

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ЛЕГКИХ КРЫС ВИСТАР ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ ГИПОАНДРОГЕНЕМИИ

Д.И. Солдатов

Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ морфологии человека
РАМН, Москва

В эксперименте у крыс Вистар воспроизведена модель воспалительного процесса в легких в условиях гипоандрогенемии путем введения ЛПС после орхиэктомии. По данным морфологического, морфометрического и цитологического исследования у кастрированных крыс после введения ЛПС в легких наблюдается более выраженный иммунный и воспалительный ответ, что подтверждается повышением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, выраженной гиперплазией бронхоассоциированной лимфоидной ткани, на фоне снижения в жидкости бронхоальвеолярного смыва показателя числа нейтрофилов.

Ключевые слова: гипоандрогенемия, липополисахарид, легкие, орхиэктомия, воспаление

Изменение физиологических реакций развиваются в легких уже при введении 2-5 мг/кг ЛПС, при этом развивается легочная гипертензия, гипоксемия и гипоксия, активация гемостаза и микроциркуляторные изменения [3]. По данным литературы половые стероидные гормоны модулируют иммунологические и воспалительные процессы [9]. Тестостерон и его метаболиты, в частности дигидроэпиандростерон, оказывают иммуносупрессирующее и провоспалительное действие [5]. Поэтому у мужчин воспалительные заболевания характеризуются тяжелым течением [9]. При сепсисе, сопровождающемся синдромом системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточностью, смертельные исходы наблюдаются у мужчин чаще, чем у женщин [6].

В работах Rettew J.A. et al., [12] установлено, что тестостерон снижает уровень экспрессии TLR4 (Toll-like receptor 4) на макрофагах. После орхиэктомии уровень экспрессии TLR4 повышается. В связи с этим у кастрированных самцов при введении им липополисахарида развиваются более тяжелые проявления эндотоксического шока. По данным В.Б. Писарева и соавт. [2] морфологические изменения в легких при эндотоксикозе, вызванным введением сублетальной дозы ЛПС характеризуются гемомикроциркуляторными нарушениями, развитием ДВС-синдрома, отеком и десквамацией альвеолярного эпителия. В литературе отсутствуют сведения об изменениях иммунных и воспалительных реакций в легких при гипоандрогенемии.

В связи с этим целью исследования было изучение морфологических особенностей воспалительного процесса в легких крыс Вистар при воздействии липополисахарида в условиях гипоандрогенемии.

Материалы и методы

В работе использовали самцов крыс Вистар (111 особей), массой тела 220-240гг., полученных из питомника «Столбовая». Контрольная группа была представлена интактными животными. Андрогенную недостаточность у крыс опытных групп моделировали путем орхиэктомии. Воспалительный процесс в легких крыс контрольной и опытных групп вызвали внутрибрюшинным введением ЛПС E.coli штамма 026:B6 (производство фирмы «Sigma», США) в дозе 1,5 мг/кг в 200 мкл физиологического

раствора. Группа сравнения была представлена крысами, которым проводилась орхизэктомия с введением на 14-е и 21-е сут после кастрации 200 мкл физиологического раствора. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 7-е сут после введения ЛПС. Бронхоальвеолярный смыв у животных опытных и контрольной групп получали путем введения в трахею наркотизированного животного 5 мл 199 среды комнатной температуры. В камере Горяева проводили подсчет абсолютного содержания клеточных элементов в 1 мл жидкости бронхоальвеолярного смыва (ЖБАС). В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, подсчитывали абсолютное содержание клеточных элементов (эндопульмональную цитограмму). Легкие фиксировали в 2% уксусной кислоте по методу J. Vienenstock и соавт. (1973). Для оценки морфофункционального состояния бронхоассоциированной лимфоидной ткани (БАЛТ) через 18—24 ч фиксации с помощью сетки Г.Г. Автандилова под лупой (ув.7) на макропрепарате легких в стенке продольно рассеченных бронхов оценивали относительную объемную долю лимфоидных фолликулов. Легкие фиксировали в жидкости Карнуа, проводили по спиртам восходящей концентрации, заливали в парафин, изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. В межальвеолярных перегородках подсчитывали абсолютное число нейтрофилов на стандартной площади среза. Определение содержания свободного и общего тестостерона в сыворотке крови проводили методом твердофазного ИФА с помощью тест-систем фирмы "Adaltis". Для определения содержания эндотоксина использовали хромогенный тест (LAL-тест, НВТ, США).

