

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА И СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ

Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Сладкопевцев А.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Резюме. Гипоксия и иммунные реакции тесно взаимосвязаны между собой на молекулярном, клеточном и организменном уровнях, а особи отличаются по устойчивости к недостатку кислорода. Животные с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний. Данные об индивидуальных особенностях устойчивости самок лабораторных животных и лиц женского пола к гипоксии и ее взаимосвязи с реакциями иммунной системы как в норме, так и при воспалительных заболеваниях в литературе отсутствуют. Однако известно, что по сравнению с мужчинами у женщин и самок лабораторных животных реже развиваются и легче протекают острые инфекционно-воспалительные заболевания, что может определяться более высокой устойчивостью самок к гипоксии. Цель – выявить особенности морфофункциональных изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном введением ЛПС, у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Устойчивости к гипоксии половозрелых самок крыс Вистар определяли по времени жизни в вентилируемой барокамере «на высоте» 11 500 м. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время жизни которых составляло более 180 с, к низкоустойчивым – менее 20 с. Через месяц после определения устойчивости к гипоксии самкам в фазу диэструса внутрибрюшинно вводили липополисахарид *E. coli* O26:B6 в дозе 1,5 мг/кг. Животных выводили из эксперимента через сутки после введения ЛПС путем внутримышечного введения золетила в дозе 15 мг/кг. На препаратах тимуса оценивали объемную долю коркового и мозгового вещества, в печени определяли площадь некрозов, в легких подсчитывали число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Определяли содержание в сыворотке крови кортикостерона, тестостерона, TGF- β . Проводили цитофлуориметрическую оценку относительного и абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Оценивали число апоптотически гибнущих клеток тимуса. Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0, использовали критерии множественного сравнения Краскела–Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается умеренно выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, апоптозом тимоцитов, увеличением абсолютного числа NK, повышением содержания тестостерона и кортикостеро-

Адрес для переписки:

Косырева Анна Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
морфологии человека»
117418, Россия, Москва, ул. Цюрупы, 3.
Тел.: 8 (926) 950-17-50.
Факс: 8 (499) 120-80-65.
E-mail: kosyreva.a@list.ru

Address for correspondence:

Kosyreva Anna M.
Research Institute of Human Morphology
117418, Russian Federation, Moscow, Tsurupa str., 3.
Phone: 7 (926) 950-17-50.
Fax: 7 (499) 120-80-65.
E-mail: kosyreva.a@list.ru

Образец цитирования:

А.М. Косырева, Д.Ш. Джалилова, О.В. Макарова,
А.С. Сладкопевцев «Морфофункциональные изменения
тимуса и содержание субпопуляций лимфоцитов
в крови у самок крыс Вистар с разной устойчивостью
к гипоксии при системном воспалительном ответе»
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4.
С. 643-652. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-643-652
© Косырева А.М. и соавт., 2019

For citation:

A.M. Kosyreva, D.Sh. Dzhaliilova, O.V. Makarova,
A.S. Slaadkopezitsev "Morpho-functional changes of thymus
and contents of blood lymphocyte subpopulations in female
Wistar rats with different resistance to hypoxia in systemic
inflammatory response", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 4,
pp. 643-652. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-643-652
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-643-652

на. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии самок введение ЛПС приводит к более тяжелым проявлениям системного воспаления – выраженной воспалительной реакции в легких и высоким показателем площади некрозов в печени, что сопровождается увеличением числа регуляторных Т-лимфоцитов и Т-хелперов на фоне более выраженной акцидентальной инволюции тимуса и апоптотической гибели тимоцитов. У высокоустойчивых к гипоксии самок системные проявления воспаления менее выражены, что, по-видимому, связано с активацией миграции лимфоцитов из тимуса и крови в очаг воспаления и развитием более эффективного иммунного ответа.

Вывод: иммунные реакции при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у самок крыс Вистар зависят от устойчивости их к гипоксии, что необходимо использовать для разработки подходов к персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц женского пола.

Ключевые слова: тимус, регуляторные Т-лимфоциты, Т-хелперы, устойчивость к гипоксии, самки, системный воспалительный ответ, ЛПС

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF THYMUS AND CONTENTS OF BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA IN SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

Kosyreva A.M., Dzhililova D.Sh., Makarova O.V., Sladkopevtsev A.S.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Hypoxia and immune reactions are closely interrelated at molecular, cellular and organism levels, and the individuals differ in resistance to oxygen deficiency. Animals with high and low resistance to hypoxia have different adaptive capabilities and predisposition to the development of inflammatory diseases. Data on the individual characteristics of hypoxia resistance in female laboratory animals and humans, and its relationship to immune system reactions in both normal conditions and inflammatory diseases are not available in the literature. It is known, however, that acute infectious and inflammatory diseases develop at lesser rates and are less severe in women and female laboratory animals than in males, which can be explained by higher resistance of females to hypoxia. The aim of our study is to reveal the features of morpho-functional thymus changes, and subpopulation of peripheral blood lymphocytes in systemic inflammatory response induced by LPS administration to female Wistar rats with different resistance to hypoxia.

