УДК 576.7;616-002.1 **DOI: 10.21626/vestnik/2020-2/09**

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС ВИСТАР РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

© *Косырева А.М.*[1,2], *Макарова О.В.*[1]

[1] **Научно-исследовательский институт морфологии человека (НИИМЧ)**
Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3
[2] **Российский университет дружбы народов (РУДН)**
Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Цель работы – выявить половые различия морфофункциональных изменений лимфоидных органов – тимуса и селезенки, продукции цитокинов и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у крыс Вистар трех возрастных групп при эндотоксинемии.

Материалы и методы. В работе использовались самцы и самки крыс Вистар трех возрастных групп: новорожденные, препубертатные и половозрелые. Через сутки после введения 15 мг/кг липополисахарида (ЛПС) *E. coli* O26:B6 оценивали объемную долю функциональных зон тимуса и селезенки, число AnnexinV+ апоптотически гибнущих клеток в тимусе, относительное и абсолютное количество субпопуляций лимфоцитов в периферической крови (CD3+CD4+, CD3+CD8a+, CD4+CD25+Foxp3+, CD3-CD45R+) и уровень *ex vivo* продукции цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α и ИФН-γ).

Результаты. Половые различия реакции иммунной системы при введении ЛПС в разных возрастных периодах выражены по-разному: в период новорожденности у самок наблюдается иммуносупрессия (снижение *ex vivo* продукции ИЛ-2, ФНО-α и ИФН-γ), а у самцов – активация провоспалительных реакций (повышение *ex vivo* продукции ИЛ-2 и ФНО-α). В препубертатном возрасте ЛПС-индуцированные иммунологические нарушения более выражены по сравнению с другими возрастными периодами, а половые различия – минимальны и касаются только различий количества Т-регуляторных и В-лимфоцитов. В половозрелом периоде иммуносупрессия, индуцированная введением ЛПС, наиболее выражена у самцов – у них наблюдается снижение продукции всех исследуемых цитокинов и уменьшение числа цитотоксических, регуляторных Т-лимфоцитов и В-клеток.

Заключение. Таким образом, в каждом из изученных возрастных периодов – новорожденности, препубертатном и половозрелом периодах – половые различия реакций иммунной системы выражены в разной мере, и, по-видимому, они определяются содержанием половых стероидных гормонов, концентрация которых изменяется с возрастом.

Ключевые слова: возрастные различия; половые различия; тимус; селезенка; ЛПС; цитокины; Т- и В-лимфоциты.

Косырева Анна Михайловна – д-р биол. наук, руководитель научно-организационного отдела, НИИМЧ, г. Москва; доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Медицинского института, РУДН, г. Москва. ORCID iD: 0000-0002-6182-1799. E-mail: kosyreva.a@list.ru (автор, ответственный за переписку)

Макарова Ольга Васильевна – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией иммуноморфологии воспаления, НИИМЧ, г. Москва. ORCID iD: 0000-0001-8581-107X. E-mail: makarov.olga2013@yandex.ru

Основными регуляторными системами организма, которые могут определять выраженность половых различий устойчивости к заболеваниям у особей мужского и женского пола, являются эндокринная и иммунная системы [2], так как известно, что половые гормоны модулируют развитие иммунного ответа [7]. На протяжении как антенатального, так и раннего постнатального периода развития организм особей мужского и женского пола подвергается резким колебаниям содержания тестостерона и эстрадиола, изменениям функционирования оси гипоталамус-гипофиз-гонады, что может определять функциональную активность иммунной системы [3]. Антиоксидантное и противовоспалительное действие эстрогенов, высокая концентрация которых характерна для особей женского пола, очевидно, является одним из основных механизмов половых различий восприимчивости к заболеваниям и продолжительности жизни. Показано, что с возрастом, и особенно, при старении, наблюдается активация окислительного повреждения клеток и длительное повышение продукции провоспалительных цитокинов [5].

Для новорожденных детей характерно состояние физиологического иммунодефицита [8], что является причиной высокой восприимчивости новорожденных детей к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний [9]. В отличие от антенатального периода и периода новорожденности данные литературы о возрастных изменениях морфофункционального состояния иммунной системы в детский возрастной период до момента полового созревания немногочисленны, и в основном они каса-

ются продукции цитокинов [10]. Показано, что уровни экспрессии толл-подобных рецепторов (TLRs) и провоспалительных цитокинов у здоровых детей первых 5 лет жизни сопоставимы с таковыми у взрослых. Начиная с пятилетнего возраста TLR-зависимая продукция провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-α и ИЛ-1β, постоянно нарастает, что сопровождается снижением синтеза ИЛ-10, ИЛ-6 и ИЛ-23 [10].

