,04 ⁶⁻⁶ 0,02 ⁷⁻⁷ 0,05 ¹¹⁻¹¹
	ЛПС 1.5 мг/кг	58,18 ² (54,29-58,57)	55,66 ² (54,91-56,55)	25,2 ⁷ (21,2-27,8)	38,98 ⁷ (38,87-41,54)	4,2 ¹² (3,1-6,0)	3,55 ¹² (3,2-4,1)	
	ЛПС 15 мг/кг	32,81 ³ (29,4-41,1)	46,25 ³ (39,4-53,3)	0,00 ⁸ (0,0-15,6)	0,00 ⁸ (0,0-0,0)	1,4 ¹³ (0,4-1,6)	1,5 ¹³ (0,9-2,3)	
Кастрированные	Контрольная	69,3 ⁴ (66,8-72,3)	54,9 ⁴ (53,2-56,7)	50,3 ⁹ (44,7-50,6)	63,1 ⁹ (59,27-68,11)	не опр.	не опр.	
	ЛПС 1.5 мг/кг	61,05 ⁵ (59,96-63,27)	61,38 ⁵ (58,71-64,52)	37,7 ¹⁰ (37,7-39,5)	23,35 ¹⁰ (20,34-26,56)	не опр.	не опр.	
Статистическая значимость различий (p)		0,004 ¹⁻² 0,003 ¹⁻³ 0,03 ²⁻³ 0,0003 ¹⁻⁴	0,002 ¹⁻³ 0,02 ²⁻³	0,005 ⁶⁻⁷ 0,0001 ⁶⁻⁸ 0,0001 ⁷⁻⁸ 0,004 ⁶⁻⁹ 0,004 ⁷⁻¹⁰	0,01 ⁶⁻⁷ 0,0001 ⁶⁻⁸ 0,0001 ⁷⁻⁸ 0,01 ⁶⁻⁹ 0,006 ⁹⁻¹⁰	0,004 ¹¹⁻¹² 0,0002 ¹²⁻¹³	0,003 ¹¹⁻¹² 0,04 ¹¹⁻¹³ 0,01 ¹²⁻¹³	

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

Таблица 3

Морфометрическая характеристика селезенки у некастрированных и кастрированных половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС, (Med; 25-75%)

Группа наблюдения		ПАЛМ, %		Маргинальные зоны лимфоидных узелков, %		Герминативные центры, %		Статистическая значимость половых различий (p)
		Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	
Некастрированные	Контрольная	41,4 ^{1*} (35,8-43,6)	26,3 ¹ (24,7-29,1)	33,9 ⁶ (29,5-35,4)	44,7 ⁶ (40,1-46,5)	22,2 ¹¹ (19,2-25,7)	22,1 ¹¹ (19,7-24,3)	0,01 ¹²⁻¹²
	ЛПС 1.5 мг/кг	23,2 ² (22,0-24,4)	23,9 ² (22,9-24,2)	41,6 ⁷ (40,6-43,0)	37,7 ⁷ (35,5-41,1)	46,0 ¹² (40,0-47,3)	30,7 ¹² (29,3-32,3)	
	ЛПС 15 мг/кг	40,4 ³ (39,8-42,3)	25,0 ³ (23,1-25,7)	22,9 ⁸ (10,2-27,5)	12,8 ⁸ (8,1-24,7)	66,6 ¹³ (60,9-69,3)	61,0 ¹³ (51,0-75,1)	
Кастрированные	Контрольная	27,8 ⁴ (23,6-28,6)	17,4 ⁴ (16,7-18,0)	34,9 ⁹ (26,2-50,2)	27,3 ²⁹ (25,9-28,3) ⁴	20,2 ¹⁴ (14,6-28,2)	26,8 ¹⁴ (24,9-27,9)	
	ЛПС 1.5 мг/кг	24,2 ⁵ (23,0-25,4)	28,18 ⁵ (26,6-31,2)	22,6 ¹⁰ (22,6-23,3)	27,01 ¹⁰ (24,2-30,1) ⁵	77,3 ¹⁵ (76,7-77,4)	68,4 ¹⁵ (64,7-73,5)	
Статистическая значимость различий (p)		0,008 ¹⁻² 0,04 ²⁻³ 0,0008 ¹⁻⁴	0,008 ¹⁻² 0,0008 ¹⁻⁴ 0,0013 ⁴⁻⁵	0,003 ⁶⁻⁷ 0,001 ⁶⁻⁸ 0,002 ⁷⁻⁸	0,002 ⁶⁻⁷ 0,0004 ⁶⁻⁸ 0,0001 ⁷⁻⁸ 0,0005 ⁶⁻⁹	0,02 ¹¹⁻¹² 0,006 ¹¹⁻¹³ 0,0002 ¹²⁻¹³ 0,009 ¹⁴⁻¹⁵	0,0001 ¹¹⁻¹² 0,0003 ¹¹⁻¹³ 0,001 ¹²⁻¹³ 0,01 ¹¹⁻¹⁴ 0,0003 ¹⁴⁻¹⁵	

