

На правах рукописи

Абдалова Арзу Мирза кызы

**СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ И ХРОНОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ
ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ЭНДОМЕТРИТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Шурлыгина Анна Вениаминовна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Машак Светлана Владимировна**
(Новосибирский государственный медицинский университет, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М. Я. Субботина)

доктор медицинских наук, доцент **Маркова Евгения Валерьевна**
(Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ), заведующий лабораторией нейроиммунологии, г. Новосибирск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (г. Новосибирск)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 г. в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.07 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52 тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; <http://ngmu.ru/dissertation/488>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. В последнее время появляется все больше заболеваний, в патогенезе которых принимают участие дисфункции клеток иммунной системы. В их число, естественно, входят инфекционно-воспалительные процессы, которые все чаще принимают хроническое течение. С 50-х годов XX века появилось понятие «эпидемия хронических инфекционных заболеваний». Неуклонный и повсеместный рост заболеваемости, возрастание случаев сочетанной патологии, склонность к затяжному течению и хронизации процессов, формирование полирезистентности к лекарственным препаратам можно рассматривать как свидетельство ослабления систем защиты организма, прежде всего иммунной, т. е. развитие так называемого иммунодефицитного состояния. Нарушения функций иммунокомпетентных клеток развиваются и при химиотерапии злокачественных опухолей, и при действии неблагоприятных факторов окружающей среды, и при стрессе, который все в большей степени становится неотъемлемым компонентом современной жизни. По данным Минздравсоцразвития России (расчет Росстата), число россиян, страдающих от «болезней крови, кроветворных органов и других заболеваний, вовлекающих иммунный механизм», с 2000 по 2017 год выросло с 551 до 659 тыс. человек. Отмечен рост онкопатологии (1 226–1 674 тыс. чел.), сердечно-сосудистых заболеваний (2 483–4 706 тыс. чел.), болезней эндокринной системы, в том числе сахарного диабета и метаболических нарушений (1 234–2 050 тыс. чел.) (Официальный сайт Федеральной службы государственной статистики http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/zdrav/zdr2-1.xls).

Проблема воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин на протяжении последних десятилетий продолжает оставаться одной из самых важных в медицине. Это связано с их широким распространением: уровень заболеваемости воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ) не только не снижается, но и растет [Нурадилова Д. М., 2015]. Крайне важным как с медико-социальной, так и с экономической точки зрения является высокая распространенность воспалительных заболеваний среди молодых женщин. Пик заболеваемости наблюдается у лиц в возрасте от 15 до 24 лет, в США у подростков ежегодно регистрируются 2,5 % новых случаев ВЗОМТ [Serov V. N., Tverdikova M. A., 2011]. Хронические ВЗОМТ, в частности хронический сальпингоофорит, часто ведут к недостаточности яичников и развитию бесплодия [Абрамова С. Н. и др., 2014; Бурова Н. А. и др., 2019]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что в лечении ВЗОМТ особое внимание следует уделять применению методов иммунокоррекции в целях предупреждения перехода воспаления в хроническую стадию.

В последние десятилетия все большую активность набирают исследования, посвященные выяснению возможностей клинического применения цитокинов в качестве эффективных иммунокорректоров. Способность отвечать на цитокины является важнейшей характеристикой биологии клеток иммунной системы. Однако применение цитокиновой

терапии при различных формах патологии помимо высокой эффективности показало и определенные ограничения данного метода, в том числе – высокую степень риска развития побочных осложнений, непредсказуемость отдаленных последствий, трудность прогнозирования и контроля реакции организма на цитокиновую терапию. Таким образом, актуальным становится вопрос о поиске и разработке более эффективных и безопасных схем применения цитокинов в клинике. Определенный вклад в решение данной проблемы могли бы внести исследования хронотерапевтического направления, позволяющие создавать временные режимы применения препаратов с учетом биоритмов эндогенной продукции того или иного фактора, чувствительности к нему клеток-мишеней, характера межсистемных взаимосвязей. Однако проблема хронокоррекции нарушений, связанных с количественными перестройками клеточного пула иммунной системы, на сегодняшний день очень мало изучена.

Исследование механизмов регуляции функций в норме и патологии, в том числе и цитокиновой регуляции иммунных функций, без учета фактора времени оказывается неполным, а часто приводит и к ошибочным заключениям. Но временные аспекты ответа иммунокомпетентных клеток на цитокины исследованы пока явно недостаточно и практически не учитываются в экспериментальной и клинической работе.

Таким образом, актуальность хронобиологических исследований в области изучения регуляторного действия цитокинов на клетки иммунной системы в норме и при воспалении заключается в том, что учет фактора времени позволяет выявить новые аспекты механизмов иммунорегуляции, ускользающие от наблюдения при традиционном подходе. Для практической медицины актуальность определяется возможностью разработки новых методов хроноиммунокоррекции воспалительных заболеваний.

Степень разработанности темы диссертации. При многих видах патологии: сердечно-сосудистых заболеваниях, дисметаболических процессах, аллергических и аутоиммунных болезнях, онкологии и др., – расстройства функций иммунной системы и ее клеточных элементов являются ключевыми патогенетическими факторами [Маянский Д. Н., 1991; Возианов А. Ф. и др. 1998; Васильева Г. И. и др., 2000; Козлов В. К. и др. 2002; Тугуз А. Р. и др., 2003; Титов В. Н., 2003; Лутай М. И., 2004; Зак К. П., Попова В. В., 2006; Бережная Н. М., 2007; Мансуров Х. Х. и соавт., 2007; Abbas A. et al., 1996; Fain J. Net al., 2004; Katsiari C. G. et al., 2005; Rapoport M. J. et al., 2005; Leuschen P. M. 2008; Zheng Chianelli M. et al., 2008; Frustaci A. et. al., 2018; Ayelign B. et. al. 2019; Ruiz-Ojeda F. J. et al., 2019]. Все это обуславливает актуальность исследований, направленных на поиск и разработку оптимизированных методов иммунокоррекции.

По данным отечественных авторов, в структуре гинекологической заболеваемости воспалительные заболевания составляют 60–70 % и до 30 % госпитализированных женщин [Radzinsky V. E., 2013]. В исследованиях многих авторов показано, что при воспалении,

особенно при переходе его в хроническую форму, возникает состояние вторичного иммунодефицита, значительные изменения претерпевают системы как гуморального, так и клеточного иммунитета. Таким образом, в результате недостаточности иммунных механизмов сохраняется персистенция возбудителя в очаге инфекции, а клинически наблюдается вялое течение, часто с отсутствием явных симптомов воспалительного процесса [Bakoulev A. L., 2008].