Большинство исследований, посвященных анализу половых различий морфофункционального состояния иммунной системы у человека, касаются мужчин и женщин репродуктивного возраста, а у половозрелых животных – половозрелого. Данные о половых гистофизиологических различиях иммунной системы в другие периоды постнатального развития немногочисленны. Известно, что половые гормоны, концентрация которых изменяется с возрастом, регулируют процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и активации клеток иммунной системы [1]. Половые и возрастные различия функционирования иммунной системы, особенности ее созревания у особей разного пола, а также иммуномодулирующее действие половых гормонов, колебания концентраций которых характерно для разных возрастных периодов и пола, могут определять половые различия частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных заболеваний в разные периоды постнатального онтогенеза.

В связи с этим целью работы было выявить половые различия морфофункциональных изменений лимфоидных органов – тимуса и селезенки, продукции цитокинов и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у крыс Вистар трех возрастных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на самцах (n=60) и самках (n=60) крыс Вистар трех возрастных групп. Группу новорожденных крыс составили животные возрастом 2 дня и массой тела 6-10 г (20 самок и 20 самцов), группу препубертатных – крысы возрастом 10 дней и массой тела 25-30 г (25 самок и 25 самцов), группу половозрелых – возрастом 3 месяца и массой тела 250-300 г (15 самок и 15 самцов). При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Страсбург, 1986 г.). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека». Для разведения животных использовали 25 половозрелых животных (15 самок и 10 самцов). Продолжительность беременности у самок составляла 21–23 сут. Потомство одной самки было представлено 6–8 особями.

Эндотоксинемию моделировали путем внутрибрюшинного введения ЛПС *E. coli* O26:B6 («Sigma», США) в дозе 15 мг/мл, которая вызывает развитие дистрофических изменений и некрозов в печени и интраальвеолярного отека с инфильтрацией межальвеолярных перегородок нейтрофилами в легких [1]. Крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор.

Через 24 ч после введения ЛПС крыс выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Фрагменты тимуса и селезенки фиксировали в жидкости Буэна, изготовляли гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. В лимфоидных органах оценивали объемную доли функциональных зон методом точечного счета, ширину субкапсулярной зоны тимуса определяли в мкм при увеличении 400.

Количество апоптотически гибнущих клеток (AnnexinV+PI-) в тимусе оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter») с использованием Annexin V FITC Kit (Beckman Coulter).

Кровь забирали из шейных вен, центрифугировали при 200g в течение 20 мин, отбирали сыворотку, замораживали ее при температуре -70°С. В сыворотке крови методом твердофазного ИФА оценивали содержание трансформирующего ростового фактора-β (TGF-β) (eBioscience, Австрия).

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 конканавалина А (5 мкг/мл) в 24-луночных культуральных планшетах при 37°С и 5% CO_2. Среда для культивирования состояла из RPMI-1640 (ПанЭко) с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. С помощью метода твердофазного ИФА (тест-системы «eBioscience», Австрия) в ней определяли концентрацию интерлейкинов – ИЛ-2, ИЛ-4, фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) и интерферона-γ (ИФН-γ).

Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови определяли 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 CD25 (маркер активиро-

ванных 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»).

Статистический анализ полученных данных проводили в программе «Statistica 8.0». Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха Me (LQ(25%); UQ(75%)). Для установления достоверности различий между показателями, в зависимости от характера распределения полученных данных, использовали критерии множественного сравнения Крускала-Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические изменения в тимусе у крыс Вистар разного возраста и пола при экспериментальной эндотоксинемии. При введении ЛПС в тимусе у новорожденных животных была выявлена слабовыраженная акцидентальная инволюция, которая не приводила к изменению объемной доли коркового вещества у самцов, тогда как у самок выявлялось снижение этого показателя (табл. 1). При анализе числа апоптотически гибнущих клеток в тимусе статистически значимых различий между контрольными и опытными группами новорожденных самцов и самок выявлено не было – число AnnexinV+ тимоцитов не изменялось при введении ЛПС у животных обоего пола (табл. 1).

Введение ЛПС самцам и самкам в препубертатном периоде привело к развитию акцидентальной инволюции более поздних стадий (II-III): наблюдалась яркая картина «звездного неба», сужение коркового вещества тимуса, увеличение числа апоптотически гибнущих клеток у животных обоего пола (табл. 1). На первые сутки после введения ЛПС были выявлены половые различия в группе препубертатных животных – у самок снижался показатель ширины субкапсулярной зоны, а у самцов – не изменялся (табл. 1).

В периоде половой зрелости акцидентальная инволюция тимуса была так же выражена, как и у препубертатных крыс обоего пола, что сочеталось с сужением коркового вещества тимуса и резким уменьшением ширины субкапсулярной зоны (табл. 1). Однако число апоптотически гибнущих клеток у половозрелых самок с эндотоксинемей не отличалось от соответствующих показателей контрольных групп, тогда как у самцов, напротив, наблюдалось его увеличение (табл. 1).