Условные обозначения: * - номер группы наблюдения

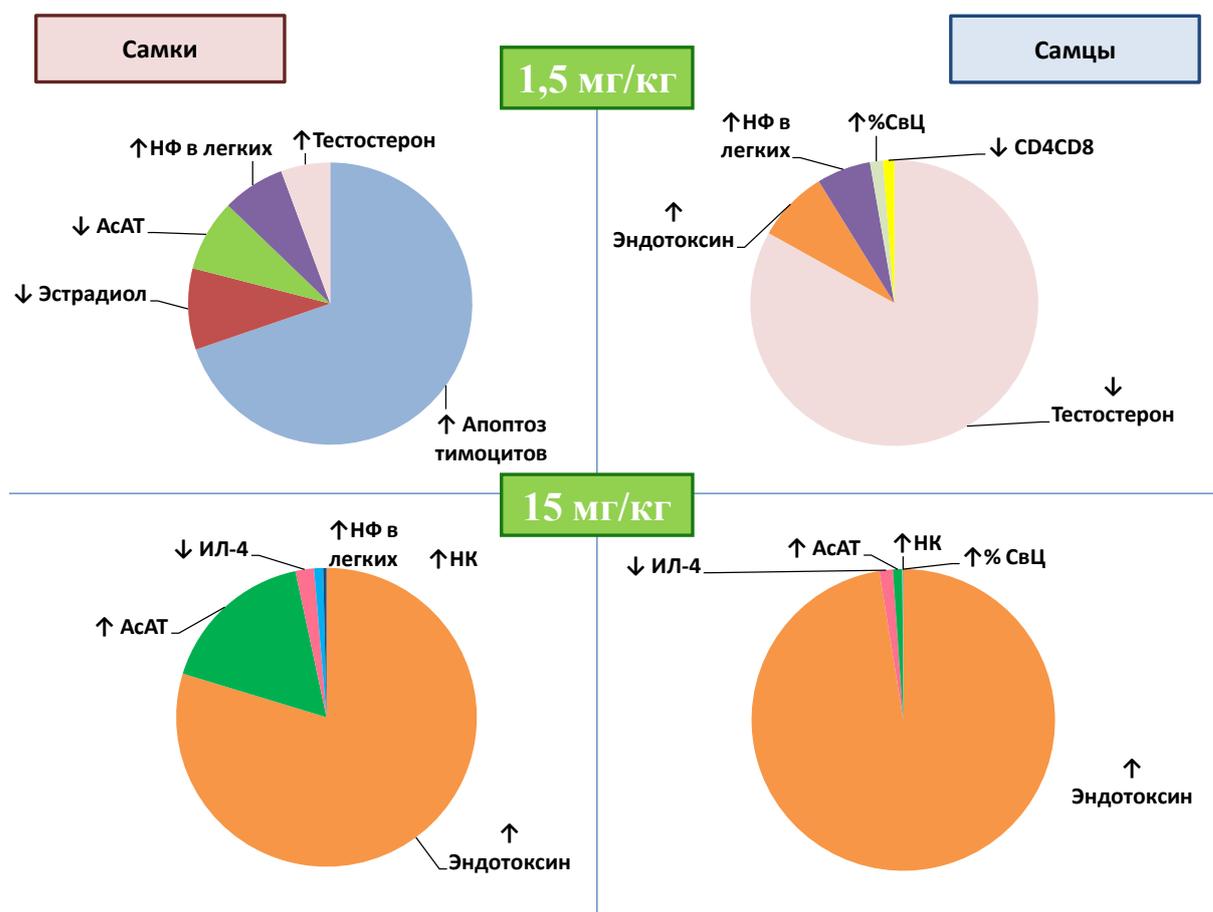


Рис. 9. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е сутки после введения ЛПС в низкой (1,5 мг/кг) и высокой (15 мг/кг) дозе половозрелым самкам в фазу проэструса и самцам крыс Вистар. На диаграммах представлены пять максимальных значений информативности

ВЛИЯНИЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ КАСТРАЦИИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ТЯЖЕСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

По сравнению с половозрелыми некастрированными самками и самцами у крыс Вистар введение низкой дозы ЛПС (1,5 мг/кг) в отдаленные сроки после овари- и орхиэктомии приводило к многократному повышению уровня эндотоксина (рис. 10). Воспалительный процесс в органах-мишенях у кастрированных самок и самцов крыс Вистар по сравнению с некастрированными животными был более выражен и характеризовался высоким числом нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (рис. 11) и распространенными некрозами в печени (рис. 12).