Resistance of mature female Wistar rats to hypoxia was determined as a survival period in a ventilated low-pressure chamber simulating high altitude condition (11 500 m). The rats with a lifetime “at high altitude” of > 180 s have been classified as highly resistant to hypoxia, and the animals surviving for < 20 seconds were designated low-resistant. One month after determining the hypoxia resistance, the females were injected intraperitoneally with *E. coli* O26:B6 lipopolysaccharide (LPS) at a dose of 1.5 mg/kg during the dioestrus phase. The animals were withdrawn from the experiment by i/m Zoletyl injection (15 mg/kg) one day after LPS administration. The relative volume fractions of thymic cortex and medulla were evaluated; the areas of necrosis were determined in the liver, and the number of neutrophils in the interalveolar septa was counted in the lungs. The serum contents of corticosterone, testosterone, TGF- β were determined. A flow cytometry evaluation of the relative and absolute numbers was performed for major subpopulations of lymphocytes in peripheral blood. The number of apoptotically dying cells of the thymus was assessed. For statistical processing of the obtained data, the Statistica 8.0 software was applied, using criteria of multiple comparisons by Kruskal–Wallis and Dann. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

In both high- and low-resistant to hypoxia females, the development of a systemic inflammatory response was accompanied by a moderately severe thymic involution, apoptosis of thymocytes, an increase in the absolute number of NK, and rise of testosterone and corticosterone contents. LPS injection into low-resistant rats, if compared to females highly resistant to hypoxia, led to more severe manifestations of systemic inflammation, i.e., a pronounced inflammatory reaction in the lungs and a more extensive liver necrotic area accompanied by increased absolute numbers of regulatory T lymphocytes and T helper cells, and more pronounced thymic accidental involution with apoptotic death of thymocytes. Systemic manifestations of inflammation were less pronounced in hypoxia-resistant female rats, which was apparently associated with activation of lymphocyte

migration from the thymus and blood to the inflammation focus, and development of more effective immune response.

Conclusion: immune reactions in the systemic inflammatory response induced by LPS in female Wistar rats depend on individual resistance to hypoxia. These data should be used to develop approaches to personalized therapy of infectious and inflammatory diseases in women.

Keywords: thymus, T regulatory lymphocytes, T helpers, resistance to hypoxia, females, systemic inflammatory response, lipopolysaccharide

Введение

В развитии системных воспалительных реакций и сепсиса ключевую роль играет гипоксия, возникающая в результате микроциркуляторных нарушений, обусловленных диссеминированным внутрисосудистым свертыванием [11]. Выраженность гипоксических повреждений тканей и органов зависит не только от микроциркуляторных нарушений, но и во многом определяется индивидуальной устойчивостью к гипоксии, что не учитывается при терапии и в экспериментальных исследованиях. Известно, что гипоксия и иммунные реакции тесно взаимосвязаны между собой на молекулярном, клеточном и организменном уровнях [14], а особи отличаются по устойчивости к недостатку кислорода [4, 13], в том числе по содержанию фактора, индуцируемого гипоксией, — HIF-1 α . Животные с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у низкоустойчивых животных после гипоксической нагрузки повышается содержание маркера окислительного стресса 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных макромолекул и увеличением уровня TGF- β [3]. При введении ЛПС в клетки печени у низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар наблюдается более выраженное повышение уровня экспрессии HIF-1 α , чем у высокоустойчивых животных, что может определять индивидуальные особенности течения воспалительных заболеваний. Так, показано, что при сепсисе уровень экспрессии HIF-1 α в моноцитах положительно коррелирует с выраженностью иммуносупрессии: HIF-1 α активирует IRAK-M — негативный регулятор Toll-подобных рецепторов — TLR [21]. HIF-1 α также может активировать NF- κ B (ядерный фактор, определяющий развитие провоспалительного иммунного ответа), поскольку ингибиторы, способствующие убиквитин-зависимому разрушению HIF-1 α , контролируют также активность киназного комплекса IKK, отвечающего за регуляцию NF- κ B [12, 17]. По данным Peyssonnaud и соавт. [18], при системных инфекциях, таких как сепсис, высокий уровень HIF-1 α коррелирует с неблагоприятным прогнозом и активацией провоспалительных реакций, о чем свидетель-

ствует повышение в сыворотке крови содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α и снижение противовоспалительного — IL-10. Исходя из этого, можно предположить, что у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных выраженность воспалительного ответа может различаться, так же как и морфофункциональное состояние иммунной системы в норме и при системном воспалительном ответе.

Немногочисленными исследованиями показано, что, помимо индивидуальных различий устойчивости к гипоксии, существуют и половые различия. Установлено, что после остановки сердца одинаковой длительности у самок в постреанимационном периоде повышение уровня экспрессии нейротрофического фактора мозга — BDNF и гибель нейронов выражены меньше, чем у самцов, что косвенно отражает более высокую устойчивость нервных клеток ЦНС к гипоксии у самок [1]. Данные об индивидуальных особенностях устойчивости самок лабораторных животных и лиц женского пола к гипоксии и ее взаимосвязи с реакциями иммунной системы как в норме, так и при воспалительных заболеваниях в литературе отсутствуют. Однако известно, что по сравнению с мужчинами у женщин и самок лабораторных животных реже развиваются и легче протекают острые инфекционно-воспалительные заболевания [2, 5, 24], что может определяться более высокой устойчивостью самок к гипоксии.