Половые различия морфологических изменений в селезенке у крыс Вистар разного возраста при экспериментальной эндотоксинемии. На первые сутки после введения ЛПС в селезенке у новорожденных крыс обоего пола выявлялась гиперплазия белой пульпы, представленной ПАЛМ-зоной. В препубертатном периоде и у половозрелых самок и самцов с эндотоксинемией изменений показателей объемной доли белой пульпы выявлено не было. Половых различий ЛПС-индуцированных морфологических изменений в селезенке у крыс Вистар разного возраста не обнаружено.

Половые различия содержания TGF-β в сыворотке крови и уровня продукции цитокинов активированными КонА клетками селезенки у крыс Вистар разного возраста при экспериментальной эндотоксинемии. Через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови у половозрелых и препубертатных крыс Вистар обоего пола выявлено снижение содержания иммуносупрессорного цитокина – TGF-β. Тогда как у новорожденных самок значения этого показателя не изменялись (табл. 2).

Через сутки после введения ЛПС у новорожденных самок наблюдалась супрессия продукции клетками селезенки ИЛ-2 и ИФН-γ в 10 раз, ФНО-α в 2 раза, тогда как содержание ИЛ-4 в культуральной жидкости статистически значимо не изменялось. Тогда как у самцов этого возрастного периода, напротив, уровень продукции ИЛ-2 и ФНО-α возрастал, что может косвенно свидетельствовать об активации клеточного звена иммунного ответа (рис. 1).

В препубертатном периоде половые различия изменения продукции цитокинов в ответ на введение ЛПС отсутствовали – как у самцов, так и у самок определялось снижение уровня продукции ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО-α и ИФН-γ (рис. 1).

Введение ЛПС половозрелым самцам привело к выраженному снижению продукции ИЛ-2, ФНО-α, ИЛ-4 и ИФН-γ, тогда как у самок было выявлено уменьшение уровня продукции только ИЛ-4 и ФНО-α (рис. 1), что свидетельствует о более выраженной супрессии продукции цитокинов у самцов.

Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у крыс Вистар разного возраста при экспериментальной эндотоксинемии. При введении ЛПС у новорожденных крыс Вистар обоего пола число всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов в периферической крови не изменялось, за исключением регуляторных Т-лимфоцитов у самцов, количество которых возрастало (рис. 2).

Таблица 1

Table 1

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

Morphometric characteristics of the thymus in female and male Wistar rats of different age on the first day after the LPS injection in a high dose (15 mg/kg) [Me; 25-75%]

Группа наблюдения Group		Объемная доля коркового вещества тимуса, % Volume fraction of the thymic cortex, %		Ширина субкапсулярной зоны, мкм Width of subcortical zone of the thymus, μm		Апоптоз клеток тимуса, % Apoptotic dying of the thymic cells, %		Статистическая значимость половых различий у особей одной возрастной группы (p) Statistical significance of sex differences in rats of the same age (p)
		Самки ($n^{новорожд}$=10; $n^{препуб}$=10; $n^{половоз}$=10) Female ($n^{newborn}$=10; N^{prepub}=10; N^{adult}=10)	Самцы ($n^{новорожд}$=10; $n^{препуб}$=10; $n^{половоз}$=10) Male ($n^{newborn}$=10; N^{prepub}=10; N^{adult}=10)	Самки ($n^{новорожд}$=10; $n^{препуб}$=6; $n^{половоз}$=7) Female ($n^{newborn}$=10; n^{prepub}=6; n^{adult}=7)	Самцы ($n^{новорожд}$=10; $n^{препуб}$=6; $n^{половоз}$=7) Male ($n^{newborn}$=10; n^{prepub}=6; n^{adult}=7)	Самки ($n^{новорожд}$=6; $n^{препуб}$=8; $n^{половоз}$=7) Female ($n^{newborn}$=6; n^{prepub}=8; n^{adult}=7)	Самцы ($n^{новорожд}$=5; $n^{препуб}$=7; $n^{половоз}$=6) Male ($n^{newborn}$=5; n^{prepub}=7; n^{adult}=6)	
Новорожденные Newborn	Контрольная Control	74.39^{1*} [68.49-75.57]	62.75^{1} [55.67-69.04]	не выявл. not observed	не выявл. not observed	2.00^{11} [1.40-3.10]	2.15^{11} [1.50-2.60]	0.008^{1-1}
	ЛПС LPS	62.42^{2} [44.84-69.50]	58.64^{2} [57.24-63.08]	не выявл. not observed	не выявл. not observed	3.45^{12} [2.50-4.50]	3.45^{12} [1.95-8.70]	
Препубертатный период Prepubertal	Контрольная Control	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^{13-13} 0.008^{8-8}
	ЛПС LPS	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 Adult	Контрольная Control	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 LPS	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 у особей одного пола (p) Statistical significance of age differences in rats of the same sex (p)		0.01^{1-2} 0.006^{3-4} 0.003^{5-6} 0.02^{1-3} 0.0001^{1-5} 0.0003^{3-5} 0.05^{2-4} 0.0001^{2-6} 0.00009^{4-6}	0.003^{3-4} 0.002^{5-6} 0.01^{1-3} 0.04^{1-5} 0.001^{3-5} 0.02^{2-4} 0.03^{2-6} 0.01^{4-6}	0.014^{7-8} 0.0001^{9-10} 0.0008^{7-9}	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}	