Проводили Статистическую обработку полученных результатов в программах Statistica 7.0 с использованием непараметрических методов.

Результаты и их обсуждение

По сравнению с контрольной группой у крыс на 14-е и 21-е сут после орхизектомии концентрация общего и свободного тестостерона составила 0,0095 нг/мл и 0,087 пг/мл соответственно, а уровень эндотоксина на 14-е сут снизился в 1,4 и на 21-е в 4,6 раза (табл. 1)

Таблица 1

Показатели уровня общего и свободного тестостерона, эндотоксина в сыворотке крови крыс Вистар контрольной и опытных групп

Группа наблюдения	Параметр	Уровень тестостерона		Уровень эндотоксина (eU/мл)
		Общий (нг/мл)	Свободный (пг/мл)	
Контрольная		1)* $2,01 \pm 0,55$	8) $5,768 \pm 1,17$	15) $0,214 \pm 0,068$
Кастрация (14-е сут)		2) $0,009 \pm 0,009$	9) $0,087 \pm 0,034$	16) $0,153 \pm 0,037$
Кастрация (21-е сут)		3) $0,011 \pm 0,010$	10) $0,146 \pm 0,027$	17) $0,046 \pm 0,014$
ЛПС (1-е сут)		4) $0,217 \pm 0,118$	11) $1,327 \pm 0,250$	18) $0,298 \pm 0,061$
ЛПС (7-е сут)		5) $1,887 \pm 0,858$	12) $3,015 \pm 0,647$	19) $0,200 \pm 0,048$
Кастрация (14-е сут) + ЛПС (1-е сут)		6) $0,028 \pm 0,012$	13) $0,125 \pm 0,042$	20) $0,731 \pm 0,176$
Кастрация (14-е сут) + ЛПС (7-е сут)		7) $0,010 \pm 0,005$	14) $0,033 \pm 0,016$	21) $0,228 \pm 0,057$
Достоверность различий		$p_{1-2} = 0,0200$ $p_{1-3} = 0,0209$ $p_{1-4} = 0,0209$ $p_{1-5} = 1,0000$ $p_{4-6} = 0,0433$ $p_{5-7} = 0,0209$	$p_{8-9} = 0,014$ $p_{8-10} = 0,014$ $p_{8-11} = 0,014$ $p_{8-12} = 0,086$ $p_{11-13} = 0,021$ $p_{12-14} = 0,021$	$p_{15-16} = 0,600$ $p_{15-17} = 0,016$ $p_{15-18} = 0,250$ $p_{15-19} = 0,917$ $p_{18-20} = 0,014$ $p_{19-21} = 0,902$

* - номер группы наблюдений

Показатели цитоза ЖБАС и абсолютного числа нейтрофилов в ней в оба срока исследования уменьшались, но по сравнению с контролем, различия были статистически незначимыми (табл.2).

Таблица 2

Цитологические показатели жидкости бронхоальвеолярного смыва крыс Вистар контрольной и опытных групп