Цель исследования — выявить особенности морфофункциональных изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном введением ЛПС, у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Материалы и методы

Исследования проведены на половозрелых самках ($n = 60$) крыс Вистар, массой тела 200–250 г, с устойчивым 4-дневным эстральным циклом. Фазу эстрального цикла определяли по влагалищным мазкам. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ

«НИИ морфологии человека» (протокол № 18а от 22.12.2016 г.). Крыс содержали в пластиковых клетках (60 × 18,5 × 38 см) социальными группами по 6 голов в каждой. Температура в помещении вивария поддерживалась в пределах 18-22 °С, влажность — 50-65%. Доступ к воде и пище был свободным.

С целью определения устойчивости к гипоксии крыс Вистар помещали в вентилируемую барокамеру «на высоту» 11 500 м [7]. Подъем «на высоту» осуществляли со скоростью 80 м/с. В помещении, где проводилось тестирование, поддерживалась температура 20-22 °С. Устойчивость к гипоксии определяли по времени жизни «на высоте», соответствующему временному интервалу от момента подъема до принятия животным бокового положения. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время жизни которых «на высоте» составляло более 180 с (n = 16), к низкоустойчивым — менее 20 с (n = 20). Среднеустойчивых к гипоксии крыс (n = 24) в экспериментах не использовали. С целью исключения влияния физиологических колебаний женских

половых гормонов в течение эстрального цикла тестирование самок в барокамере проводили в две фазы эстрального цикла — диэструсе и проэструсе (рис. 1).

Через месяц после определения устойчивости к гипоксии самкам в фазу диэструса внутривентриально вводили липополисахарид *E. coli* O26:B6 (Sigma, США) в дозе 1,5 мг/кг, вызывающей развитие воспалительного процесса и дистрофических изменений в органах-мишенях — печени и легких [8]. Выбор фазы эстрального цикла определялся тем, что, по нашим данным, по сравнению с другими фазами эстрального цикла введение ЛПС в фазу диэструса приводит к более выраженным воспалительным изменениям в органах-мишенях — печени и легких [6]. Животным контрольной группы внутривентриально вводили физиологический раствор. Для оценки структурных изменений тимуса и субпопуляционного состава лимфоцитов при системном воспалительном ответе животных выводили из эксперимента через сутки после введения ЛПС путем внутримышечного введения золетила в дозе 15 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция).

Для морфологического исследования проводили забор фрагментов тимуса, печени и легких, фиксировали их в жидкости Буэна (легкие — в жидкости Карнуа), изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. Получали цифровые изображения гистологических срезов тимуса и печени, проводили их компьютерный морфометрический анализ в программном пакете для обработки биомедицинских изображений ImageJ (NIH) 1.51h в варианте Fiji. На препаратах тимуса оценивали объемную долю коркового и мозгового вещества методом точечного счета при ув. 100. В печени определяли площадь некрозов при ув. 200. В легких подсчитывали число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках на стандартное поле зрения (25 000 мкм²) при ув. 400.

Методом иммуноферментного анализа определяли содержание в сыворотке крови стероидных гормонов — кортикостерона (Cloud-Clone Corp., США), тестостерона (Cusabio, КНР), а также противовоспалительного цитокина — TGF-β (eBioscience, США).

Проводили цитофлуориметрическую оценку относительного и абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) с использованием следующих антител (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 нату-

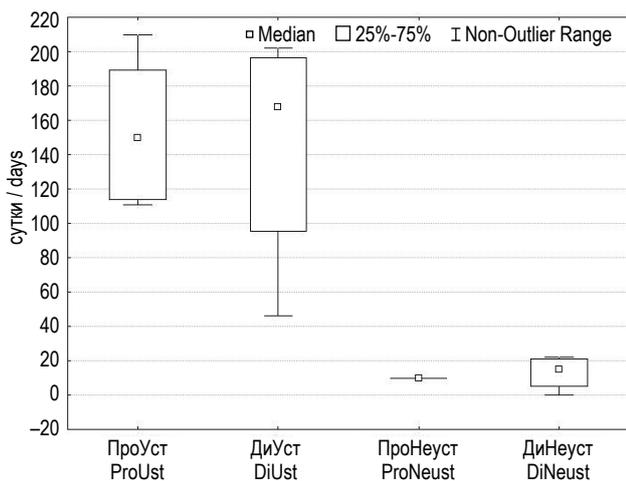


Рисунок 1. Время жизни в барокамере «на высоте» 11 500 м самок крыс Вистар в фазу проэструса (Про) и диэструса (Ди)

Примечание. ПроУст – устойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу проэструса; ДиУст – устойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу диэструса; ПроНеуст – неустойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу проэструса; ДиНеуст – неустойчивые к гипоксии, оценка времени жизни проводилась в фазу диэструса.