Цитокины являются регуляторными молекулами, которые синтезируются и продуцируются иммунокомпетентными клетками в процессе их активации. В последнее время активно исследуются возможности применения цитокинов для коррекции функций иммунной системы. Известно, что процессы синтеза и секреции практически всех регуляторных веществ в организме осуществляются в ритмическом режиме. С другой стороны, биологические ритмы свойственны и экспрессии рецепторов к регуляторным факторам на клетках мишенях. В литературе существуют сведения о наличии суточных вариаций содержания цитокинов в крови людей и в лимфоидных органах и крови экспериментальных животных [Шурлыгина А. В. и др., 1999; Young M. R. et al., 2002; Vgontzas A. N. et al., 2002; Uchino E. et al., 2006; Cutolo M. et al., 2006; Miles M. P. et al., 2008; Bergmann A., Deinzer R., 2008; Paredes S. D. et al., 2009; Labrecque N., Cermakian N., 2015]. Биоритмы продукции цитокинов «встроены» в общую временную структуру организма, находятся под контролем системы clock-генов [Koyanagi S., 2003; Arjona A., Sarkar D. K., 2006; Kwak Y. et al., 2008; Onoue T. et al., 2019] и взаимосвязаны с суточным ритмом продукции мелатонина – основного эндокринного компонента «биологических часов» организма [Fernandes P. A. et al., 2006; Pontes G. N. et al., 2007; Pinto A. R., 2016]. Ритмический режим продукции цитокинов и экспрессии рецепторов к ним является основой цикличности в реакции иммунокомпетентных клеток на цитокиновые сигналы [Труфакин В. А. и др., 2002]. Это служит обоснованием возможности разработки хронотерапевтических схем применения цитокинов.

Цель исследования. Изучить количественные перестройки клеточного состава регионарных к матке лимфоузлов и эндометрия у самок крыс при введении интерферона-гамма в разное время суток в норме и при экспериментальном эндометрите.

Задачи исследования

1. Изучить суточные вариации клеточного состава лимфатических узлов, регионарных к органам репродуктивной системы, у здоровых самок крыс и определить влияние интерферона-гамма (ИФН-гамма), введенного в разное время суток, на численность этих клеточных популяций.

2. Оценить суточные вариации клеточного состава лимфатических узлов, регионарных к органам репродуктивной системы, у самок крыс с экспериментальным эндометритом.

3. Определить клеточный состав эндометрия и регионарных к матке лимфоузлов в динамике развития экспериментального эндометрита у крыс.

4. Определить клеточный состав лимфатических узлов и эндометрия у самок крыс при эндометрите после введения ИФН-гамма в утреннее время суток.

5. Определить клеточный состав лимфатических узлов и эндометрия у самок крыс при эндометрите после введения ИФН-гамма в вечернее время суток.

Научная новизна. Впервые получены данные о наличии суточных вариаций клеточного состава лимфатических узлов, регионарных к органам репродуктивной системы у самок крыс.

Получены новые сведения о нарушении суточной временной организации количества клеток лимфатических узлов, регионарных к органам репродуктивной системы у самок крыс при экспериментальном эндометрите.

Впервые обнаружены различия в эффектах введения ИФН-гамма в утреннее и вечернее время на клеточный состав лимфатических узлов и эндометрия в норме и при эндометрите у крыс, которые обусловлены суточными вариациями количества клеток-мишеней для цитокина и преобладанием этих клеток во время его введения.

В модели эндометрита интерферон-гамма оказал более выраженное противовоспалительное и иммуностимулирующее действие при введении в вечернее время, когда было повышено количество его клеток-мишеней – макрофагов (в парааортальном лимфоузле) и CD8⁺ эффекторов/киллеров (в подвздошном лимфоузле). После вечернего введения ИФН-гамма происходит более раннее снижение нейтрофильных гранулоцитов и повышение моноцитов/макрофагов в лимфатических узлах, повышение содержания CD8⁺ эффекторов/киллеров в лимфатических узлах и плазматических клеток в лимфатических узлах и эндометрии

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе исследования данные расширяют и уточняют сведения о хронобиологических закономерностях цитокиновой регуляции клеточного состава лимфатических узлов региональных к матке крыс, в норме и при экспериментальном эндометрите. Установлено, что наибольший противовоспалительный и иммуностимулирующий эффект ИФН-гамма проявляется в том случае, если он применяется во время преобладания его клеток-мишеней в регионарных к матке лимфоузлах. Полученные результаты вносят значительный вклад в развитие нового научного направления – хронобиологии цитокиновой регуляции клеточного состава органов лимфоидной системы в норме и при воспалении. Практическая значимость работы состоит в том, что полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для разработки оптимизированных методов хроноиммунокоррекции, которые позволят использовать препараты на основе цитокинов в лечебных целях с большей эффективностью и безопасностью.

Методология и методы исследования. Проведено экспериментальное исследование с использованием гистологических, морфометрических методов, проточной цитофлуориметрии и статистических методов. Применены методы описательной и сравнительной статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальный эндометрит у крыс сопровождается десинхронизмом в количественном составе клеток регионарных к матке лимфатических узлов – парааортальных, паховых и подвздошных.

2. Эффект интерферона-гамма у интактных крыс и в модели эндометрита ассоциируется с особенностями клеточного состава регионарных к матке лимфатических узлов в момент введения цитокина.

3. Повышение количества плазматических клеток и CD8⁺ лимфоцитов (Т-эффекторов-киллеров) в эндометрии и регионарных лимфоузлах после введения интерферона-гамма в вечернее время суток обуславливает более раннее снижение активности воспалительного процесса при эндометрите у крыс.

Степень достоверности. Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные и доступные анализу результаты. Диссертация выполнена на достаточном количестве морфологического материала, со всеми необходимыми контролями, с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световая микроскопия, морфометрия, цитофлуориметрическое исследование – проточная цитометрия) и анализа результатов.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждены на 3-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2000), на Объединенном иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, 2008), на 2-м Санкт-Петербургском лимфологическом форуме «Лимфология XXI века: новые подходы и актуальные исследования» (Санкт-Петербург, 2019), на 9-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2020), на BGRS/SB-2020: 12th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Novosibirsk, Russia, 2020).

Диссертационная работа апробирована на заседании научно-медицинского совета НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, 2020).

Тема диссертации является составной частью научно-исследовательской работы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН,

номер государственной регистрации 0324-2019-0046-С-02.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М. Я. Субботина Новосибирского государственного медицинского университета.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 9 научных работ, в том числе 6 статей в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 3 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования (Scopus, Web of Science, PubMed).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Список литературы представлен 235 источниками, из которых 159 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 19 таблиц и 9 рисунков.