Примечание (здесь и в таблице 2): * – надстрочными индексами рядом с медианными значениями исследуемых показателей отмечены номера соответствующих групп наблюдения; ** – надстрочными индексами рядом с p-уровнями статистической значимости отмечены номера соответствующих сравниваемых групп.

Note (here and in table 2): * – superscript indices next to the median values of the studied indicators are the numbers of the corresponding observation groups; ** – superscript indices next to the p-levels of statistical significance indicate the numbers of the corresponding compared groups.

Таблица 2

Table 2

Изменения содержания TGF-β в сыворотке крови у самок и самцов крыс Вистар разных возрастных периодов на первые сутки после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг) [Me; 25-75%]

Changes of TGF-β content in the blood serum of female and male Wistar rats of different age on the first day after the LPS injection in a high dose (15 mg/kg) [Me; 25-75%]

Группа наблюдений Group		Самки ($n^{новорожд}$=6; $n^{препуб}$=6; $n^{половоз}$=6) Females ($n^{newborn}$=6; n^{prepub}=6; n^{adult}=6)	Самцы ($n^{новорожд}$=5; $n^{препуб}$=6; $n^{половоз}$=6) Males ($n^{newborn}$=5; n^{prepub}=6; n^{adult}=6)	Статистическая значимость половых различий у особей одной возрастной группы (p) Statistical significance of sex differences in rats of the same age (p)
Новорожденные Newborn	Контрольная группа Control	18.86^{1*} [16.80-27.12]	18.63^{1*} [16.11-20.93]	
	ЛПС LPS	17.02^{2} [15.23-18.17]	14.48^{2} [15.22-18.17]	
Препубертатный период Prepubertal	Контрольная группа Control	57.29^{3} [45.01-63.49]	41.29^{3} [31.14-52.08]	
	ЛПС LPS	20.85^{4} [17.44-31.32]	17.99^{4} [13.77-26.57]	
Половозрелые Adult	Контрольная группа Control	50.8^{5} [43.0-64.0]	79.0^{5} [63.2-81.9]	0.04^{5-5}
	ЛПС LPS	20.2^{6} [19.3-29.4]	37.2^{6} [17.5-41.0]	
Статистическая значимость различий показателей в разных возрастных группах у особей одного пола (p) Statistical significance of age differences in rats of the same sex (p)		0.05^{1-2} 0.0006^{3-4} 0.0004^{5-6} 0.00006^{1-3} 0.00002^{1-5} 0.5^{3-5} 0.02^{2-4} 0.04^{2-6} 0.4^{4-6}	0.09^{1-2} 0.01^{3-4} 0.009^{5-6} 0.005^{1-3} 0.005^{1-5} 0.8^{3-5} 0.4^{2-4} 0.5^{2-6} 0.8^{4-6}	

По сравнению с контрольной группой у препубертатных самок крыс Вистар после введения ЛПС относительное и абсолютное число Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов, Т-цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов, снижалось. Помимо снижения количества Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов у самцов этого же возраста было обнаружено уменьшение числа В-клеток (рис. 2).

Через сутки после введения ЛПС в периферической крови у половозрелых самок и самцов крыс Вистар наблюдалось снижение относительного и абсолютного числа регуляторных Т-лимфоцитов. В отличие от самок у половозрелых самцов в ответ на введение ЛПС число Т-цитотоксических и В-лимфоцитов снижалось, а количество Т-хелперов, возрастало (рис. 2).

Таким образом, на первые сутки после введения ЛПС у новорожденных самцов и самок умеренная акцидентальная инволюция тимуса сочетается с гиперплазией белой пульпы селезенки. В отличие от самцов, у которых не обнаружено изменений морфометрических показателей функциональных зон тимуса, у самок наблюдается снижение объемной доли коркового вещества, размеры которого, как и его клеточность определяются балансом процессов пролиферации, миграции и гибели Т-лимфоцитов. По нашим данным, введение ЛПС приводит к сужению коркового вещества тимуса только у самок, что отражает более выраженную активацию иммунной системы по сравнению с самцами, в крови у которых обнаружено увеличение содержания Т-регуляторных лимфоцитов, оказывающих иммуносупрессорное действие.