Figure 1. Life time in a pressure chamber “at an altitude” of 11 500 m of female Wistar rats in the phase of proestrus (Pro) and dioestrus (Di)

Note. ProUst, resistant to hypoxia, life time evaluation was carried out in the phase of proestrus; DiUst, resistant to hypoxia, life time evaluation was carried out in the dioestrus phase; ProNeust, unstable to hypoxia, the evaluation of the lifetime was carried out in the phase of proestrus; DiNeust, unstable to hypoxia, an estimate of the lifetime was carried out in the dioestrus phase.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИКОСТЕРОНА, ТЕСТОСТЕРОНА И TGF-β В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ДО И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛПС

TABLE 1. CONCENTRATION OF CORTICOSTERONE, TESTOSTERONE AND TGF-β IN THE SERUM OF FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA BEFORE AND AFTER LPS INJECTION

Показатели Indicators	Высокоустойчивые High-resistant		Низкоустойчивые Low-resistant		P
	Контрольная ¹ Control group ¹	ЛПС ² LPS ²	Контрольная ³ Control group ³	ЛПС ⁴ LPS ⁴	
Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml	70,7 (64,8-73,0)	86,9 (75,6-105,4)	68,6 (60,8-74,5)	100,3 (93,9-129,7)	0,03 ¹⁻² 0,009 ³⁻⁴
Тестостерон, нг/мл Testosterone, ng/ml	0,89 (0,6-1,0)	1,28 (1,2-1,3)	0,88 (0,6-1,1)	1,6 (1,2-2,6)	0,049 ³⁻⁴
TGF-β, нг/мл TGF-β, ng/ml	29,9 (27,6-43,0)	59,9 (26,4-77,6)	75,0 (74,7-85,5)	68,2 (25,7-73,3)	0,03 ¹⁻³

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ЧИСЛО АПОПТОТИЧЕСКИ ГИБНУЩИХ ТИМОЦИТОВ У САМОК КРЫС ВИСТАР С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ ДО И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛПС

TABLE 2. CONTENT OF MAIN SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND THE RELATIVE NUMBER OF APOPTOTICALLY DYING THYMOCYTES IN FEMALE WISTAR RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA BEFORE AND AFTER LPS INJECTION

Абс. число, млн/мл Abs. number, 10 ⁶ /ml	Высокоустойчивые High-resistant		Низкоустойчивые Low-resistant		P
	Контрольная ¹ Control group ¹	ЛПС ² LPS ²	Контрольная ¹ Control group ¹	ЛПС ² LPS ²	
CD3 ⁺ T-ЛФ CD3 ⁺ T cells	4,3 (3,4-6,1)	2,6 (1,4-3,2)	6,3 (3,8-7,4)	4,7 (4,3-7,1)	0,03 ¹⁻² 0,03 ²⁻⁴
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Tх-ЛФ CD3 ⁺ CD4 ⁺ Th cells	1,8 (1,6-2,5)	1,5 (0,8-1,6)	1,8 (1,7-2,8)	2,6 (2,4-2,6)	0,04 ²⁻⁴
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Tц-ЛФ CD3 ⁺ CD8 ⁺ Tc cells	2,1 (1,5-2,5)	1,0 (0,5-1,5)	3,5 (2,1-5,6)	2,0 (1,8-2,9)	0,03 ¹⁻²
CD314 ⁺ NK	0,31 (0,25-0,31)	1,8 (0,9-2,5)	0,89 (0,85-0,94)	2,7 (2,03-3,97)	0,03 ¹⁻² 0,009 ³⁻⁴ 0,01 ¹⁻³
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg-ЛФ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg	0,006 (0,005-0,01)	0,003 (0,002-0,004)	0,006 (0,002-0,008)	0,01 (0,009-0,03)	0,03 ¹⁻² 0,03 ³⁻⁴ 0,01 ²⁻⁴
Апоптоз тимоцитов, % Apoptosis of thymocytes, %	1,3 (1,1-1,3)	2,9 (2,5-3,5)	1,4 (0,4-1,4)	6,0 (4,8-6,5)	0,02 ¹⁻² 0,01 ³⁻⁴ 0,01 ²⁻⁴

Примечание. Т-ЛФ – Т-лимфоциты; Тх-ЛФ – Т-лимфоциты хелперы; Тц-ЛФ – цитотоксические Т-лимфоциты; NK – натуральные киллеры; Treg-ЛФ – регуляторные Т-лимфоциты.

Note. T cells, T lymphocytes; Th cells, T helpers; Tc cells, cytotoxic T lymphocytes; NK, natural killers; Treg, regulatory T lymphocytes.

ральных киллеров – NK); anti-Rat CD25 (маркер активированных Т-клеток); anti-Mouse/Rat FoxP3 (маркер регуляторных Т-клеток). Лизис эритроцитов в образцах цельной крови с ЭДТА проводили с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution (Beckman Coulter).

Оценивали число апоптотически гибнущих клеток тимуса (Annexin⁺PI) с помощью набора Annexin V FITC Kit (Beckman Coulter, США) на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0.