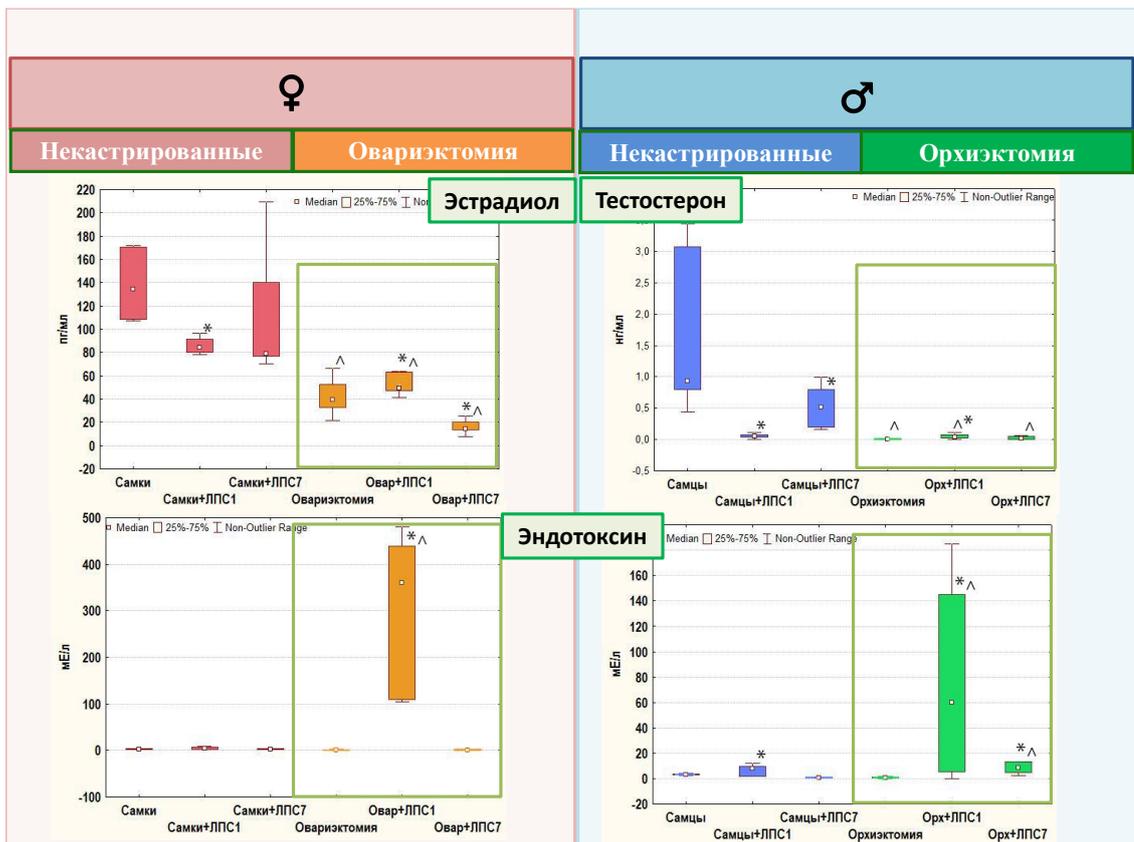


Рис. 10. Изменение содержания половых стероидных гормонов и уровня эндотоксина в сыворотке крови на 1-е и 7-е сут после введения низкой дозы ЛПС (1,5 мг/кг) некастрированным и кастрированным крысам Вистар.

■ – некастрированные самки, ■ - кастрированные самки, ■ - некастрированные самцы, ■ - кастрированные самцы. Статистически значимые различия по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой; ^ - соответствующей группой сравнения некастрированных крыс