Изменения уровня продукции цитокинов клетками селезенки при системном воспалении, индуцированном введением высокой дозы ЛПС, у новорожденных имеют половые различия: у самок выявлено снижение уровня продукции Тх1-цитокинов ИЛ-2 и ИФН-γ, а также провоспалительного ФНО-α клетками селезенки;

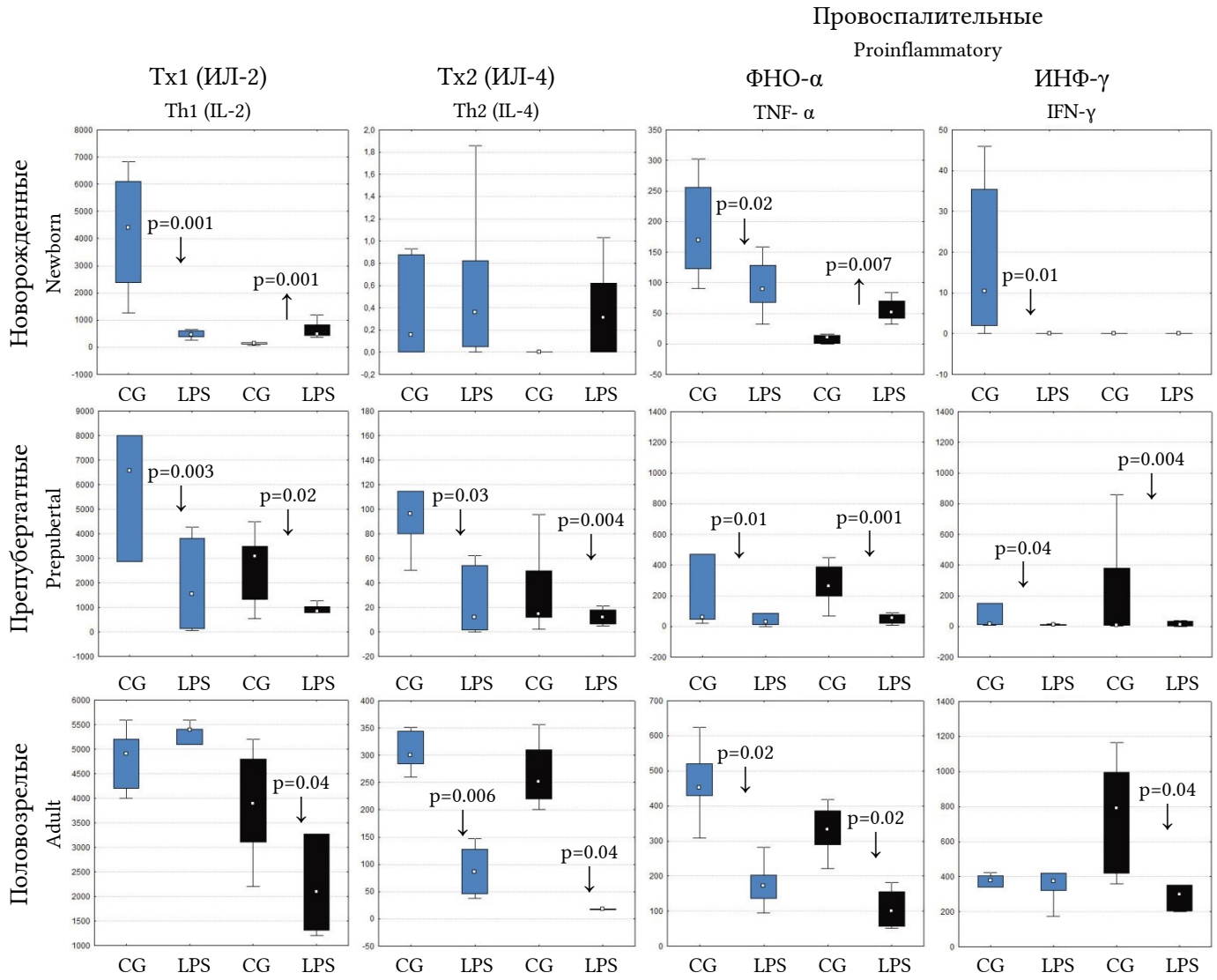

Рис. 1. Изменение *ex vivo* продукции цитокинов (пг/мл) клетками селезенки у самок (синие столбцы) и самцов (черные столбцы) крыс Вистар разных возрастных групп на первые сутки после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг). CG – контрольная группа, LPS – первые сутки после введения ЛПС. Стрелки указывают на статистически значимые изменения продукции цитокинов в результате введения ЛПС: ↓ – снижение, ↑ – повышение.

