

Косырева А. М., Сладкопевцев А. С.

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТИМУСА И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ВИСТАР ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ

Научно-исследовательский институт морфологии человека, г. Москва, Россия

По данным литературы, устойчивость к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжесть их течения и такие показатели, как выживаемость и смертность, зависят от пола [4]. К сожалению, многими авторами в большинстве как клинических, так и экспериментальных исследований пол не учитывается. Однако в ряде работ показано, что частота развития синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и сепсиса, а также показатели смертности от этих заболеваний выше у мужчин, чем у женщин, что может быть связано с различиями в уровне стероидных половых гормонов, которые оказывают иммуномодулирующее действие. В литературе отсутствуют данные, касающиеся половых различий морфологических изменений иммунной системы при системном воспалительном ответе (СВО).

Поэтому целью работы была сравнительная оценка морфологических изменений в тимусе и содержания основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у самок и самцов при СВО, индуцированном введением липополисахарида (ЛПС).

Материал и методы. Исследования проведены на половозрелых самцах ($n = 26$) и самках ($n = 37$) крыс Вистар массой тела 250–300 г. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 9 от 10 ноября 2015 г.). Во влагалищных мазках самок оценивали соотношение различных клеточных элементов и по кольпоцитограмме определяли фазу эстрального цикла. Отбирали самок в фазе проэструса, характеризующейся высоким содержанием эстрогенов в сыворотке крови.

СВО моделировали ЛПС *E. coli* штамма O26:B6 (Sigma, США) в высокой дозе — 15 мг/мл. Доза ЛПС 15 мг/кг при внутрибрюшинном введении является сублетальной для половозрелых крыс и вызывает развитие дистрофических изменений и некрозов в печени и интраальвеолярного отека с инфильтрацией межальвеолярных перегородок нейтрофилами в легких. Крысам контрольной группы ($n = 20$) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Через сутки после введения ЛПС крыс выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Смертность животных составила 56 % у самок (15 животных из 27) и 56 % у самцов (9 животных из 16).

Морфометрическое исследование тимуса проводили на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Объемную плотность функциональных зон тимуса оценивали под световым микроскопом с помощью сетки Г. Г. Автандилова (1973). Ширину субкапсулярного слоя тимуса измеряли в микрометрах при увеличении 640. В корковом веществе тимуса в стандартном

поле зрения (25 тыс. мкм²) подсчитывали количество макрофагов, фагоцитирующих фрагменты ядер. Для определения количества апоптотически гибнущих клеток в тимусе суспензию тимоцитов в концентрации 10⁶/мл метили антителами фирмы eBioscience (Австрия), конъюгированными с PE (phycoerythrin, фикоэритрином): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов) (Annexin V FITC Kit, Beckman Coulter, США). Затем клетки инкубировали с аннексином (Annexin), конъюгированным с FITC (fluorescein isothiocyanate, флуоресцин изотиоцианат), и пропилий иодидом (PI). Проводили флуороцитометрическую оценку апоптотически гибнущих клеток (Annexin⁺PI) на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций лимфоцитов использовали следующие антитела («eBioscience»): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов); anti-Rat CD4 (маркер Т-хелперов); anti-Rat CD8a (маркер цитотоксических Т-клеток); anti-Rat CD45R (маркер В-лимфоцитов); anti-Rat CD314 (маркер NK-клеток); anti-Rat CD25 (маркер активированных Т-клеток); anti-Mouse/Rat Foxp3 (маркер регуляторных Т-клеток). Проводили подсчет абсолютного количества лимфоцитов различных субпопуляций. Полученные данные подвергали статистической обработке в программе Statistica 7.0 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и факториального дисперсионного анализа (критерий Конновера). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. По сравнению с самцами в контрольной группе у самок объемная доля коркового вещества тимуса была статистически значимо ниже (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрическая характеристика тимуса самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС, Ме (25–75 %)

Показатель	Объемная доля коркового вещества тимуса, %		Ширина субкапсулярной зоны, мкм		Содержание апоптотически гибнущих тимоцитов, %		Количество МФ, фагоцитирующих фрагменты ядер
	Контрольная	ЛПС	Контрольная	ЛПС	Контрольная	ЛПС	
Самки	49,17 (47,40–54,00)	42,81* (39,41–51,11)	30,66 (28,43–31,75)	45,52* (40,89–49,42)	1,3 (1,1–1,3)	1,4 (0,4–1,6)	9,45 (9,00–13,60)
Самцы	55,19 [#] (50,80–57,59)	46,25** (39,37–53,30)	29,68 (28,35–31,89)	38,30** (35,64–41,23)	0,4 [#] (0,1–1,0)	1,5 (0,9–2,3)	17,2 ^{\$} (14,2–18,4)
Статистическая значимость различий	[#] – 0,039	* – 0,025 ** – 0,02		* – 0,0001 ** – 0,031	[#] – 0,046		^{\$} – 0,009

Примечание: МФ — макрофаги; различия статистически значимы по сравнению: * — с соответствующей контрольной группой; [#] — контрольной группой самок; ^{\$} — с опытной группой самок. Статистическая значимость различий приведена для достоверно различающихся значений.

Количество апоптотически гибнущих клеток в тимусе у самок контрольной группы, напротив, было больше, чем у самцов (табл. 1). Выявленные морфоло-

гические особенности тимуса у самок могут быть обусловлены тем, что в фазу проэструса наблюдается высокое содержание эстрадиола. По данным литературы, при беременности, развивающейся на фоне высокого содержания эстрогенов в сыворотке крови, а также в эксперименте при введении высоких доз эстрогенов самкам, наблюдается опустошение коркового вещества тимуса, резкое снижение количества тимоцитов и эпителиальных клеток в сочетании с увеличением числа CD4⁺ и CD8⁺ при снижении CD4⁺CD8⁺, что свидетельствует о негативном влиянии эстрогенов на позитивную селекцию незрелых Т-клеток [3].