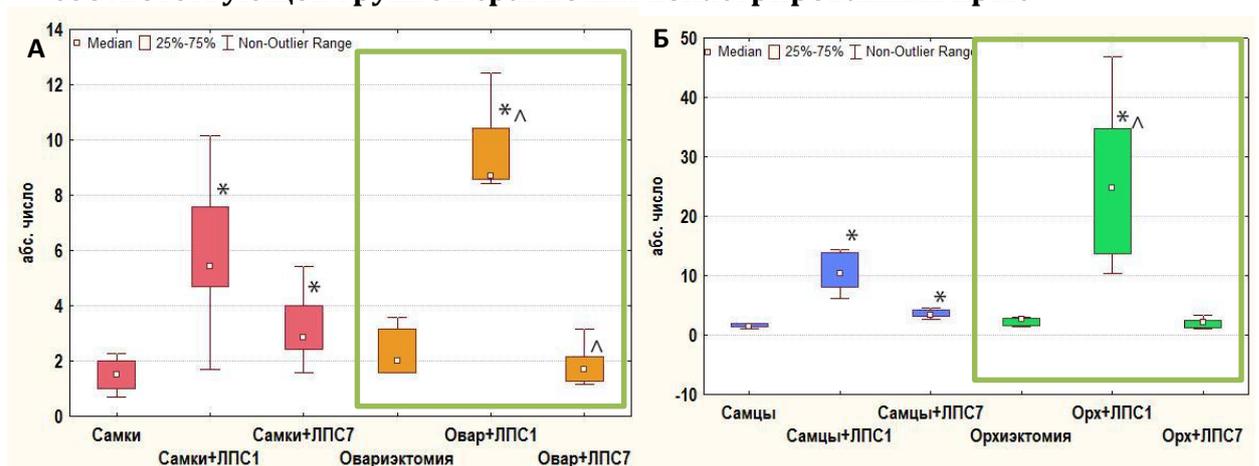


Рис. 11. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у некастрированных и кастрированных самок (А) и самцов (Б) крыс Вистар на 1-е и 7-е сут после введения низкой дозы ЛПС (1,5 мг/кг). ■ - некастрированные самки, ■ - кастрированные самки, ■ - некастрированные самцы, ■ - кастрированные самцы. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой или группой сравнения; ^ - некастрированными крысами соответствующей группы

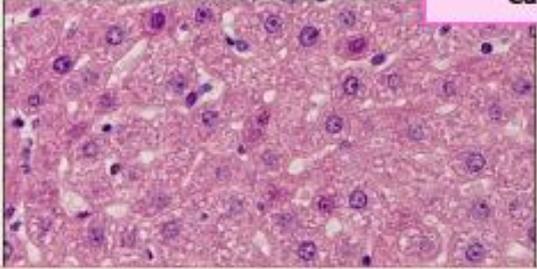
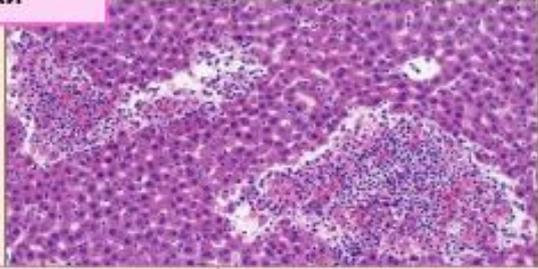
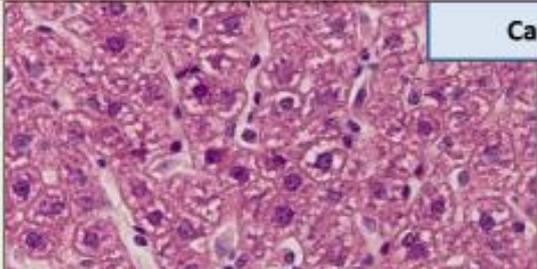
Некастрированные		Самки	Кастрированные	
				
Некрозы	14,2% (1 из 7)	33,3% (4 из 12)	Некрозы	
Выраженность патологических изменений (Med; 25-75%)	3 (2-3)	3 (2-4)	Выраженность патологических изменений (Med; 25-75%)	
		Самцы		
				
Некрозы	14,2% (1 из 7)	66,7% (6 из 9)	Некрозы	
Выраженность патологических изменений (Med; 25-75%)	2 (2-2,2)	4 (4-4)	Выраженность патологических изменений (Med; 25-75%)	

Рис. 12. Выраженность патологических изменений в печени на 1-е сут после введения низкой дозы ЛПС (1,5 мг/кг) некастрированным и кастрированным половозрелым самкам и самцам крыс Вистар

По сравнению с некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС у овариэктомированных животных в тимусе наблюдалась акцидентальная инволюция более поздних II-III стадий, которая характеризовалась картиной «звездного неба», сужением коркового вещества и его субкапсулярной зоны (табл. 2).

Более выраженная акцидентальная инволюция тимуса у кастрированных самок, по-видимому, связана с низкой концентрацией эстрадиола, который активизирует пролиферацию, дифференцировку и миграцию тимоцитов, а также супрессирует апоптотическую гибель CD4⁺CD8⁺-лимфоцитов (Erlandsson M. C. et al., 2001). У орхиэктомированных крыс, напротив, акцидентальная инволюция сопровождалась расширением коркового вещества и сужением субкапсулярной зоны тимуса. Низкие концентрации тестостерона коррелируют с шириной коркового вещества тимуса, так как показано, что физиологические концентрации тестостерона снижают число незрелых двойных позитивных лимфоцитов (CD4⁺CD8⁺) и стимулируют созревание и миграцию из тимуса на периферию CD8⁺ лимфоцитов (Olsen N.J., Kovacs W.J., 2011; Giefing-Koll C. et al., 2015).