Fig. 1. *Ex vivo* changes in cytokine production (pg/ml) by spleen cells in female (blue columns) and male (black columns) Wistar rats of different age groups on the first day after administration of LPS in a high dose (15 mg/kg). CG – control group, LPS – first day after LPS injection. Arrows indicate statistically significant changes in cytokine production caused by LPS injection: ↓ – decrease, ↑ – increase.

а у самцов, напротив, обнаружено повышение концентрации ИЛ-2 и ФНО-α, что у них сочетается с более выраженным воспалительном ответом [1].

В группе препубертатных животных иммунологические нарушения у особей обоего пола выраженные и сходные: наблюдается акцидентальная инволюция тимуса II-III стадий, снижение *ex vivo* продукции всех исследуемых цитокинов, уменьшение количества Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в периферической крови. Половые различия иммунного ответа у препубертатных крыс минимальные и касаются только субпопуляционного состава лимфоцитов – у самок снижается число Т-регуляторных клеток, а у самцов – В-лимфоцитов. По данным литературы, у мышей препубертатного периода при развитии экспериментального сепсиса снижена экспрессия генов, ответственных за пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку числа Т-лимфоцитов, развитие и созревание клеток крови и лейкоцитов [6]. Показано, что по сравнению с новорожденными и взрослыми людьми дети в препубертатном возрасте характеризуются низким уровнем экспрессии селектинов и хемокинов, уровень которых у них при сепсисе резко возрастает, усиливая миграцию лейкоцитов в очаг воспаления [11].