Личный вклад автора. Все исследования, статистическая обработка полученных данных выполнены лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные. Исследование одобрено этическим комитетом НИИКЭЛ – филиала ИЦиГ СО РАН (протокол № 27 от 24.11.2006). В работе использовались крысы Вистар, самки весом 240–260 г в возрасте 3–4 мес. (98 голов). Крысы получены из вивария НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Животные содержались в виварии НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН при свободном доступе к воде и пище и при естественном световом режиме в пластиковых клетках «Animark» (Финляндия). Предварительная синхронизация сообществ была не менее 14 суток при постоянном составе. Эксперимент проводили в осеннее время года – октябрь, ноябрь. Время восхода солнца – 5 : 55–6 : 51 ч, время заката – 19 : 34–20 : 32 ч.

Дизайн экспериментов. Перед началом эксперимента у крыс определяли фазу эстрального цикла методом цитологического агализа влагалищных мазков. В эксперимент брали животных, находившихся в фазе диэструса. У животных была создана модель экспериментального эндометрита, разработанная Е. В. Старковой с соавт. (1996). Животным вводили патогенную культуру *St. Aureus* в дозе 3 млн микробных тел под слизистую влагалища. Пятые сутки после инфицирования соответствуют пику острой фазы воспалительного процесса, на 15–16-е сутки развивается лимфоплазмоцитарная инфильтрация тканей стенки матки. Крысиный рекомбинантный ИФН-гамма (Sigma) вводили внутривентрально в дозе 0,1 мкг на 100 г веса животного, начиная с 13-х суток после

индукции воспалительного процесса в течение 3 дней, одной группе животных в 10 : 00 ч, а другой – в 20 : 00 ч. В качестве активного контроля использовались крысы, которым вводили растворитель цитокина – 0,9 % раствор NaCl (физиологический раствор) – в те же часы суток. В качестве пассивного контроля использовались крысы с воспалением без воздействия и интактные животные того же пола и возраста. На 16-е и 21-е сутки после индукции воспаления крыс забивали декапитацией под этиминаловым наркозом и брали для исследования паховые, почечные и парааортальные лимфоузлы, матку. Из лимфоузлов готовили клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. В суспензии из лимфоидных органов подсчитывали общее количество ядросодержащих клеток в камере Горяева. В мазках из клеточной суспензии лимфоидных органов, окрашенных азур2-эозином, определяли процентное содержание различных клеточных форм. Субпопуляции лимфоцитов в лимфатических узлах определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител анти-CD25 и анти-CD8, меченных флюоресцеин-изотиоцианатом (BDPharmingen USA) и проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Матку фиксировали в 10 % формалине, заливали в парафин, готовили срезы, толщиной 3–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световым микроскопом.

Методики. *Определение количества клеток в лимфоидных органах.* Лимфатические узлы извлекали при забое экспериментальных животных, взвешивали и приготавливали клеточную суспензию с использованием стеклянного гомогенизатора. Количество клеток в 1 мл суспензии подсчитывали в камере Горяева, а затем пересчитывали на количество клеток в органе.

Определение субпопуляций лимфоидных клеток методом лазерной проточной цитофлуориметрии. Для определения содержания в лимфоидных органах субпопуляций лимфоцитов проводили обработку клеток моноклональными антителами (МАТ), мечеными флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) к поверхностным лимфоцитарным антигенам CD25 и CD8 (BDPharmingen). В каждую пробирку вносили по 20 мкл антител, соответствующих маркировке пробирки. Затем добавляли по 100 мкл клеточной суспензии (107 клеток/мл) не касаясь наконечником раствора антител и стенок пробирки. Образцы перемешивали и инкубировали в темноте 15 мин при температуре +20°C. После инкубации клетки отмывали 2 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР, pH = 7,4) с 0,1 % азидом натрия и фиксировали в 500 мкл ЗФР, содержащим 1 % параформальдегида. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson).

Гистологическое исследование матки. Матку фиксировали в 10 % формалине. Материал заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. В срезах стенки матки в слизистой оболочке подсчитывали абсолютное количество моноцитов/макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов и плазматических клеток на единицу площади среза при увеличении ок. 10,

об. 90 с применением масляной иммерсии. Для каждого среза просматривали 30 полей зрения.

Определение содержания моноцитов, нейтрофильных гранулоцитов и плазматических клеток в лимфатических узлах. Из клеточной суспензии лимфатических узлов готовили мазки на предметных стеклах методом высушенной капли. Мазки фиксировали в 100 % метаноле и окрашивали азури-эозином. Исследование проводили под световым микроскопом при увеличении ок. 10, об. 90 с использованием масляной иммерсии. Подсчитывали количество клеток определенного типа на 300 клеточных элементов. Результат выражали в процентах.

Определение стадии эстрального цикла. У самок крыс брали влагалищные мазки, которые окрашивали метиленовым синим и затем с помощью микроскопа анализировали их клеточный состав. Стадию цикла определяли по пропорции клеток того или иного типа. Стадия проэструса характеризуется преобладанием в составе влагалищного мазка клеток с хорошо различимыми ядрами, в эстресе наблюдается большое количество ороговевших безъядерных клеток, стадия метэструса характеризуется преобладанием лейкоцитов и наличием небольшого количества клеток с ядрами и ороговевших клеток, в диэстресе в составе влагалищного мазка присутствуют лейкоциты, единичные эпителиальные клетки и слизь [Киршенблат Я. Д., 1969]. В эксперимент брали животных в стадии диэструса.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы «Statistica 6.0». С помощью методов описательной статистики проводили определение среднего арифметического (M), стандартной ошибки (SE) и стандартного отклонения (SD). Сравнение результатов проводили с помощью методов непараметрической статистики, так как было предварительно установлено, что распределение полученных данных отличается от нормального. Достоверность различий между экспериментальными группами оценивали по U-критерию Манна – Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости 95 %. Использовалось попарное сравнение опытных групп с каждым контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточный состав регионарных к матке лимфоузлов у интактных самок крыс и при экспериментальном эндометрите. *Суточные вариации клеточного состава регионарных к матке лимфоузлов у интактных самок крыс.* Во всех лимфоузлах обнаружены утренне-вечерние различия для процентного содержания средних лимфоцитов, утренние значения показателей превышали таковые в 20 : 00 ч. В парааортальном лимфоузле, кроме того, вечером было повышено содержание малых лимфоцитов. Во всех лимфоузлах вечером было повышено содержание Т-эффекторов/киллеров, в паховых и парааортальных лимфоузлах – моноцитов/макрофагов.

Суточные вариации клеточного состава регионарных к матке лимфоузлов у крыс при экспериментальном эндометрите. На 13-е сутки воспаления отмечаются изменения во временной организации клеточного состава лимфатических узлов.