По сравнению с некастрированными самками на 1-е сут после введения ЛПС у овариэктомированных крыс Вистар наблюдалось повышение уровня *ex*

vivo продукции провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, и ИФН- γ , а у орхиэктомированных самцов на фоне высокой продукции провоспалительного ИЛ-6 секреция ИЛ-2 была угнетена (рис. 13).

По данным анализа информативности показателей тяжести СВО после овари- и орхиэктомии показано, что наибольшую патогенетическую значимость в развитии индуцированной введением ЛПС системной воспалительной реакции у кастрированных животных обоего пола имеет эндотоксинемия наряду с патологическими изменениями органов-мишеней, тогда как гормональные и иммунные нарушения определяющими не являются (рис. 14). Выявленные особенности воспалительного ответа при введении ЛПС у кастрированных самок и самцов отражают модулирующую роль половых гормонов в развитии воспалительных реакций.

Заключение

На модели индуцированного введением ЛПС воспалительного ответа впервые выявлены половые и возрастные различия выраженности воспалительного процесса в органах-мишенях – печени и легких, морфофункционального состояния тимуса и селезенки и цитокинового профиля. В каждом из возрастных периодов выявлены половые различия морфофункциональных изменений иммунной системы при эндотоксинемии, индуцированной введением ЛПС, но они выражены в разной мере. Максимальная выраженность половых различий течения воспалительного процесса наблюдается в половозрелом возрасте при введении ЛПС в низкой дозе – 1,5 мг/кг, которая у самцов вызывает наиболее тяжелые патологические изменения в органах-мишенях, эндотоксинемия, выраженную акцидентальную инволюцию тимуса, увеличение *ex vivo* продукции ИЛ-2 и содержания провоспалительного маркера неоптерина на фоне снижения числа регуляторных и хелперных Т-лимфоцитов. Тогда как при введении высокой дозы ЛПС – 15 мг/кг половые различия нивелируются.

По сравнению с другими возрастными группами наиболее тяжелое течение воспалительного ответа при введении ЛПС наблюдается у животных препубертатного периода, который характеризуется низкими концентрациями эстрадиола и тестостерона. Но, несмотря на отсутствие различий в концентрации половых стероидов у самок и самцов препубертатного периода, нами впервые показано, что течение воспалительного ответа более выражено у самцов, тогда как акцидентальная инволюция тимуса, снижение продукции про- и противовоспалительных цитокинов, числа Т-хелперов, цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов у препубертатных животных обоего пола выражены в равной мере. Как и в препубертатном периоде у новорожденных и половозрелых крыс течение воспалительного ответа более тяжелое у самцов, что, по-видимому, связано с