Параметр Группа наблюдения	Цитоз $\times 10^6$ в 1 мкл ЖБАС	Абсолютные показатели клеточных элементов в 1 мкл ЖБАС	
		Лимфоциты	Нейтрофилы
Контрольная	1)* 61 ± 18	8) $4,47 \pm 1,30$	15) $32,42 \pm 5,11$
Кастрация (14-е сут)	2) 48 ± 13	9) $5,24 \pm 1,15$	16) $20,16 \pm 10,24$
Кастрация (21-е сут)	3) 42 ± 6	10) $2,8 \pm 0,47$	17) $17,14 \pm 6,63$
ЛПС (1-е сут)	4) 139 ± 41	11) $9,76 \pm 4,27$	18) $74,94 \pm 34,77$
ЛПС (7-е сут)	5) 77 ± 23	12) $4,71 \pm 0,23$	19) $28,67 \pm 6,48$
Кастрация (14-е сут) + ЛПС (1-е сут)	6) 44 ± 2	13) $5,07 \pm 1,15$	20) $7,74 \pm 2,11$
Кастрация (14-е сут) + ЛПС (7-е сут)	7) 30 ± 15	14) $3,17 \pm 1,92$	21) $7,31 \pm 5,84$
Достоверность различий	$p_{1-2} = 0,917$ $p_{1-3} = 0,602$ $p_{1-4} = 0,175$ $p_{1-5} = 0,754$ $p_{1-6} = 0,602$ $p_{4-6} = 0,110$ $p_{5-7} = 0,066$	$p_{8-9} = 0,602$ $p_{8-10} = 0,465$ $p_{8-11} = 0,250$ $p_{8-12} = 0,655$ $p_{8-13} = 0,754$ $p_{11-13} = 0,465$ $p_{12-14} = 0,289$	$p_{15-16} = 0,175$ $p_{15-17} = 0,117$ $p_{15-18} = 0,600$ $p_{15-19} = 0,456$ $p_{15-20} = 0,009$ $p_{18-20} = 0,250$ $p_{19-21} = 0,077$

* - номер группы наблюдений

На 21-е сут после орхиэктомии отмечалось достоверное снижение показателя числа лимфоцитов в ЖБАС. По сравнению с контролем объемная доля БАЛТ увеличивалась в оба срока после орхиэктомии, но различия показателей не были достоверными (рис. 1).

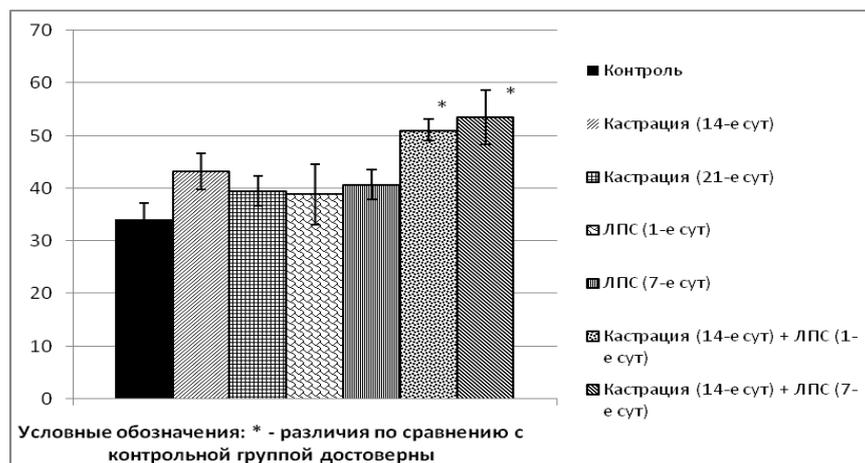


Рис. 1. Морфометрическая характеристика БАЛТ легких крыс Вистар контрольной и опытных групп

Показатель числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках достоверно увеличивался в оба срока наблюдения после кастрации животных (рис. 2).

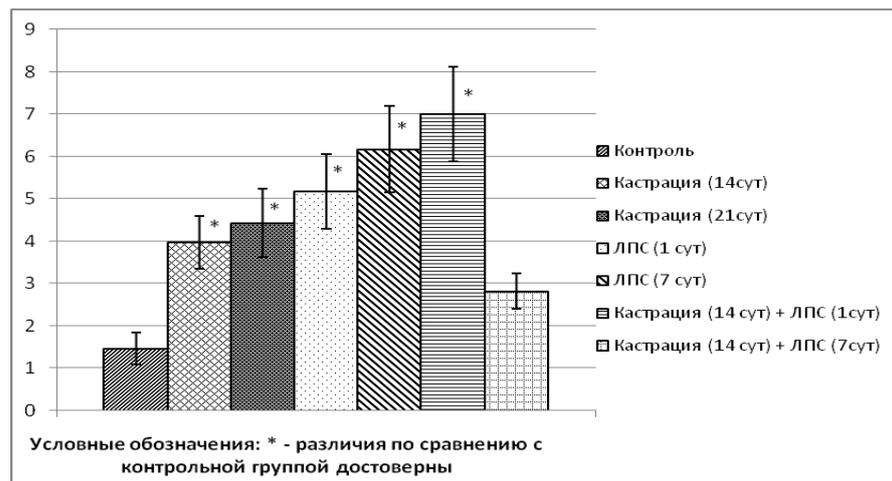


Рис. 2. Морфометрические показатели нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких крыс Вистар