В парааортальных лимфоузлах исчезают достоверные суточные колебания процента средних и малых лимфоцитов, но появляются утренне-вечерние различия для содержания CD25+ клеток. Инвертируются суточные вариации для CD8+ клеток. В паховых лимфоузлах нивелируются утренне-вечерние отличия в содержании средних лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, но появляются таковые для процента больших и малых лимфоцитов. Инвертируются суточные вариации для CD8+ клеток. В подвздошных лимфоузлах появляются достоверные суточные колебания процента больших, средних лимфоцитов и моноцитов/макрофагов. Суточные вариации содержания средних лимфоцитов инвертируются по сравнению с интактными крысами (таблица 1).

Таблица 1 – Суточные вариации клеточного состава лимфоидных органов самок крыс интактных и на 13-е сутки развития экспериментального эндометрита (M ± SE)

Клетки (%)	Инт. 10 : 00 ч (n = 7)	Инт. 20 : 00 ч (n = 7)	В 10 : 00 ч (n = 7)	В 20 : 00 ч (n = 7)
Лимфоузел парааортальный				
Большие лимфоциты	8,45 ± 1,24	6,74 ± 2,14	9,1 ± 0,73	5,6 ± 0,71
Средние лимфоциты	18,36 ± 1,05	8,64 ± 0,98*	11,2 ± 1,93	9,9 ± 1,02
Малые лимфоциты	32,14 ± 1,52	69,87 ± 0,18*	46,0 ± 2,57	63,1 ± 1,93
CD8+	39,18 ± 0,87	43,87 ± 5,25	45,2 ± 0,38	37,6 ± 0,74*
CD25+	2,57 ± 0,01	3,12 ± 0,05	4,01 ± 0,11	2,83 ± 0,03*
Моноциты/макрофаги	6,14 ± 1,24	8,36 ± 2,78	5,4 ± 0,08	9,1 ± 0,03*
Лимфоузел паховый				
Большие лимфоциты	8,69 ± 1,32	7,54 ± 2,12	9,6 ± 0,74	4,0 ± 0,94*
Средние лимфоциты	20,87 ± 1,24	10,14 ± 1,47*	18,7 ± 1,05	12,5 ± 1,12
Малые лимфоциты	58,78 ± 3,01	54,21 ± 2,14	36,8 ± 2,95	56,71 ± 1,03*
CD8+	39,18 ± 2,01	45,11 ± 3,58	42,8 ± 0,56	34,8 ± 0,08*
CD25+	4,16 ± 0,03	3,87 ± 1,02	5,61 ± 0,06	4,21 ± 0,03
Моноциты/макрофаги	15,25 ± 1,21	22,15 ± 3,45	12,3 ± 0,78	7,5 ± 1,01
Лимфоузел подвздошный				
Большие лимфоциты	2,24 ± 0,14	4,12 ± 2,25	1,3 ± 0,05	3,2 ± 0,09*
Средние лимфоциты	9,51 ± 0,14	4,25 ± 0,02*	2,9 ± 0,57	9,2 ± 0,31*
Малые лимфоциты	65,13 ± 3,24	59,25 ± 1,12	51,9 ± 2,07	68,1 ± 1,12
CD8+	29,15 ± 0,14	32,12 ± 1,25	39,7 ± 0,38	41,5 ± 0,18*
CD25+	3,12 ± 0,04	1,25 ± 0,02	5,16 ± 0,08	5,73 ± 0,06
Моноциты/макрофаги	10,41 ± 1,12	6,15 ± 2,87	13,0 ± 0,95	3,1 ± 0,07*
Примечание: Инт. – интактные, В – воспаление, * – достоверные отличия от 10 : 00 ч соответствующей группы.				

Таким образом, для хронобиологической реорганизации клеточного состава лимфатических узлов крыс при развитии экспериментального эндометрита характерны признаки десинхронизации – уменьшение количества параметров, имеющих достоверные суточные вариации, «сглаживание» различий между утренними и вечерними значениями, инверсия суточных колебаний для некоторых показателей.

Влияние воспаления на клеточный состав лейкоцитарного инфильтрата эндометрия и регионарных к матке лимфатических узлов. На 13-е сутки инфекционно-воспалительного процесса отмечено усиление мононуклеарной и нейтрофильной инфильтрации в тканях эндометрия (таблица 2). На 21-е сутки количество всех исследованных форм лейкоцитов в тканях слизистой оболочки матки пришло к уровню интактного контроля. При этом по сравнению с 13-ми сутками достоверно снизилась нейтрофильная инфильтрация эндометрия (см. таблица 2).

Таблица 2 – Лейкоцитарная инфильтрация эндометрия на 13-е и 21-е сутки инфекционно-воспалительного процесса. Количество клеток в поле зрения ($M \pm SE$)

Количество клеток	Интактные (n = 7)	Воспаление (n = 7)
13-е сутки		
Количество мононуклеарных лейкоцитов	29,90 ± 3,52	39,60 ± 1,94*
Количество нейтрофильных гранулоцитов	15,20 ± 4,88	56,47 ± 6,27*
Количество плазматических клеток	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,11
21-е сутки		
Количество мононуклеарных лейкоцитов	29,90 ± 3,52	35,28 ± 3,04
Количество нейтрофильных гранулоцитов	15,20 ± 4,88	28,08 ± 5,00#
Количество плазматических клеток	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04
Примечание: * – достоверные отличия от интактных; # – достоверные отличия от воспаления 13-е сутки (Mann – Whitney U-test, p < 0,05)		

В подвздошном лимфоузле на фоне увеличения общего количества клеток на 13-е сутки отмечено повышение процентного содержания и абсолютного числа всех исследованных субпопуляций. На 21-е сутки воспаления пришло к уровню интактного контроля общее количество клеток. Процентное содержание и абсолютное количество CD8+ и CD25+ клеток оставалось повышенным.

В паховом лимфатическом узле на 13-е сутки воспаления повышалось общее количество клеток, абсолютное количество CD8+ и CD25+ лимфоцитов, снижался процент CD8+ лимфоцитов. К 21-м суткам осталось повышенным абсолютное количество CD8+, процент и абсолютное число CD25+ клеток.

В парааортальном лимфатическом узле на 13-е сутки было повышено общее

количество клеток, абсолютное количество клеток с фенотипом CD25+, но снижен процент CD8+-лимфоцитов. К 21-м суткам остались увеличенными процент и абсолютное число CD25+ клеток. Остальные показатели пришли к уровню интактного контроля.