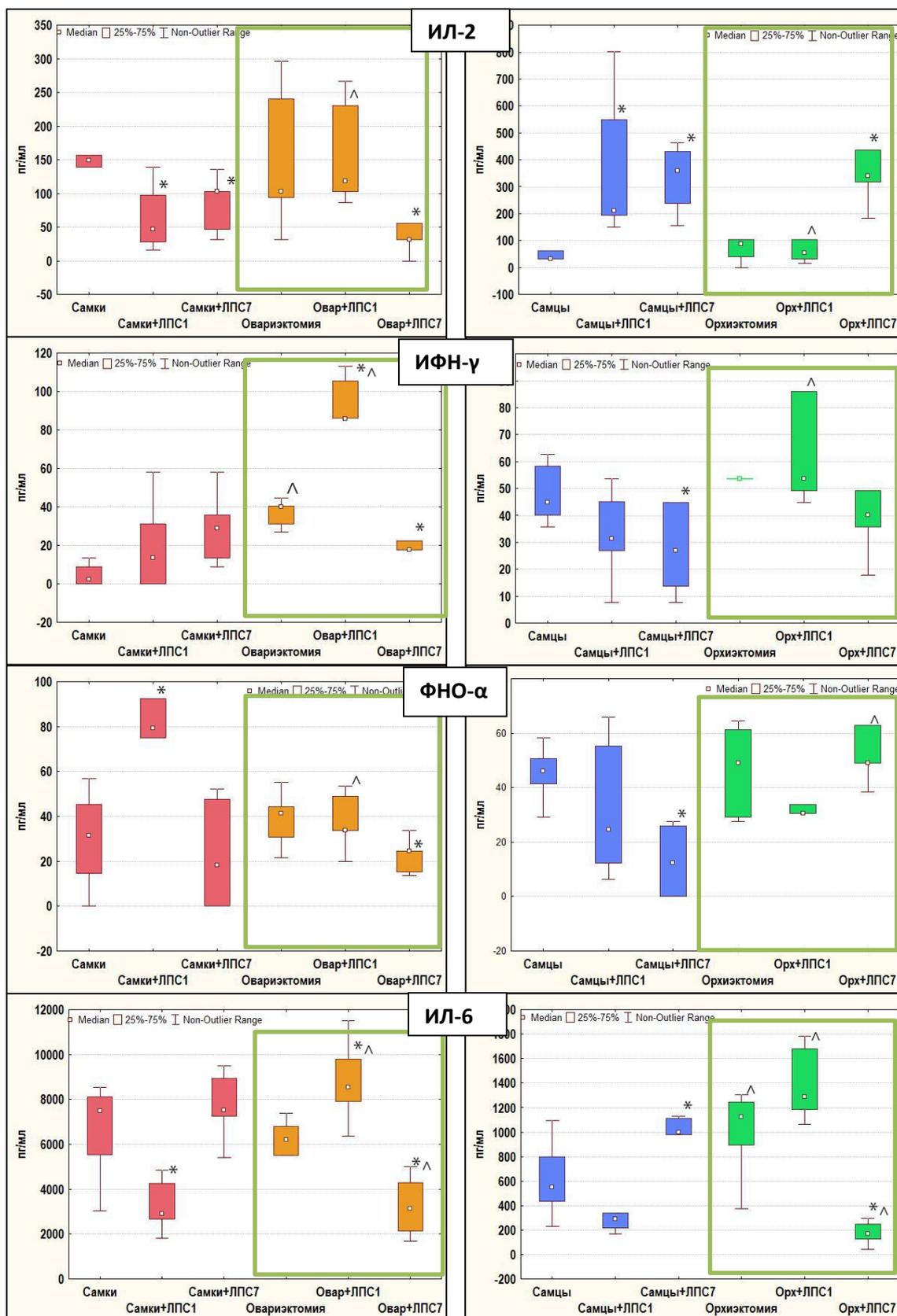


Рис. 13. Изменение уровня продукции цитокинов клетками селезенки у некастрированных и кастрированных самок и самцов крыс Вистар на 1-е и 7-е сут после введения низкой дозы ЛПС (1,5 мг/кг). ■ - некастрированные самки, ■ - кастрированные самки, ■ - некастрированные самцы, ■ - кастрированные самцы. Различия статистически значимы по сравнению с: * - соответствующей контрольной группой или группой сравнения; ^ - некастрированными крысами соответствующей группы