Характер распределения показателей определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для установления достоверности различий между показателями, в зависимости от характера распределения полученных данных, использовали критерии множественного сравнения Краскела–Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При тестировании самок крыс Вистар в вентилируемой барокамере популяция животных разделилась на высоко- (время жизни – 185,5 с (180-220)) и низкоустойчивых (время жизни – 20 с (10-20)); $p = 0,006$ к гипоксии. По сравнению с высокоустойчивыми низкоустойчивые к гипоксии самки характеризовались более высоким содержанием противовоспалительного цитокина TGF- β в сыворотке, абсолютным числом NK-клеток в периферической крови и низкой объемной долей коркового вещества тимуса (табл. 1, 2; рис. 2).

Через сутки после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии самок выраженность воспалительной реакции в легких и патологических изменений в печени была выше: в легких обнаруживалась более выраженная инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами

(рис. 3), а площадь некрозов в печени была статистически значимо выше (рис. 4).

Через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок увеличилось содержание противовоспалительных гормонов – кортикостерона и тестостерона, тогда как концентрация TGF- β не изменилась (табл. 1).

В тимусе высоко- и низкоустойчивых к гипоксии самок с системным воспалительным ответом наблюдалась умеренно выраженная инволюция с сужением коркового вещества и картиной «звездного неба», представленной гибнущими тимоцитами, фрагментами погибших клеток и фагоцитирующих их макрофагами. При морфометрическом исследовании было показано, что у высокоустойчивых к гипоксии самок введение ЛПС приводило к статистически значимому снижению показателя объемной доли коркового вещества тимуса, тогда как у низкоустойчивых самок этот показатель не изменялся (рис. 2). Однако по данным проточной цитофлуориметрии через сутки после введения ЛПС содержание апоптотически гибнущих Annexin⁺ клеток, выделенных из тимуса, было выше у самок с низкой устойчивостью к гипоксии (табл. 2).

В периферической крови у высокоустойчивых к гипоксии самок введение ЛПС приводило к снижению абсолютного количества

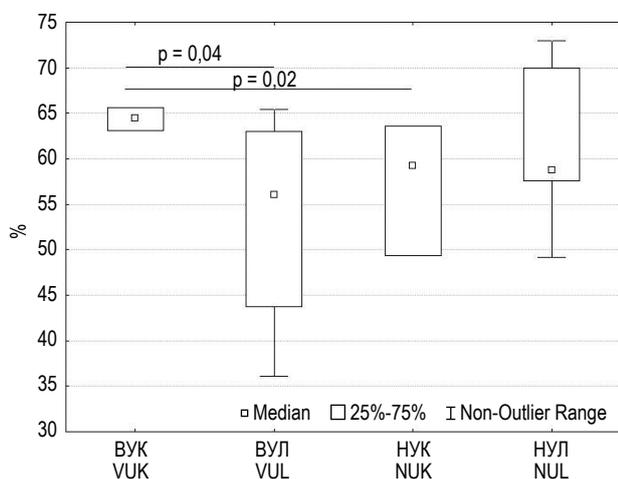


Рисунок 2. Объемная доля коркового вещества тимуса самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии контрольной группы и через сутки после введения ЛПС
Примечание. ВУК – высокоустойчивые, контрольная группа; ВУЛ – высокоустойчивые, ЛПС; НУК – низкоустойчивые, контрольная группа; НУЛ – низкоустойчивые, ЛПС.

Figure 2. Volume fraction of the thymic cortex of female Wistar rats with different resistance to hypoxia of the control group and in a day after the LPS injection

Note. VUK, high-resistant, control group; VUL, high-resistant, LPS; NUK, low-resistant, control group; NUL, low-resistant, LPS.

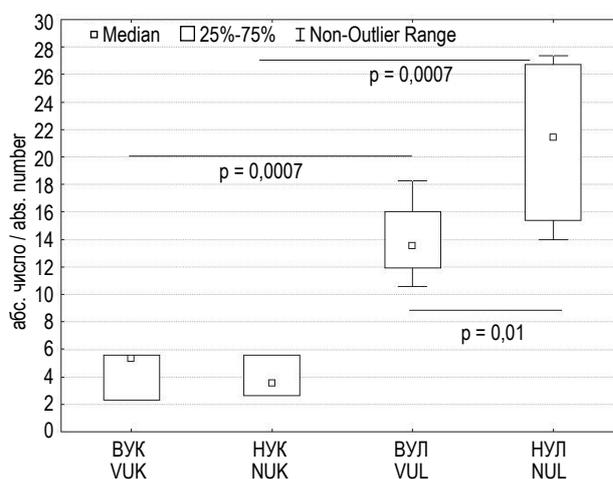


Рисунок 3. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высоко- (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии самок крыс Вистар контрольной группы (ВУК, НУК) и на 1-е сут. после введения ЛПС (ВУЛ, НУЛ)

Figure 3. The number of neutrophils in the interalveolar septa of the lungs in high (VU) and low-resistant (NU) to hypoxia female Wistar rats of the control group (VUK, NUK) and on the 1st day after the LPS injection (VLD, NUL)