Влияние различных суточных режимов введения ИФН-гамма на клеточный состав лейкоцитарного инфильтрата эндометрия и регионарных к матке лимфатических узлов самок крыс в норме и при экспериментальном эндометрите.
Влияние различных суточных режимов введения ИФН-гамма на клеточный состав регионарных к матке лимфатических узлов у интактных самок крыс. У интактных самок крыс выявлено очень слабое влияние цитокина на клеточный состав органов иммунной системы. Утреннее введение ИФН-гамма не оказало влияния на клеточный состав лимфатических узлов. Введение ИФН-гамма в 20 : 00 ч повышает процент CD25+ клеток в парааортальном лимфоузле и CD8+ лимфоцитов в паховом лимфоузле. В связи со слабой выраженностью эффекта цитокина на клеточный состав органов иммунной системы интактных крыс необходимо было выяснить его хроноэффективность при состоянии клеток иммунной системы, отличающемся от нормы. В качестве такой модели выбран экспериментальный эндометрит.

Влияние утреннего (10 : 00 ч) введения ИФН-гамма на показатели воспалительного процесса в эндометрии самок крыс (модель эндометрита) (таблица 3).

Таблица 3 – Лейкоцитарная инфильтрация эндометрия на 16-е и 21-е сутки воспаления после введения ИФН-гамма в утреннее время (количество клеток в поле зрения)

Клетки	Интактные (n = 7)		Воспаление (n = 7)		Введение ФР (n = 7)		Введение ИФН-γ (n = 7)	
	М	SE	М	SE	М	SE	М	SE
	16-е сутки							
МНК эндометрия	29,90	4,45	39,6*	1,94	34,25*	4,41	37,60	2,29
НФ эндометрия	15,20	3,98	56,46*	6,27	26,55#	4,16	41,11*&	6,05
ПЛ эндометрия	0,00	0,27	0,20	0,11	0,65*#	0,22	0,35	0,21
21-е сутки								
МНК эндометрия	29,90	4,45	35,28	3,04	27,92	2,40	32,95	2,67
НФ эндометрия	15,20	3,98	28,08^	5,00	28,12	3,80	27,00^	4,58
ПЛ эндометрия	0,00	0,27	0,04	0,04	0,12	0,07	0,30	0,15

Примечание: МНК – мононуклеарные лейкоциты; НФ – нейтрофильные гранулоциты; ПЛ – плазматические клетки; ФР – физиологический раствор; ИФН-γ – гамма-интерферон, * – достоверные отличия от интактных; # – достоверные отличия от воспаления; & – достоверные отличия от активного контроля (введение ФР); ^ – достоверные отличия от воспаления 16-е сутки (Mann–Whitney U-test, p < 0,05).

Как видно из таблицы 3, на 16-е сутки воспалительного процесса после введения ИФН-гамма в утреннее время пришло к уровню интактного контроля количество мононуклеарных клеток и плазматических клеток, инфильтрирующих эндометрий. Произошло повышение количества нейтрофильных гранулоцитов в ткани слизистой оболочки матки. На 21-е сутки воспалительного процесса все исследованные показатели не отличались от интактного контроля, также как и при воспалении без воздействия.

Влияние утреннего введения ИФН-гамма на клеточный состав лимфатических узлов у самок крыс с моделью эндометрита. Введение ИФН-гамма в 10:00 ч привело к следующим клеточным перестройкам в регионарных к матке лимфатических узлах. В подвздошных лимфоузлах на 16-е сутки снижается процент плазматических клеток и повышается содержание CD8+ лимфоцитов, но снижается процент CD25+ клеток. К 21-м суткам содержание плазматических клеток остается сниженным, процент CD8+ клеток повышается, количество активированных лимфоцитов (CD25+) приходит к уровню интактных животных (таблицы 4 и 5).

Таблица 4 – Процентное содержание CD25+ и CD8+ клеток в лимфоидных органах самок крыс с экспериментальным воспалением внутренних половых органов после введения интерферона-гамма в утреннее время суток (M ± SE)

Орган	Интактные (n = 7)		Воспаление (n = 7)		ФР (n = 7)		ИФН-γ (n = 7)	
	CD25	CD8	CD25	CD8	CD25	CD8	CD25	CD8
16-е сутки								
Подвздошный лимфоузел	6,04 ± 0,20	24,7 ± 1,4	7,68 ± 0,15*	27,3 ± 0,42*	4,94 ± 0,06#	64,3 ± 0,81*#	5,26 ± 0,07#	54,7 ± 0,07*#
Паховый лимфоузел	4,76 ± 0,15	65,13 ± 1,2	5,94 ± 0,06*	47,3 ± 0,4*	6,45 ± 0,09*	41,9 ± 0,38*	4,83 ± 0,04	44,6 ± 0,44*
Парааортальн. лимфоузел	4,63 ± 0,10	20,7 ± 1,03	6,37 ± 0,14*	17,5 ± 1,07*	4,72 ± 0,05#	38,7 ± 0,54*#	3,18 ± 0,05#	42,8 ± 0,06*#
21-е сутки								
Подвздошный лимфоузел	6,04 ± 0,20	24,7 ± 1,4	6,61 ± 0,11	29,33 ± 0,14	4,18 ± 0,03*#	40,1 ± 0,56*#	5,6 ± 0,06	46,4 ± 0,09*#
Паховый лимфоузел	4,76 ± 0,15	65,13 ± 1,2	6,44 ± 0,02*	19,78 ± 0,32*	6,0 ± 0,08*	51,6 ± 0,08*#	4,85 ± 0,06#	50,7 ± 0,32#
Парааортальн. лимфоузел	4,63 ± 0,10	20,7 ± 1,03	5,34 ± 0,11*	22,54 ± 0,84	4,35 ± 0,07#	48,4 ± 0,57*#	5,03 ± 0,04	40,2 ± 0,96*#
Примечание: ФР – введение физиологического р-ра NaCl; γ-IFN – введение ИФН-гамма; * – значение достоверно отличается от интактных животных; # – значение достоверно отличается от группы с воспалением (Mann – Whitney U-test, p < 0,05).								

В паховых лимфоузлах на 16-е сутки происходит повышение содержания плазматических клеток и снижение процента моноцитов/макрофагов. К 21-м суткам эти изменения сохраняются. Количество CD8+ эффекторов не меняется относительно воспаления и находится ниже, чем у интактных крыс. К 21-м суткам процент данных клеток повышается до нормы. Содержание активированных (CD25+) лимфоцитов снижается до нормы и на 16-е, и на 21-е сутки (см. таблицы 4 и 5).

В парааортальных лимфоузлах на 16-е сутки снижается содержание моноцитов, нейтрофильных гранулоцитов и плазматических клеток. На 21-е сутки снижается процент плазматических клеток моноцитов/макрофагов. Процент CD8+ эффекторов повышается на 16-е и остается повышенным к 21-м суткам. Количество активированных лимфоцитов, наоборот, снижается на 16-е сутки до нормы и остается таковым до 21-х суток (см. таблицы 4 и 5).

При этом следует отметить, что количество нейтрофильных гранулоцитов доходит до нуля на 16-е сутки в парааортальном, а на 21-е сутки в парааортальном и подвздошном лимфоузлах. Эту динамику можно интерпретировать как стихание нейтрофильной фазы воспаления и переход к моноклеарной стадии [Маянский Д. Н., 1991].