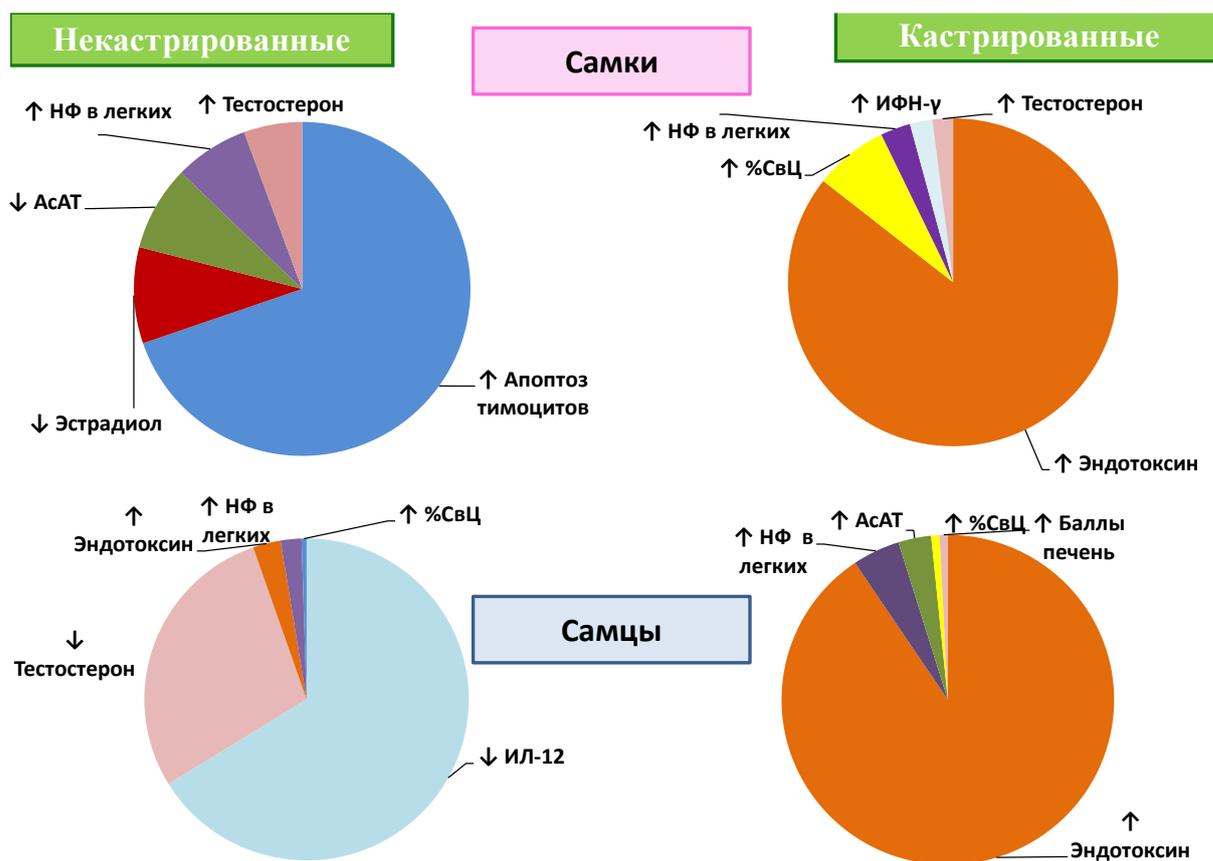


Рис. 14. Значения информативности (по Кульбаку) статистически значимо изменяющихся показателей на 1-е сутки после введения низкой дозы ЛПС (1,5 мг/кг) некастрированным и кастрированным половозрелым самкам и самцам крыс Вистар. На диаграммах представлены пять максимальных значений информативности

различным уровнем экспрессии генов иммунного ответа, расположенных в половых хромосомах (рис. 15). Тогда как реакции иммунной системы при СВО, индуцированном ЛПС, модулируются половыми гормонами. Так, высокое содержание эстрадиола и низкое тестостерона у новорожденных самцов коррелирует с увеличением продукции ИЛ-2 и ФНО-α. Высокая физиологическая концентрация тестостерона у половозрелых самцов определяет более выраженную супрессию продукции про- и противовоспалительных цитокинов, снижение числа цитотоксических Т- и В-лимфоцитов по сравнению с самками.

Хирургическая кастрация животных обоего пола усугубляет течение системной воспалительной реакции, что свидетельствует об иммуномодулирующем и противовоспалительном, и, в конечном итоге, протективном действии как эстрадиола, так и тестостерона.

Полученные нами приоритетные фундаментальные данные о половых различиях морфофункциональных изменений иммунной системы и воспалительного ответа при эндотоксинемии у крыс разных возрастных групп

и при кастрации позволяют систематизировать представления об основных закономерностях иммуномодулирующего действия половых гормонов, что следует учитывать при разработке новых подходов к персонализированному лечению инфекционно-воспалительных заболеваний лиц разного пола и возраста с учетом содержания половых стероидных гормонов, особенно, у детей препубертатного возраста и пожилых людей.

Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые
Эстрадиол $\text{♀} = \text{♂}$ Тестостерон	Эстрадиол $\text{♀} = \text{♂}$ Тестостерон	Эстрадиол $\text{♀} > \text{♂}$ Тестостерон $\text{♀} < \text{♂}$
Тяжесть СВО Низкая $\text{♀} < \text{♂}$	Тяжесть СВО Высокая $\text{♀} < \text{♂}$	Тяжесть СВО Умеренная $\text{♀} < \text{♂}$
Иммуносупрессия ♀ Активация иммунной системы ♂	Иммуносупрессия $\text{♀} = \text{♂}$	Иммуносупрессия $\text{♀} < \text{♂}$
Кариотип Гормоны	Кариотип	Кариотип Гормоны

Рис. 15. Половые и возрастные различия системного воспалительного ответа у крыс Вистар при эндотоксинемии

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, 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, входящих в перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Половые различия реакции иммунной системы и легких при экспериментальном остром эндотоксикозе / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю., Макарова О.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – №3. – С. 318-321.
2. Гистофизиология иммунной системы и барьерных органов крыс Вистар в отдаленные сроки после орхиэктомии / **Косырева А.М.** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – №10. – С. 476-480.
3. Морфологическая и иммунологическая характеристика системного воспалительного ответа у орхиэктомированных крыс Вистар / **Косырева А.М.**, Хомякова Т.И., Макарова О.В. // Иммунология. – 2012. – №4. – С. 194-198.
4. Морфологические проявления системного воспалительного ответа в печени и легких крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла / **Косырева А.М.**, Диатроптов М.Е. // Иммунология. – 2013. – №2. – С. 111-114.
5. Гистофизиология иммунной системы самок крыс Вистар в отдаленные сроки после овариэктомии / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – №5. – С. 653-656.
6. Морфологическая и иммунологическая характеристика системного воспалительного ответа у овариэктомированных крыс Вистар / **Косырева А.М.**, Макарова О.В. // Цитокины и воспаление. – 2013. – №1-2. – С. 78-82.
7. Морфофункциональное состояние органов иммунной системы и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла / Симонова Е.Ю., **Косырева А.М.** // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2014. – №2. – С. 51-56.
8. Половые различия морфофункциональных и иммунологических проявлений синдрома системного воспалительного ответа у десятидневных крыс Вистар / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю., Макарова О.В., Михайлова Л.П. // Цитокины и воспаление. – 2014. – №2. – С. 45-50.
9. Половые гистофизиологические различия иммунной системы у новорожденных крыс Вистар / Симонова Е.Ю., **Косырева А.М.**, Пономаренко Е.А. // Цитокины и воспаление. – 2014. – №3. – С. 38-42.
10. The sex differences of morphology and immunology of SIRS of newborn Wistar rats / **Kosyreva A. M.** // ISSN Inflammation. – 2014. – v. 2014. – article ID 190749, 7 pages. doi:10.1155/2014/190749.
11. Возрастные особенности и половые различия морфофункциональных изменений тимуса у крыс Вистар при системном воспалительном ответе / **Косырева А.М.**, Макарова О.В., Осмоловская Е.Ю. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – №1. – С. 18-26.
12. Возрастные особенности иммунологических и морфологических проявлений системного воспалительного ответа у самок крыс Вистар / **Косырева А.М.** // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – №3. – С. 30-37.
13. Морфологические изменения органов-мишеней и цитокиновый профиль при системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар в постнатальном онтогенезе / Макарова О.В., **Косырева А.М.**, Осмоловская Е.Ю. // Иммунология. – 2016. – №4. – С. 205-211.