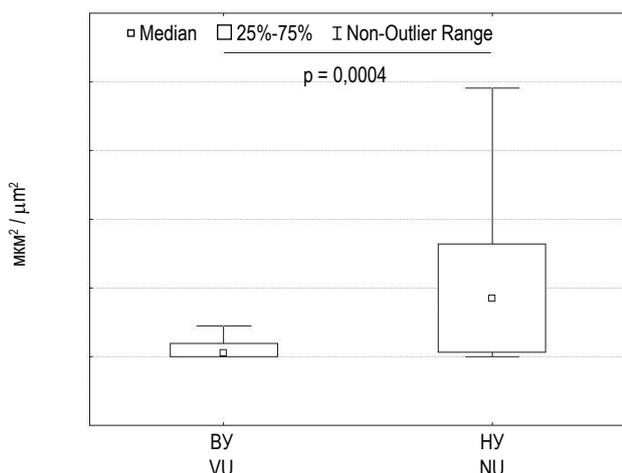


Рисунок 4. Площадь некрозов (μm^2) в печени у высоко- (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии самок крыс Вистар на 1-е сут. после введения ЛПС

Figure 4. The area of necrosis (μm^2) in the liver in high (VU) and low-resistant (NU) to the hypoxia female Wistar rats on the 1st day after the LPS injection

T-лимфоцитов, в том числе T-хелперов и регуляторных, на фоне повышения NK-клеток. Напротив, у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа характеризовалось повышением в крови содержания T-хелперов и регуляторных T-лимфоцитов, что также сопровождалось увеличением числа NK-клеток (табл. 2).

Таким образом, индуцированный ЛПС системный воспалительный ответ у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии самок характеризуется иммунными изменениями разной выраженности и направленности. Как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается умеренно выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, апоптозом тимоцитов, увеличением абсолютного числа клеток врожденного иммунитета – NK, повышением содержания иммуносупрессорных стероидных гормонов – тестостерона и кортикостерона. Однако у высокоустойчивых самок акцидентальная инволюция тимуса менее выражена, о чем свидетельствует показатель апоптотической гибели тимоцитов. В периферической крови у них наблюдается снижение количества T-хелперов и регуляторных T-лимфоцитов, что сочетается с менее выраженными воспалительными и патологическими изменениями в органах-мишенях, тогда как у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие более выраженного системного воспаления сопровождается увеличением числа регуляторных T-лимфоцитов и T-хелперов.

Обсуждение

Таким образом, в физиологических условиях по сравнению с высокоустойчивыми низкоустойчивые к гипоксии самки крыс Вистар характеризуются более высоким содержанием TGF- β в сыворотке крови, числом NK-клеток и узким корковым веществом тимуса.

TGF- β – семейство белков, которые регулируют различные биологические процессы, такие как рост и развитие, тканевой гомеостаз и реакции иммунной системы, в том числе пролиферацию, дифференцировку, функционирование всех субпопуляций лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток, таким образом, модулируя врожденный, антиген-независимый, и адаптивный, антиген-зависимый иммунитет [16, 26]. Известно, что в условиях гипоксии TGF- β индуцирует связывание HIF-1 α с промотером гена *FoxP3* CD4⁺ T-лимфоцитов, в результате чего активируется дифференцировка T-регуляторных клеток [10]. По нашим данным, в крови самок с разной устойчивостью к гипоксии различий в содержании T-лимфоцитов, в том числе T-регуляторных клеток, выявлено не было, однако высокое содержание TGF- β в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии самок, по-видимому, связано с большей функциональной активностью T-регуляторных клеток, чем у высокоустойчивых к гипоксии крыс.

NK-клетки модулируют врожденный иммунитет путем активации апоптоза в инфицированных или трансформированных клетках, а их функционирование и дифференцировка положительно коррелируют с уровнем экспрессии HIF-1 α [15]. Другими исследованиями выявлено негативное влияние гипоксии на количество и цитолитическую активность NK-клеток [20]. Данные о различиях в содержании NK-клеток в крови у самок крыс с разной устойчивостью к гипоксии в литературе не представлены.

По нашим данным, корковое вещество тимуса, которое представлено дубль-позитивными T-лимфоцитами, уже у самок с низкой устойчивостью к гипоксии, чем с высокой. В литературе показано, что у детей с врожденным пороком сердца, у которых насыщение кислородом было ниже 85% (условия гипоксии), в тимусе преобладает мозговое вещество, тогда как у детей с насыщением кислорода более 95%, напротив, корковое вещество было шире [9]. Выявленные морфофункциональные особенности тимуса у животных с разной устойчивостью к гипоксии, очевидно, зависят от многих факторов, определяющих процессы пролиферации, дифференцировки и миграции тимоцитов.

Полученные данные свидетельствуют о непосредственной взаимосвязи устойчивости

к гипоксии и особенностей иммунных реакций в норме, что при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц с разной устойчивостью к гипоксии может определять течение и исход заболевания. Поэтому мы исследовали иммунные реакции при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Нами показано, что как у высоко-, так и у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается умеренно выраженной акцидентальной инволюцией тимуса, апоптозом тимоцитов, увеличением абсолютного числа клеток врожденного иммунитета – НК, повышением содержания иммуносупрессорных стероидных гормонов – тестостерона и кортикостерона.