Таблица 5 – Клеточный состав лимфатических узлов самок крыс на 16-е и 21-е сутки экспериментального воспаления внутренних половых органов после введения интерферона-гамма в утреннее время суток (M ± SE)

Клетки (%)	Воспаление (n = 7)	Введение ФР (n = 7)	Введение ИФН-γ (n = 7)
16-е сутки			
Подвздошный лимфоузел			
Плазматические клетки	12,53 ± 0,45	10,51 ± 0,25	3,7 ± 0,23*
Моноциты /макрофаги	6,62 ± 0,25	7,36 ± 0,71	6,9 ± 0,88
Нейтрофильные гранулоциты	1,08 ± 0,001	0,54 ± 0,001	1,98 ± 0,01*
Паховый лимфоузел			
Плазматические клетки	4,87 ± 1,41	5,52 ± 1,24	9,71 ± 0,18*
Моноциты /макрофаги	8,95 ± 3,14	8,35 ± 2,11	3,47 ± 0,08*
Нейтрофильные гранулоциты	3,65	0,00	2,14 ± 0,05
Парааортальный лимфоузел			
Плазматические клетки	12,98±1,14	14,21±1,12	3,22±1,01*
Моноциты /макрофаги	5,32±0,95	3,28±0,87	0,01±0,004*
Нейтрофильные гранулоциты	0,05	0,00	0,00
21-е сутки			
Подвздошный лимфоузел			

Продолжение таблицы 5

Клетки (%)	Воспаление (n = 7)	Введение ФР (n = 7)	Введение ИФН-γ (n = 7)
Плазматические клетки	10,5 ± 0,85	14,5 ± 0,96	4,7 ± 0,95*
Моноциты /макрофаги	6,7 ± 0,09	5,7 ± 0,07	6,9 ± 0,88
Нейтрофильные гранулоциты	0	0	0
Паховый лимфоузел			
Плазматические клетки	5,8 ± 1,15	4,5 ± 1,05	8,7 ± 0,54*
Моноциты /макрофаги	8,12 ± 1,87	6,9 ± 1,11	4,4 ± 0,03*
Нейтрофильные гранулоциты	0	0	2,1 ± 0,02*
Парааортальный лимфоузел			
Плазматические клетки	14,7 ± 1,74	12,7 ± 1,54	6,2 ± 1,05*
Моноциты /макрофаги	3,2 ± 0,	2,2 ± 0,12	0
Нейтрофильные гранулоциты	0	0	0
Примечание: * – значение достоверно отличается от соответствующего активного контроля (введение физиологического раствора NaCl). Mann – Whitney U-test, p < 0,05.			

Таким образом, эффекты утреннего введения ИФН-гамма заключаются в повышении количества клеток-эффекторов клеточных (в подвздошных и паховых лимфоузлах) и гуморальных (в паховых лимфоузлах) реакций иммунитета и снижении активности нейтрофильной фазы воспаления, которая, однако, не прекращается в паховом лимфоузле и ткани эндометрия.

Влияние вечернего введения ИФН-гамма на показатели воспалительного процесса во внутренних половых органах самок крыс (модель эндометрита). После вечернего введения ИФН-гамма в ткани эндометрия на 16-е сутки снизилось до уровня интактных животных количество мононуклеарных клеток. Количество нейтрофильных гранулоцитов оказалось меньше, чем в группе активного контроля, но выше, чем у интактных крыс. Количество плазматических клеток не отличалось от интактных животных (таблица 6). На 21-е сутки в эндометрии осталась повышенной нейтрофильная инфильтрация, увеличилось количество плазматических клеток в поле зрения.

Итак, вечерние инъекции цитокина в отличие от утренних на 16-е сутки снижают нейтрофильную инфильтрацию тканей эндометрия, а на 21-е сутки увеличивают количество плазматических клеток в слизистой оболочке матки.

Таблица 6 – Лейкоцитарная инфильтрация эндометрия на 16-е и 21-е сутки воспаления после введения ИФН-гамма в вечернее время (количество клеток в поле зрения)

Клетки инфильтрата	Интактные (n = 7)		Воспаление (n = 7)		ФР (n = 7)		ИФН-γ (n = 7)	
	М	SE	М	SE	М	SE	М	SE
16-е сутки								
МНК эндометрия	29,90	4,45	39,6*	1,94	22,73#	1,84	34,14	2,24
НФ эндометрия	15,20	3,98	56,46*	6,27	42,33*	4,84	39,74*&	3,61
ПЛ эндометрия	0,00	0,27	0,20	0,11	0,20*	0,14	0,20	0,09
21-е сутки								
МНК эндометрия	29,90	4,45	35,28	3,04	36,80	4,45	30,11	2,31
НФ эндометрия	15,20	3,98	28,08^	5,00	29,00*	3,98	29,42*	3,24
ПЛ эндометрия	0,00	0,27	0,04	0,04	0,60#	0,27	0,71*#	0,20
Примечание: ФР – введение физиологического раствора; ИФН-γ – введение интерферона-гамма; МНК – мононуклеарные лейкоциты; НФ – нейтрофильные гранулоциты; ПЛ – плазматические клетки; * – достоверные отличия от интактных # – достоверные отличия от воспаления; & – достоверные отличия от активного контроля (введение ФР); ^ – достоверные отличия от воспаления 16-е сутки (Mann – Whitney U-test, p < 0,05).								

Влияние вечернего введения ИФН-гамма на клеточный состав лимфатических узлов у самок крыс с моделью эндометрита. В подвздошных лимфоузлах на 16-е сутки повышается процент моноцитов/макрофагов (таблица 7). Повышается содержание CD8+ эффекторов, которое остается повышенным до 21 суток. Процент активированных CD25+ клеток на 16-е сутки не меняется, а к 21-м суткам возрастает (таблица 8). Процент плазматических клеток не снижается, как это было после утреннего введения цитокина.

В паховых лимфоузлах к 16-м суткам полностью исчезают нейтрофильные гранулоциты, но увеличивается содержание плазматических клеток. На 21-е сутки отмечено повышение процента моноцитов/макрофагов в органе, нейтрофильные гранулоциты отсутствуют. Процент CD8+ клеток на 16-е сутки снижается, а к 21-м суткам возрастает. Процент активированных CD25+ клеток к 21-м суткам возрастает (см. таблицы 7 и 8).

В парааортальных лимфоузлах на 16-е сутки повышается количество плазматических клеток, CD8+ лимфоцитов. Процент CD25+ клеток и моноцитов/макрофагов снижается. Полностью исчезают нейтрофильные гранулоциты. На 21-е сутки в этих органах сохраняется сниженное содержание моноцитов/макрофагов, нейтрофильные гранулоциты отсутствуют (см. таблицы 7 и 8).