Другие публикации

14. Возрастные изменения морфофункционального состояния иммунной системы у крыс Вистар / Симонова Е.Ю., **Косырева А.М.**, Макарова О.В., Диатроптов М.Е. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – №1. – С. 35-41.

15. Морфофункциональные изменения органов иммунной системы самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла и при кастрации / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю., Макарова О.В. // Материалы X Конгресса Международной Ассоциации морфологов, Ярославль. Морфология. – 2010. – №4. – С. 101.
16. Половые различия реакции иммунной системы крыс Вистар при остром эндотоксикозе / **Косырева А.М.**, Макарова О.В., Симонова Е.Ю., Цветков И.С. // Сборник научных трудов Первой Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций». Египет, г. Сафага. – 2010. – С. 111-114.
17. Морфофункциональная характеристика иммунной системы и барьерных органов крыс Вистар при андрогенной недостаточности / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю. // Сборник научных трудов IV Всероссийской научно-практической конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Москва. – 2011. – С. 41-43.
18. Сравнительная характеристика реакции иммунной системы самцов и самок крыс Вистар в ответ на введение липополисахарида / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю., Макарова О.В. // Материалы XIV Всероссийского научного форума с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». Медицинская иммунология. – 2011. – №4-5. – С. 319-320.
19. Половые различия морфофункциональных изменений тимуса, печени и легких новорожденных крыс Вистар в разные сроки острого эндотоксикоза / **Косырева А.М.**, Симонова Е.Ю., Макарова О.В. // Сборник научных трудов Научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва. – 2012. – С.84-88.
20. Морфологические изменения органов иммунной системы, печени и легких крыс Вистар при введении высокой дозы ЛПС в разные фазы эстрального цикла / **Косырева А.М.**, Диатроптов М.Е., Симонова Е.Ю. // Сборник научных трудов Международной Научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва. – 2014. – С. 139-141.
21. Половые различия морфофункциональных проявлений и иммунологических нарушений при синдроме системного воспалительного ответа у новорожденных крыс Вистар / **Косырева А.М.**, Макарова О.В. // Медицинская иммунология. – 2015. – Том 17. – С. 26-27.
22. Возрастные изменения и половые различия морфофункционального состояния иммунной системы у крыс Вистар / Макарова О.В., Симонова Е.Ю., **Косырева А.М.** // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2015. – №3. – С. 79.
23. Sex differences of experimentally induced systemic inflammatory response syndrome / Kakturskiy L., **Kosyryeva A.**, Makarova O. // Virchows Archiv. European Journal of Pathology. – 2015. – V.467 (Suppl 1): S1-S279. – P. S95.
24. Морфологические изменения тимуса, печени и легких при системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар в разные сроки постнатального онтогенеза / **Косырева А.М.**, Макарова О.В., Понамаренко Е.А. // Сборник научных трудов «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва. – 2016. – С. 89-90.
25. Половые различия морфологических изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови у половозрелых крыс Вистар при системном воспалительном ответе / **Косырева А.М.**, Сладкопепцев А.С. // Сборник научных трудов «Достижения и инновации в современной морфологии», Минск. – 2016. – С. 217-220.
26. Половые различия выраженности воспаления в органах-мишенях и особенности иммунологических нарушений при введении крысам разных доз липополисахарида / **Косырева А.М.**, Макарова О.В., Михайлова Л.П. // Материалы V Съезда Российского общества патологоанатомов с международным участием, Челябинск. – 2017. – С. 162-163.