Развитие более тяжелого системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии самок характеризуется более выраженным апоптозом тимоцитов. По данным А.В. Сеуган и соавт. [9], в условиях гипоксии в корковом веществе тимуса увеличивается число V α 12-положительных клеток, что свидетельствует об индуцированной гипоксией клеточной гибели. В нашей работе показано, что в ответ на введение ЛПС в тимусе у низкоустойчивых крыс не происходит изменения объемной доли коркового вещества, однако выраженность апоптотической гибели тимоцитов выше, чем у самок с высокой устойчивостью к гипоксии. Вероятно, это связано с компенсаторной активацией пролиферации тимоцитов у низкоустойчивых к гипоксии самок, тогда как у высокоустойчивых крыс сужение коркового вещества тимуса может быть опосредовано активацией процессов дифференцировки и миграции Т-лимфоцитов.

На 1-е сутки развития системного воспалительного ответа по сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии самками в периферической крови у высокоустойчивых животных наблюдается снижение количества Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты из крови мигрируют в очаг воспаления, где, взаимодействуя с эпителиальными, дендритными клетками, регу-

лируют развитие воспалительных реакций. Функционирование Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов супрессируется Т-регуляторными лимфоцитами, при недостаточности которых воспалительные реакции могут быть чрезмерно выраженными [19]. Тогда как у низкоустойчивых к гипоксии самок развитие системного воспалительного ответа сопровождается увеличением в периферической крови Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов. По данным литературы, у больных сепсисом наблюдается увеличение регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови, что, по мнению авторов, является неблагоприятным прогностическим критерием [22, 23, 25]. Показано, что HIF-1 α , уровень экспрессии которого увеличивается у низкоустойчивых к гипоксии самок в ранние сроки после введения ЛПС, активирует дифференцировку регуляторных Т-клеток [15].

Таким образом, иммунные реакции при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у самок крыс Вистар зависят от устойчивости их к гипоксии. Нами впервые показано, что развитие более тяжелого воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии самок сопровождается выраженной апоптотической гибелью тимоцитов и увеличением числа Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови, что является неблагоприятным прогностическим фактором. Тогда как у высокоустойчивых к гипоксии самок акцидентальная инволюция тимуса характеризуется менее выраженной гибелью лимфоцитов и сужением коркового вещества за счет активации миграции Т-лимфоцитов в очаг воспаления, о чем свидетельствует снижение абсолютного количества Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови. Требуется дальнейшее исследование механизмов развития иммунного ответа у высоко- и низкоустойчивых самок при системном воспалительном ответе, однако полученные данные являются базовыми для разработки подходов к персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у лиц женского пола.

Список литературы / References

1. Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Гречко А.В. Гендерные особенности постреанимационных изменений экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) // Общая реаниматология, 2017. Т. 13, № 5. С. 44-57. [Avrushchenko M.S., Ostrova I.V., Grechko A.V. Gender peculiarities of postresuscitation in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2017, Vol. 13, no. 5, pp. 44-57. (In Russ.)]
2. Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия морфологических изменений и иммунных нарушений при экспериментальном остром язвенном колите // Клиническая и экспериментальная морфология, 2016. Т. 17, № 1. С. 37-43. [Gao Yu., Postovalova E.A., Dobrynina M.T., Makarova O.V. Sex-related differences in morphological changes and immune disorders during experimental acute

ulcerative colitis. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2016, Vol. 17, no. 1, pp. 37-43. (In Russ.)]

3. Джалилова Д.Ш., Диатроптов М.Е., Цветков И.С., Макарова О.В., Кузнецов С.Л. Экспрессия генов *hif-1a*, *nf-kb* и *vegf* в печени и содержание HIF-1 α , эритропоэтина, VEGF, TGF- β , 8-изопростана и кортико-стерона в сыворотке крови высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2018. Т. 165, № 6. С. 742-747. [Dzhalilova D.Sh., Diatroptov M.E., Tsvetkov I.S., Makarova O.V., Kuznetsov S.L. Expression of *hif-1a*, *nf-kb* and *vegf* genes in the liver and the content of HIF-1 α , erythropoietin, VEGF, TGF- β , 8-isoprostane and corticosterone in the blood serum in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2018, Vol. 165, no. 6, pp. 742-747. (In Russ.)]

4. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012. Т. 154, № 12. С. 681-686. [Kirova Yu.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1 α levels in rat neocortex in different hypoxia regimens. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 154, no. 12, pp. 681-686. (In Russ.)]

5. Косырева А.М., Симонова Е.Ю., Макарова О.В. Половые различия реакции иммунной системы и легких при экспериментальном остром эндотоксикозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012. Т. 153, № 3. С. 318-321. [Kosyreva A.M., Simonova E.Yu., Makarova O.V. Gender differences in pulmonary and immune response in acute experimental endotoxemia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 153, no. 3, pp. 318-321. (In Russ.)]