В периферической крови у самок и самцов по показателям абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов статистически значимых различий не выявлено (табл. 2). Введение ЛПС крысам обоего пола приводило к развитию акцидентальной инволюции тимуса II стадии, которая характеризовалась картиной «звездного неба», гибелью лимфоцитов, увеличением числа макрофагов, фагоцитирующих фрагменты клеток. Наблюдалось сужение коркового вещества тимуса как у самок, так и у самцов (табл. 1). Ширина субкапсулярной зоны коркового вещества тимуса у крыс обоего пола увеличивалась по сравнению с контрольной группой. Число апоптотически гибнущих клеток у самок и самцов при СВО не отличалось от соответствующих показателей контрольных групп (табл. 1). Однако по сравнению с самками у самцов число макрофагов, фагоцитирующих фрагменты ядер в корковом веществе тимуса, было выше, что свидетельствует о более выраженной акцидентальной инволюции (табл. 1).

Таблица 2

Абсолютное количество субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар на 1-е сут после введения ЛПС, Ме (25–75 %)

млн/мл	Самки		Самцы	
	Контрольная	ЛПС	Контрольная	ЛПС
Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	6,8 (3,7–7,9)	7,2 (5,3–8,9)	7,1 (4,4–9,3)	3,1* ^{&} (2,3–5,3)
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	3,7 (2,4–4,2)	3,4 (2,7–4,5)	2,7 (2,5–3,8)	2,5 (2,1–4,9)
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8a ⁺)	3,2 (2,0–4,0)	3,4 (1,6–4,25)	3,4 (1,6–3,6)	1,2** ^{&&} (0,6–2,5)
В-лимфоциты (CD45 ⁺)	3,0 (2,1–4,6)	2,7 (1,7–3,4)	3,5 (2,3–4,4)	3,6 (3,4–4,7)
NK-клетки (CD314 ⁺)	4,4 (2,7–5,0)	4,7 (2,5–8,4)	4,5 (2,0–7,0)	5,1 (3,3–10,4)
Активированные Т-хелперы (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺)	0,4 (0,3–0,5)	0,7 (0,4–0,9)	0,7 (0,3–0,8)	0,4 (0,3–0,5)
Т-регуляторные лимфоциты (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺)	0,5 (0,3–0,6)	0,2* (0,09–0,4)	0,5 (0,4–0,6)	0,2*** (0,1–0,4)
Статистически значимые различия, значения	* – 0,04		* – 0,03 ** – 0,007 *** – 0,04	& – 0,01 && – 0,009

Примечание: различия статистически значимы по сравнению: * — с соответствующей контрольной группой; & — опытной группой самок. Статистическая значимость различий приведена для достоверно различающихся значений.

На 1-е сут развития СВО в периферической крови самок крыс Вистар выявлено снижение абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов. Тогда как у самцов наблюдалось снижение не только Foxp3⁺ лимфоцитов, но и Т-клеток за счет уменьшения количества Т-цитотоксических лимфоцитов (табл. 2). По данным литературы у мышей на 1-е сут развития СВО, индуцированного введением зимозана, снижается число Т-регуляторных клеток в легких, что соответствует полученным нами данным [5]. Снижение числа CD8⁺ лимфоцитов коррелирует с тяжестью течения абдоминального сепсиса у мышей [2]. В клинике у септических больных снижение количества Т-цитотоксических лимфоцитов является одним из показателей развития «иммунного паралича» [1]. Таким образом, по данным морфологического и иммунологического исследования при СВО у самцов по сравнению с самками изменения в тимусе более выражены и характеризуются высокими показателями гибели тимоцитов, а также снижением числа CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Immunosuppression* in patients who die of sepsis and multiple organ failure / J. S. Boomer [et al.] // JAMA. 2011. Vol. 306. P. 2594–2605.
2. *Sustained* and incomplete recovery of naïve CD8⁺ T-cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8⁺ T-cell responses to infection / S. A. Condotta [et al.] // J. Immunol. 2013. Vol. 190(5). P. 1991–2000.
3. *Role of oestrogen receptors α and β* in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus / M. C. Erlandsson [et al.] // Immunology. 2001. Vol. 103(1). P. 17–25.
4. *Age-specific sex-related differences in infections* : a statistical analysis of national surveillance data in Japan / N. Eshima [et al.] // PLoS One. 2012. Vol. 7(7):e42261.
5. *Regulatory T cells are protective in systemic inflammation response syndrome induced by zymosan in mice* / W. Jia [et al.] // PLoS ONE. 2013. Vol. 8(5): e64397.

Kosyreva A. M., Sladkopevtsev A. S.

Sex differences of morphological changes of the thymus and lymphocytes subpopulations of the peripheral blood in sexually mature Wistar rats in systemic inflammatory response

Research institute of human morphology, Moscow, Russia

We studied the sex differences of morphological changes of the thymus and the subpopulations of lymphocytes in the peripheral blood of male and female Wistar rats on the 1st day after intraperitoneal LPS injection in a dose of 15 mg/kg. SIRS in rats of both sexes have been followed by the accidental involution of the second stage, narrowing of the cortex and broadening of the subcortical zone of the thymus. In the peripheral blood of males and females we have found decreased absolute number of T-regulatory lymphocytes. As compared to female rats, males with SIRS had more pronounced cell loss in the thymus with decreased number of CD3⁺-lymphocytes and CD3⁺CD8⁺-cells.

Key words: SIRS, sex differences, CD8⁺-lymphocytes, thymus, apoptosis.