В опытной группе некастрированных крыс на 1-е сут после введения ЛПС показатели содержания общего и свободного тестостерона в сыворотке крови достоверно снижались. Уровень эндотоксина не отличался от контрольного значения. Показатель цитоза ЖБАС достоверно возрастал. Повышались показатели абсолютного числа нейтрофилов и лимфоцитов в ЖБАС по отношению к контрольной группе. Показатель объемной доли БАЛТ повышался, но по сравнению с контролем различия не были статистически значимыми. По данным морфологического исследования на 1-е сут после введения ЛПС достоверно увеличивалось количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках (рис. 2).

На 7-е сут после введения ЛПС некастрированным крысам уровень эндотоксина снижался до контрольных значений. Показатели цитоза, а также абсолютного числа нейтрофилов и лимфоцитов в ЖБАС не отличались по сравнению с контрольной группой. Показатель объемной доли БАЛТ, а также содержание общего и свободного тестостерона достоверно не отличались от контрольных значений. Количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках оставалось повышенным (рис. 2). Таким образом на 7-е сут после введения ЛПС наблюдалась тенденция к нормализации показателей.

При введении ЛПС на 1-е сут в условиях гипоандрогемии уровень общего и свободного тестостерона был резко снижен по сравнению с группой некастрированных крыс на 1-е сут после введения ЛПС. Уровень эндотоксина при введении ЛПС кастрированным животным был выше в 2,5 раза. Показатель цитоза был снижен, количество нейтрофилов в ЖБАС достоверно снижалось. Объемная доля БАЛТ достоверно увеличивалась (рис. 1). Наблюдалось достоверное увеличение количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках.

На 7-е сут после введения ЛПС в условиях гипоандрогемии концентрация общего и свободного тестостерона оставалась сниженной и составила 0,010 нг/мл и 0,033 пг/мл. Уровень эндотоксина достоверно не изменялся по сравнению с группой некастрированных крыс, которым вводился ЛПС. Показатель цитоза снижался, а показатель объемной доли БАЛТ оставался повышенным. Наблюдалось снижение количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках.

Таким образом по результатам наших исследований у кастрированных животных увеличивается число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в респираторном отделе легких у крыс после орхиэктомии обусловлено тем, что резкое снижение уровня

тестостерона приводит к активации воспалительных и иммунологических реакций [4] в легких, что проявляется тенденцией к гиперплазии БАЛТ. Rejčić-Karapetrović B. et al., [10] показали, что орхиэктомия самцов приводит к гипертрофии тимуса и расширению коркового слоя, что соответствует по О.В. Зайратьянцу [1] акцидентальной инволюции 1 стадии. Одним из возможных механизмов снижения уровня эндотоксина при гипоандрогемии, по-видимому, является изменение состава микрофлоры кишечника с уменьшением содержания E.coli.

В легких кастрированных крыс на 1-е сут после введения ЛПС развивается воспалительный процесс, который характеризуется увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, а также показателей цитоза ЖБАС и числа нейтрофилов в ней. Полученные данные о развитии воспалительного процесса в легких после воздействия ЛПС согласуются с литературными [2]. Следует отметить, что введение ЛПС не привело к повышению уровня эндотоксина в сыворотке, что, по-видимому, связано с включением механизмов инактивации ЛПС системой ЛПС-связывающего белка и антителами к эндотоксину [8].

Введение ЛПС кастрированным животным вызывало более выраженный иммунный и воспалительный ответ, что характеризовалось повышением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках и выраженной гиперплазией БАЛТ. Quintar A.A. et al., [11] показали, что орхиэктомия приводит к повышению уровня экспрессии TLR4, поэтому введение ЛПС обуславливает более выраженные воспалительные реакции в легких. Тенденция к снижению числа нейтрофилов в ЖБАС у кастрированных крыс после введения ЛПС отражает нарушение хемотаксической функции нейтрофилов за счет нарушения транспорта кальция внутри клетки [7].