6. Косырева А.М., Диатроптов М.Е. Морфологические проявления системного воспалительного ответа в печени и легких крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла // Иммунология, 2013. Т. 34, № 2. С. 111-114. [Kosyreva A.M., Diatroptov M.E. Morphological development of systemic inflammatory response syndrome in the liver and lung of Wistar rats in the different stages of estrous cycle. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 111-114. (In Russ.)]

7. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. (2011) Влияние гипоксического прекоондиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2011. Т. 151, № 3. С. 263-268. [Lukyanova L.D., Kirova Yu.I. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2011, Vol. 151, no. 3, pp. 263-268. (In Russ.)]

8. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. Волгоград, 2008. 308 с. [Pisarev V.B., Bogomolova N.V. Bacterial endotoxemia: pathologist's view. Volgograd, 2008. 308 p.]

9. Ceyran A.B., Şenol S., Güzelmeriç F., Tunçer E., Tongut A., Özbek B., Şavluk O., Aydın A., Ceyran H. Effects of hypoxia and its relationship with apoptosis, stem cells, and angiogenesis on the thymus of children with congenital heart defects: a morphological and immunohistochemical study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 7, pp. 8038-8047.

10. Clambey E.T., McNamee E.N., Westrich J.A., Glover L.E., Campbell E.L., Jedlicka P., de Zoeten E.F., Cambier J.C., Stenmark K.R., Colgan S.P., Eltzschig H.K. Hypoxia-inducible factor-1-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, pp. E2784-E2793.

11. Cinel I., Opal S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 37, no. 1, pp. 291-304.

12. Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A., Fitzgerald K.T., Seeballuck F., Godson C., Nielsen J.E., Moynagh P., Pouyssegur J., Taylor C.T. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 48, pp. 18154-18159.

13. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia. *High Alt. Med. Biol.*, 2013, Vol. 14, no. 1, pp. 65-77.

14. Kiers H.D., Scheffer G.J., van der Hoeven J.G., Eltzschig H.K., Pickkers P., Kox M. Immunologic consequences of hypoxia during critical illness. *Anesthesiology*, 2016, Vol. 125, no. 1, pp. 237-249.

15. Krzywinska E., Stockmann C. Hypoxia, Metabolism and immune cell function. *Biomedicine*, 2018, Vol. 6, no. 2, p. 56.

16. Kubiczkova L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.*, 2012, Vol. 10, p. 183.

17. Oliver K.M., Taylor C.T., Cummins E.P. Hypoxia. Regulation of NF κ B signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 1, p. 215.

18. Peyssonnaud C., Cejudo-Martin P., Doedens A., Zinkernagel A.S., Johnson R.S., Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 12, pp. 7516-7519.

19. Rubtsov Y.P., Rasmussen J.P., Chi E.Y., Fontenot J., Castelli L., Ye X., Treuting P., Siewe L., Roers A., Henderson W.R., Muller W., Rudensky A.Y. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 2008, Vol. 28, no. 4, pp. 546-558.
20. Sceneay J., Chow M.T., Chen A., Halse H.M., Wong C.S.F., Andrews D.M., Sloan E.K., Parker B.S., Bowtell D.D., Smyth M.J., Möller A. Primary tumor hypoxia recruits CD11b⁺/Ly6C^{med}/Ly6G⁺ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 16, pp. 3906-3911.
21. Shalova I.N., Lim J.Y., Chittechath M., Zinkernagel A.S., Beasley F., Hernández-Jiménez E., Toledano V., Cubillos-Zapata C., Rapisarda A., Chen J., Duan K., Yang H., Poidinger M., Melillo G., Nizet V., Arnalich F., López-Collazo E., Biswas S.K. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 484-498.
22. Tatura R., Zeschnigk M., Adamzik M., Probst-Kepper M., Buer J., Kehrmann J. Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, e49962. doi: 10.1371/journal.pone.0049962.
23. Tatura R., Zeschnigk M., Hansen W., Steinmann J., Vidigal P.G., Hutzler M., Pastille E., Westendorf A.M., Buer J., Kehrmann J. Relevance of Foxp3⁺ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology*, 2015, Vol. 146, no. 1, pp. 144-156.
24. Vázquez-Martínez E.R., García-Gómez E., Camacho-Arroyo I., González-Pedrajo B. Sexual dimorphism in bacterial infections. *Biol. Sex Differ.*, 2018, Vol. 9, no. 1, p. 27.
25. Venet F., Chung C.S., Kherouf H., Geeraert A., Malcus C., Poitevin F., Bohe J., Lepape A., Avala A., Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.*, 2009, Vol. 35, no. 4, pp. 678-686.
26. Yang L., Pang Y., Moses H.L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 2010, Vol. 31, pp. 220-227.

Авторы:

Косырева А.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Джалилова Д.Ш. — младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Макарова О.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Сладкопевцев А.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории патологии клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Authors:

Kosyreva A.M., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Dzhalilova D.Sh., Junior Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Makarova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Sladkopevtsev A.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.09.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 19.09.2018

Received 14.09.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 19.09.2018