Таблица 7 – Клеточный состав лимфатических узлов самок крыс на 16-е и 21-е сутки экспериментального эндометрита после введения интерферона-гамма в вечернее время суток (M ± SE)

Клетки (%)	Воспаление (n = 7)	ФР (n = 7)	ИФН-γ (n = 7)
16-е сутки			
Подвздошный лимфоузел			
Плазматические клетки	12,53 ± 0,45	10,3 ± 1,77	16,3 ± 1,54*
Моноциты /макрофаги	6,62 ± 0,25	6,3 ± 0,95	9,6 ± 0,91*
Нейтрофильные гранулоциты	1,08 ± 0,001	0	1,1 ± 0,02
Паховый лимфоузел			
Плазматические клетки	4,87 ± 1,41	5,6 ± 0,71	12,1 ± 2,07*
Моноциты /макрофаги	8,95 ± 3,14	7,1 ± 0,57	7,7 ± 0,08
Нейтрофильные гранулоциты	3,65	4,2 ± 0,73	0
Парааортальный лимфоузел			
Плазматические клетки	12,98 ± 1,14	10,3 ± 1,45	18,1 ± 2,95
Моноциты /макрофаги	5,32 ± 0,95	2,7 ± 0,03	0
Нейтрофильные гранулоциты	0,05	0	0
21-е сутки			
Подвздошный лимфоузел			
Плазматические клетки	10,5 ± 0,85	11,82 ± 1,21	14,31 ± 1,25
Моноциты /макрофаги	6,7 ± 0,09	4,33 ± 0,58	8,62 ± 0,74*
Нейтрофильные гранулоциты	0	0	0,2 ± 0,02
Паховый лимфоузел			
Плазматические клетки	5,8 ± 1,15	4,81 ± 0,15	6,12 ± 2,14
Моноциты /макрофаги	8,12 ± 1,87	8,25 ± 0,36	12,58 ± 0,11*
Нейтрофильные гранулоциты	0	1,22 ± 0,89	0
Парааортальный лимфоузел			
Плазматические клетки	14,7 ± 1,74	14,31 ± 1,89	16,13 ± 2,85
Моноциты /макрофаги	3,2 ± 0,	0,39 ± 0,02	2,48 ± 0,04*
Нейтрофильные гранулоциты	0	0	0
Примечание: * – значение достоверно (p < 0,05) отличается от соответствующего активного контроля (введение физиологического раствора NaCl). Mann – Whitney U-test, p < 0,05.			

Таблица 8 – Процентное содержание CD25+ и CD8+ клеток в лимфатических узлах самок крыс с экспериментальным воспалением внутренних половых органов после введения интерферона-гамма в вечернее время суток (M ± SE)

Орган	Интактные (n = 7)		Воспаление (n = 7)		ФР (n = 7)		ИФН-γ (n = 7)	
	CD25	CD8	CD25	CD8	CD25	CD8	CD25	CD8
16-е сутки								
Подвздошный лимфоузел	6,04 ± 0,20	24,7 ± 1,4	7,68 ± 0,15	27,3 ± 0,42*	7,01 ± 1,02	48,6 ± 0,07*#	7,19 ± 0,96	38,7 ± 0,35*#
Паховый лимфоузел	4,76 ± 0,15	65,13 ± 1,2	5,94 ± 0,06*	47,31 ± 0,4*	7,25 ± 0,51*#	46,5 ± 0,25*	6,15 ± 0,48*	34,5 ± 0,76*#
Парааортальн. лимфоузел	4,63 ± 0,10	20,7 ± 1,03	6,37 ± 0,14*	17,5 ± 1,07*	3,21 ± 0,39#	42,4 ± 0,94*#	5,40 ± 0,91*#	44,6 ± 0,58*#
21-е сутки								
Подвздошный лимфоузел	6,04 ± 0,20	24,7 ± 1,42	6,61 ± 0,11	29,3 ± 0,14	5,46 ± 0,51	40,1 ± 0,56*#	7,25 ± 1,01#	52,6 ± 0,98*#
Паховый лимфоузел	4,76 ± 0,15	65,13 ± 1,2	6,44 ± 0,02*	19,7 ± 0,32*	4,61 ± 0,05#	51,6 ± 0,08*#	5,43 ± 0,98#*	37,4 ± 0,02*#
Парааортальн. лимфоузел	4,63 ± 0,10	20,7 ± 1,03	5,34 ± 0,11*	22,5 ± 0,84	4,12 ± 0,16#	48,4 ± 0,57*#	5,78 ± 1,07*	41,5 ± 0,72*#
Примечание: ФР – введение физиологического раствора; ИФН-γ – введение интерферона-гамма; * – значение достоверно отличается от интактного контроля, # – значение достоверно отличается от воспаления, \$ – значение достоверно отличается от активного контроля (введение физиологического раствора) (Mann – Whitney U-test, p < 0,05).								

Можно заключить, что вечерний режим применения ИФН-гамма в отличие от утреннего либо не снижает, либо увеличивает количество эффекторов клеточных и гуморальных иммунных реакций (плазматических клеток и CD8+ лимфоцитов) в тканях очага воспаления и регионарных лимфоузлах, а также приводит к более раннему переходу воспаления из нейтрофильной в мононуклеарную стадию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено наличие суточных вариаций количественного состава клеток лимфатических узлов, регионарных к органам репродуктивной системы у интактных самок крыс. При эндометрите выявлен десинхронизм в количественном составе клеток лимфатических узлов. Возможно, что обнаруженная хронобиологическая динамика клеточного состава лимфатических узлов обуславливает различия эффектов ИФН-гамма, применяемого в разное время суток.

Исследование показало, что противовоспалительная и иммуностимулирующая эффективность ИФН-гамма в данной модели зависит от времени его введения. Вечерние инъекции цитокина приводят к полному прекращению нейтрофильной фазы воспаления и повышению количества моноцитов/макрофагов во всех исследованных лимфоузлах к 21-м суткам. В целом течение воспалительного процесса можно считать более благоприятным, чем после утреннего введения ИФН-гамма, когда воспаление снижается, но не полностью ликвидируется, а активация лимфоцитов в паховом и парааортальном лимфоузлах снижается. Возможно, что вклад в различия эффектов разных суточных режимов введения цитокина вносит его хронозависимое действие на макрофагальное звено иммунитета. Утреннее воздействие или не влияет на процент моноцитов, или снижает его (паховые и парааортальные лимфоузлы). После вечернего применения ИФН-гамма происходит повышение количества моноцитов/макрофагов в лимфоузлах. Более выраженное иммуностимулирующее действие вечернего введения ИФН-гамма может быть связано с суточными колебаниями численности макрофагов – его основных клеток-мишеней. В нашем исследовании установлено, что количество моноцитов/макрофагов в вечерние часы повышено в парааортальных лимфатических узлах на 13-е сутки воспаления, т. е. непосредственно перед введением цитокина. В это же время увеличен процент Т-эффекторов (CD8+) в подвздошных лимфоузлах, которые также являются мишенью интерферона-гамма, регулирующего их цитолитическую активность.