Выводы

1. При гипоандрогемии в легких крыс Вистар развиваются реактивные изменения, характеризующиеся увеличением числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, тенденцией к увеличению объемной доли бронхоассоциированной лимфоидной ткани. Уровень эндотоксина в сыворотке крови на 14-е сут после кастрации снижается в 1,4, а на 21-е сут в 4,6 раза.

2. На 1-е сут после введения липополисахарида в межальвеолярных перегородках в 3,5 раза увеличивается число нейтрофилов, достоверно возрастает показатель цитоза жидкости бронхоальвеолярного смыва, что сочеталось с его нейтрофилезом. Уровень эндотоксина в сыворотке крови по сравнению с контролем достоверно не изменяется. На 7-е сут после введения липополисахарида отмечается тенденция к нормализации показателей.

3. На 1-е сут после введения липополисахарида у кастрированных крыс по сравнению с некастрированными достоверно возрастают показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках, объемной доли бронхоассоциированной лимфоидной ткани, а в жидкости бронхоальвеолярного смыва показатель числа нейтрофилов снижается. Уровень эндотоксина у кастрированных крыс повышается в 2,5 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайратьянц О.В., Берщанская А.М. Строение и развитие вилочковой железы. В кн. Харченко В.Г., Саркисов Д.С., Ветшев П.С., Галил-Оглы Г.А., Зайратьянц О.В. Болезни вилочковой железы. – М., «Триада-Х», 1998, С. 6-46.
2. Писарев В.Б. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога: монография / В.Б. Писарев, Н.В. Богомолова, В.В. Новочадов. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2008, С. 113-128.
3. Abraham P, Wilfred G. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. Clin. Chim. Acta. 1999. Nov;289(1-2):177-9.

4. Angele M.K., Schwacha M.G., Ayala A, Chaudry I.H. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock*. 2000 Aug;14(2):81-90.
5. Angele M.K., Frantz M.C., Chaudry I.H. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006 Oct;61(5):479-88
6. Bone R.C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome) *JAMA*. – 1992. p.3452-3455
7. Deitch E.A., Xu D.Z., Franko L., Ayala A., and Chaudry I. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1: 141–146, 1994.
8. Elsbach P. Bactericidal permeability-increasing protein in host defence against gram-negative bacteria and endotoxin// *Ciba Found Symp.*, 1994 - 186 - p. 176-187
9. Klein S.L., Roberts C.W. Sex Hormones and Immunity to Infection // Heidelberg/ Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg – 2010 – Pp. 1-319
10. Pejčić-Karapetrović B., Kosec D., Leposavić G. Differential effects of male and female gonadal hormones on the intrathymic T cell maturation. *Dev Immunol*. 2001;8(3-4):305-17
11. Quintar A.A., Roth F.D., De Paul A.L., Aoki A., Maldonado C.A. Toll-like receptor 4 in rat prostate: modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod*. 2006; 75:664–672.
12. Rettew J.A., Huet-Hudson Y.M., Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod*. 2008 Mar;78(3):432-7. Epub 2007 Nov 14.

**MORPHOLOGICAL FEATURES OF INFLAMMATION IN THE LUNGS OF WISTAR RATS AFFECTED
LIPOPOLYSACCHARIDE UNDER GIPOANDROGENEMII**

D.I. Soldatov

In the experiment, Wistar rats reproduced the model of inflammation in the lungs in gipoandrogenemii by the introduction of LPS after testectomy. According to morphological, morphometric and cytological studies in castrated rats after administration of LPS in the lungs of more pronounced immune and inflammatory response, as evidenced by increased numbers of neutrophils in mezhalveolyarnyh partitions, hyperplasia bronhoassotsirovannoy lymphoid tissue, the reduction in the bronchoalveolar washing fluid in the rate of neutrophils.

Key words: gipoandrogenemiya, lipopolysaccharide, lung, testectomy, inflammation

Солдатов Д.И. – аспирант лаборатории иммуноморфологии воспаления УРАМН НИИ морфологии человека РАМН, к.б.н.; mortolhum@mail.ru