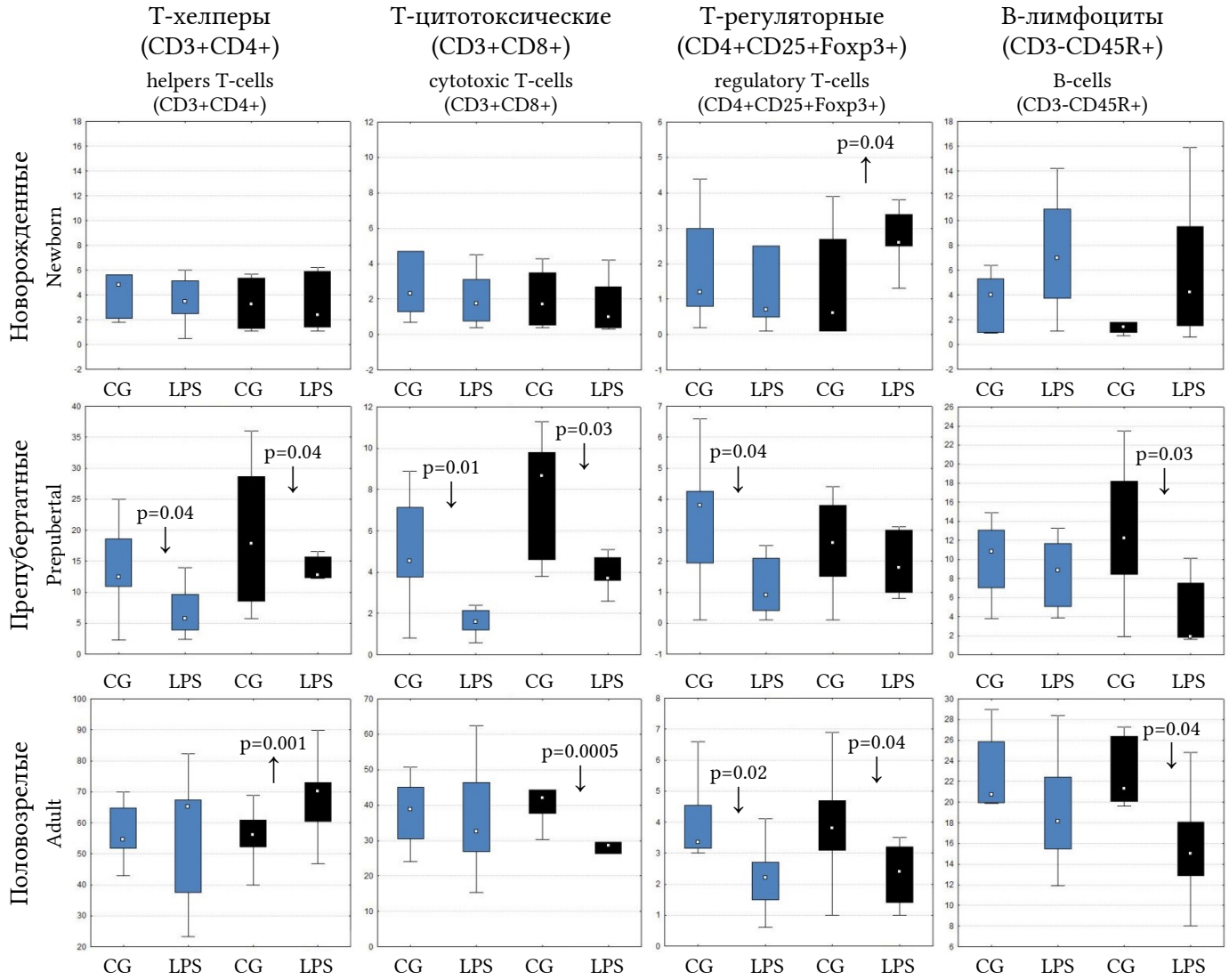

Рис. 2. Изменение относительного числа (%) субпопуляций лимфоцитов у самок (синие столбцы) и самцов (черные столбцы) крыс Вистар разных возрастных групп на первые сутки после введения ЛПС в высокой дозе (15 мг/кг). CG – контрольная группа, LPS – первые сутки после введения ЛПС. Стрелки указывают на статистически значимые изменения продукции цитокинов в результате введения ЛПС: ↓ – снижение, ↑ – повышение.

Fig. 2. Change in the relative number (%) of lymphocyte subpopulations in females (blue columns) and males (black columns) of Wistar rats of different age groups on the first day after administration of LPS in a high dose (15 mg / kg). CG – control group, LPS – first day after LPS injection. Arrows indicate statistically significant changes in cytokine production caused by LPS injection: ↓ – decrease, ↑ – increase.

На первые сутки после введения ЛПС у половозрелых животных обоего пола в тимусе выявлена акцидентальная инволюция II-III стадии. По сравнению с самками у самцов были более выражены ее проявления: было выше количество апоптотически гибнущих клеток. Половые различия продукции цитокинов и изменения числа субпопуляций лимфоцитов в группе половозрелых животных были выражены максимально. У самцов наблюдалось снижение продукции всех исследуемых цитокинов, в том числе ИЛ-2 и ИФН-γ, секреция которых у самок не изменялась. По данным литературы, клетки селезенки людей, умерших от сепсиса, продуцируют низкие количества как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов [4]. В периферической крови у самцов наблюдалось снижение количества Т-цитотоксических и В-лимфоцитов, тогда как у самок было выявлено снижение только Т-регуляторных клеток. Выявленные иммунологические нарушения при введении высокой дозы ЛПС свидетельствуют о более выраженной супрессии реакций врожденного иммунного ответа у самцов по сравнению с самками.

Таким образом, половые различия реакции иммунной системы при введении ЛПС в разных возрастных периодах выражены по-разному: в период новорожденности у самок наблюдается иммуносупрессия, а у самцов – активация про-

дукции провоспалительных цитокинов; в препубертатном периоде половые различия реакции иммунной системы минимальны, а в половозрелом периоде супрессия иммунной системы, индуцированная введением ЛПС, наиболее выражена у самцов. Выявленные возрастные закономерности половых различий морфофункциональных изменений лимфоидных органов могут послужить основой для разработки подходов к эффективной профилактике и персонифицированной терапии воспалительных заболеваний с учетом возраста и пола.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «НИИ морфологии человека» АААА-А19-119021490067-4.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» протокол № 18а от 22.12.2016.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Косырева А.М. Макарова О.В., Михайлова Л.П., Кактурский Л.В. Половые и возрастные различия системной воспалительной реакции при экспериментальной эндотоксинемии. *Иммунология.* 2019;40(3):28-40. [Kosyreva A.M., Makarova O.V., Mikhailova L.P., Kakturskiy L.V. Sex and age differences of the systemic inflammatory response in experimental endotoxinemia. *Immunologiya.* 2019;40(3):28-40 (in Russ.)]. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13004
2. Austad S.N., Bartke A. Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015;62(1):40-46. DOI: 10.1159/000381472
3. Bartke A., Sun L., Fang Y., Hill C. Growth hormone actions during development influence adult phenotype and longevity. *Exp Gerontol.* 2016;86:22-27. DOI: 10.1016/j.exger.2015.12.011
4. Boomer J.S., To K., Chang K.C., Takasu O., Osborne D.F., Walton A.H., Bricker T.L., Jarman S.D., et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011;306(23):2594-2605. DOI: 10.1001/jama.2011.1829
5. Finch C.E., Morgan T.E. Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Curr Alzheimer Res.* 2007;4(2):185-189. DOI: 10.2174/156720507780362254
6. Gentile L.F., Nacionales D.C., Lopez M.C, Vanzant E., Cuenca A., Cuenca A.G., Ungaro R., Szpila B.E., et al. Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis. *J Immunol.* 2014;192(7):3156-3165 DOI: 10.4049/jimmunol.1301726
7. Gubbels Bupp M.R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell Immunol.* 2015;294(2): 102-110. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.02.002
8. Hong M., Bertoletti A. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection. *Semin Immunopathol.* 2017;39(6):643-652. DOI: 10.1007/s00281-017-0641-1
9. Kollmann T.R., Kampmann B., Mazmanian S.K., Marchant A., Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity.* 2017;46(3):350-363. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.03.009
10. O'Connor T.G., Moynihan J.A., Wyman P.A., Carnahan J., Lofthus G., Quataert S.A., Bowman M., Caserta M.T. Depressive symptoms and immune response to meningococcal conjugate vaccine in early adolescence. *Dev Psychopathol.* 2014;26:1567-1576. DOI: 10.1017/S0954579414001242
11. Zonneveld R., Martinelli R., Shapiro N.I., Kuijpers T.W., Plötz F.B., Carman C.V. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care.* 2014;18(2):204 DOI: 10.1186/cc13733