Таким образом, в настоящей работе показано, что при экспериментальном эндометрите у крыс вечернее применение ИФН-гамма – режим, который имитирует нормальный суточный ритм эндогенной продукции данного фактора и совпадает с повышенным количеством моноцитов/макрофагов и Т-эффекторов (CD8+ лимфоциты) в лимфатических узлах – приводит к более раннему прекращению нейтрофильной фазы воспаления, а также сохранению численности клеток-эффекторов клеточного и гуморального иммунитета и поддержанию активированного состояния лимфоцитов в регионарных лимфоузлах. Эти результаты могут рассматриваться как основание для оптимизации режимов применения цитокина в лечебных целях.

ВЫВОДЫ

1. У интактных самок крыс обнаружены суточные вариации количественного состава клеток лимфатических узлов, регионарных к органам репродуктивной системы. В утреннее время по сравнению с вечерним во всех лимфоузлах было повышено процентное содержание средних лимфоцитов. В парааортальном лимфоузле вечером было повышено содержание малых лимфоцитов. Во всех лимфоузлах вечером было повышено содержание Т-эффекторов/киллеров в паховых и парааортальных лимфоузлах – моноцитов/макрофагов.

2. При эндометрите выявлен десинхронизм в количественном составе клеток лимфатических узлов: а) инвертируются суточные колебания для малых лимфоцитов и CD8+

клеток в парааортальных лимфоузлах, CD8+ клеток в паховых лимфоузлах, средних лимфоцитов в подвздошных лимфоузлах; б) исчезают суточные вариации средних и малых лимфоцитов в парааортальных лимфоузлах, средних лимфоцитов и моноцитов/макрофагов в паховых лимфоузлах; в) появляются суточные вариации CD25+лимфоцитов в парааортальных лимфоузлах, больших и малых лимфоцитов в паховых лимфоузлах, больших лимфоцитов и моноцитов/макрофагов в подвздошных лимфоузлах.

3. У интактных самок крыс показано хронозависимое влияние ИФН-гамма на клеточный состав лимфатических узлов с преобладанием эффекта при введении в вечернее время. Утреннее воздействие не изменило соотношения различных типов лимфоцитов во всех лимфатических узлах. Введение ИФН-гамма в вечернее время повысило процент CD25+ клеток в парааортальном лимфоузле и CD8+ лимфоцитов в паховом лимфоузле.

4. При эндометрите введение интерферона-гамма в вечернее время суток, в отличие утреннего, повышает количество плазматических клеток в эндометрии и регионарных к матке лимфоузлах, CD8+ лимфоцитов (Т-эффекторов-киллеров) в регионарных к матке лимфоузлах и обеспечивает более ранний переход воспаления из нейтрофильной в моноклеарную фазу.

5. Хроноэффективность ИФН-гамма связана с преобладанием клеток-мишеней для цитокина во время его введения. И у интактных крыс, и в модели эндометрита интерферон-гамма оказал более выраженное иммуностимулирующее и противовоспалительное действие (снижение содержания нейтрофильных гранулоцитов, повышение процента моноцитов/макрофагов, повышение содержания CD8+ лимфоцитов в лимфатических узлах, повышение содержания плазматических клеток в лимфатических узлах и эндометрии) при введении в вечернее время, когда было увеличено количество его клеток-мишеней – макрофагов и CD8+ эффекторов/киллеров в лимфоузлах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние различных суточных режимов введения гамма-интерферона на клеточный состав лимфоидных органов самок крыс с экспериментальным хроническим воспалением внутренних половых органов / А. В. Шурлыгина, Т. И. Дергачева, И. Г. Ковшик [и др., в том числе **А. М. Абдалова**] // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.** – 2008. – Т. 28, № 5. – С. 61–66.

2. Клеточный состав лимфоидных органов крыс-самок с экспериментальным острым воспалением внутренних половых органов после введения интерферона-у в разных суточных режимах / А. В. Шурлыгина, Т. И. Дергачева, И. Г. Ковшик [и др., в том числе **А. М. Абдалова**] // **Иммунология.** – 2008. – Т. 29, № 2. – С. 114–116.

3. Хроноэффективность экзогенных цитокинов / А. В. Шурлыгина, Г. И. Литвиненко, Т. И. Дергачева [и др., в том числе **А. М. Абдалова**] // **Российский иммунологический журнал.** – 2008. – Т. 2 (11), № 2–3. С. – 138–139.

4. Сравнительная оценка клеточного состава лейкоцитарного инфильтрата тканей матки и влагалища у крыс с экспериментальным эндомиометритом после введения интерферона- γ в разное время суток / Т. И. Дергачева, А. В. Шурлыгина, **А. М. Абдалова** [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2020. – Т. 169, № 4. – С. 504–508.

5. Суточные вариации клеточного состава лимфоидных органов у крыс с экспериментальным эндомиометритом / **А. М. Абдалова**, А. В. Шурлыгина, Т. И. Дергачева [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2020. – Т. 169, № 6. – С. 682–686.

6. Comparative Assessment of Leukocyte Infiltrate Composition in the Uterine and Vaginal Tissues in Rats with Experimental Endomyometritis Treated with Interferon- γ at Different Times of the Day / T. I. Dergacheva, A. V. Shurlygina, **A. M. Abdalova** [et al.] // **Bull Exp Biol Med**. – 2020. – V. 169. – P. 516–520. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04921-7>

7. Клеточный состав подвздошных лимфатических узлов самок крыс с экспериментальным хроническим воспалением внутренних половых органов под влиянием хроноиммунокоррекции интерфероном-гамма / А. В. Шурлыгина, Т. И. Дергачева, И. Г. Ковшик [и др., в том числе **А. М. Абдалова**] // Сибирский Консилиум. – 2007. – № 7. – С. 90–91.

8. Inflammation is associated with desynchronization in the immune system (experimental study) / **A. M. Abdalova**, A. V., Shurlygina, T. I. Dergacheva [et al.] // The Twelfth International Multiconference; Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk : ICG SB RAS, 2020. – P. 398–399.

9. Хронотерапия острого воспаления интерфероном-гамма // **А. М. Абдалова**, Т. И. Дергачева, А. В. Шурлыгина [и др.] // **Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов : материалы 9-й Всероссийской научно-практической конференции**. – Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2020. – С. 24–25.