Поступила в редакцию 12.03.2020
Подписана в печать 22.06.2020

Для цитирования: Косырева А.М., Макарова О.В. Половые различия морфофункциональных изменений иммунной системы у крыс Вистар разных возрастных групп при экспериментальной эндотоксинемии. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2020;(2):65–73. DOI: 10.21626/vestnik/2020-2/09.

SEX DIFFERENCES IN MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THE IMMUNE SYSTEM IN WISTAR RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS WITH EXPERIMENTAL ENDOTOXINEMIA

© *Kosyreva A.M.*[1,2], *Makarova O.V.*[1]

[1] **Research Institute of Human Morphology (RIHM)**
3, Tsyurupy str. Moscow, 117418, Russian Federation
[2] **Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)**
6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russian Federation

Objective. The aim was revealing gender differences in morphological and functional changes of lymphoid organs (thymus and spleen), changes of cytokine production and subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in Wistar rats of three age groups with endotoxemia.

Materials and methods. We used male and female Wistar rats of three age groups: newborns, prepubertal and sexually mature adult rats. A day after the injection of 15 mg/kg of O26:B6 *E. coli* lipopolysaccharide (LPS), the volume fraction of the functional zones of the thymus and spleen, the number of AnnexinV + apoptotically dying cells in the thymus, the relative and absolute number of lymphocyte subpopulations (CD3+CD4+, CD3+CD8a+, CD4+CD25+Foxp3+, CD3-CD45R+) in peripheral blood and *ex vivo* production of IL-2, IL-4, IFN-γ and TNF-α were estimated.

Results. Sex differences in the response of the immune system after the LPS injection in different age periods are expressed differently: in the neonatal period, there is immunosuppression in females (decrease in the *ex vivo* production of IL-2, TNF-α and IFN-γ), and there is activation of pro-inflammatory reactions in males (increase in *ex vivo* production of IL-2 and TNF-α). As compared with other age periods at prepubertal age, LPS-induced immunological disorders are more pronounced, and gender differences are minimal and related only to the number of T-regulatory and B-lymphocytes. In the adults, the LPS-induced immunosuppression is most pronounced in males – they have a decrease in the production of all the cytokines studied and a decrease in the number of cytotoxic and regulatory T-lymphocytes and B-cells.

Conclusion. Thus, in each of the studied age periods – newborn, prepubertal and adult, the sexual differences in the immune system reactions are expressed differently and, apparently, these differences are determined by the content of sex steroid hormones, the concentration of which varies with age.

Key words: age and sex differences; thymus; spleen; LPS; cytokines; T- and B-lymphocytes.

Kosyreva Anna M. – DBSc, Head of Scientific and Organizational Department, RIHM, Moscow, Russian Federation; Assistant Professor of Histology, Embryology and Cytology Department of Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-6182-1799. E-mail: kosyreva.a@list.ru (correspondence author)

Makarova Olga V. – DM, Professor, Head of Immunomorphology of Inflammation Laboratory, RIHM, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-8581-107X. E-mail: makarov.olga2013@yandex.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The study was performed as a part of a state assignment for Research Institute of Human Morphology (AAAA-A19-119021490067-4).

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study was approved by Federal Research Institute of Human Morphology (Protocol No. 18a of December 22, 2016).

Received 12.03.2020
Accepted 22.06.2020

For citation: Kosyreva A.M., Makarova O.V. Sex differences in morphofunctional changes in the immune system in Wistar rats of different age groups with experimental endotoxinemia. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health".* 2020;2:65–73. DOI: 10.21626/vestnik/2020-2/09.