

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ КОРРЕКЦИИ АКЦИДЕНТАЛЬНОЙ ИНВОЛЮЦИИ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ



Тешаев Шухрат Жумаевич, Тоиров Ойбек Алиевич

Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

СУРУНКАЛИ МИКОБАКТЕРИАЛ ТАЪСИР ШАРОИТИДА АЙРИСИМОН БЕЗНИНГ АКЦИДЕНТАЛ ИНВОЛЮЦИЯСИНИ ИММУНОМОДУЛЯЦИОН КОРРЕКЦИЯЛАШНИНГ МОРФОЛОГИК АСОСЛАРИ

Тешаев Шухрат Жумаевич, Тоиров Ойбек Алиевич

Бухоро давлат тиббиёт институти, Ўзбекистон Республикаси, Бухоро ш.

MORPHOLOGICAL RATIONALE FOR THE IMMUNOMODULATORY CORRECTION OF ACCIDENTAL INVOLUTION OF THE THYMUS UNDER CHRONIC MYCOBACTERIAL EXPOSURE

Teshayev Shuhrat Jumayevich, Toirov Oybek Alievich

Bukhara State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Bukhara

e-mail: info@bdti.uz

Резюме. Долзарблиги. Сурункали микобактериал таъсир шароитида айрисимон безнинг акцидентал инволюцияси потенциал қайтувчи жараён ҳисобланади, аммо унинг иммуномодуляцион коррекциясининг морфологик асослари етарлича ўрганилмаган. Тадқиқот мақсади - сурункали микобактериал таъсир шароитида оқ зотсиз каламушлар айрисимон безининг акцидентал инволюциясини иммуномодуляцион коррекциялашга морфологик асос бериш. Материал ва усуллар. Тадқиқот 30 та оқ зотсиз каламушда (назорат, тажриба, коррекция) ўтказилди; сурункали таъсир сўндирилган *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra микобактериялари сақловчи Фрейнднинг тўлиқсиз адъювантини бир марта тери остига юбориш (0,2 мл) орқали моделлаштирилди, коррекция гуруҳида қўшимча иммуномодулятор юборилди. Гематоксин-эозин ва Ван-Гизон бўйича бўйш, морфометрия, ярим миқдорий баҳолаш ва вариацион статистика қўлланилди. Натижалар. Тажриба гуруҳида пўстлоқ-магиз индекси ва тимоцитлар зичлигининг пасайиши, Гассал таначалари сони ва апоптоз индексининг ошиши аниқланди; коррекция гуруҳида барча кўрсаткичлар назорат қийматларига қараб қисман тикланди. Хулосалар. Иммуномодуляцион коррекция айрисимон безнинг қисман морфологик тикланишини таъминлайди, ажратилган миқдорий мезонлар эса унинг самарадорлигини ҳолисона баҳолашга имкон беради.

Калим сўзлар: айрисимон без, тимус, акцидентал инволюция, пўстлоқ-магиз индекси, Гассал таначалари, апоптоз, иммуномодулятор, коррекция, микобактериялар, морфология.

Abstract. Relevance. Accidental involution of the thymus under chronic mycobacterial exposure is a potentially reversible process, yet the morphological rationale for its immunomodulatory correction remains insufficiently studied. Aim. To provide a morphological rationale for the immunomodulatory correction of accidental involution of the thymus of white outbred rats under experimental chronic mycobacterial exposure. Material and methods. The study was performed on 30 white outbred rats (control, experimental, correction); chronic exposure was modelled by a single subcutaneous injection of incomplete Freund's adjuvant containing inactivated *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (0.2 ml), with an additional immunomodulator in the correction group. Haematoxylin-eosin and van Gieson staining, morphometry, semi-quantitative scoring and variation statistics were used. Results. In the experimental group the cortico-medullary index and thymocyte density decreased while the number of Hassall's corpuscles and the apoptotic index increased; in the correction group all indices showed a partial recovery towards control values. Conclusions. Immunomodulatory correction provides a partial morphological restoration of the thymus, and the identified quantitative criteria allow an objective assessment of its efficacy.

Key words: thymus, accidental involution, cortico-medullary index, Hassall's corpuscles, apoptosis, immunomodulator, correction, mycobacteria, morphology.

Введение. Вилочковая железа (тимус) представляет собой центральный орган Т-клеточного иммунитета, в котором происходят генерация, дифференцировка и селекция Т-лимфоцитов [1, 2]. Морфофункциональное состояние тимуса определяет эффективность клеточного иммунного ответа, поэтому его поражение при инфекционных процессах приобретает особое значение. Регуляция органа тесно связана с нейроэндокринной системой: гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси, прежде всего глюкокортикоиды, оказывают выраженное влияние на тимопоэз и определяют развитие стресс-индуцированных изменений [3].

Тимус чрезвычайно чувствителен к стрессовым и инфекционным воздействиям, при которых в нём развивается акцидентальная (стресс-индуцированная) инволюция - истощение коркового вещества, апоптоз тимоцитов и относительное расширение мозгового вещества [4]. Ведущим механизмом этого процесса является глюкокортикоид-опосредованный апоптоз тимоцитов [6], реализуемый на фоне цитокин-зависимой активации ГГН-оси при инфекции и воспалении [7, 8]. Тимус рассматривается как общий орган-мишень при инфекционных заболеваниях [4].

Микобактериальные компоненты способны воздействовать на тимус как опосредованно, так и напрямую. Микобактериальный корд-фактор (трегалозо-6,6'-димиколат) индуцирует апоптоз тимоцитов *in vivo*, а при более высоком уровне воздействия вызывает образование гранулём и атрофию тимуса [9, 10]. Диссеминированная инфекция *Mycobacterium avium* сопровождается выраженной атрофией органа, опосредованной определёнными молекулярно-клеточными механизмами, в том числе интерферон- γ - и iNOS-зависимыми путями [11, 12]. Полный и неполный адьюванты Фрейнда, содержащие микобактериальные компоненты, служат воспроизводимым инструментом моделирования хронической иммуностимуляции [17].

Принципиально важно, что акцидентальная инволюция тимуса является потенциально обратимым процессом. Показано, что после прекращения стрессорного воздействия развиваются механизмы восстановления органа [5], а системная иммуностимуляция вызывает глюкокортикоид-опосредованную инволюцию, сменяющуюся ребаунд-гиперплазией [13]. Активно изучаются стратегии восстановления тимопоэза, включая факторы регенерации тимического эпителия [14], интерлейкин-7 [15] и кератиноцитарный фактор роста (KGF) [16]. В клинической практике всё большее внимание уделяется иммуномодулирующей (хост-направленной) терапии микобактери-

альной инфекции как средству поддержки иммунного ответа и снижения органных повреждений [18, 19].

Вместе с тем морфологическое обоснование иммуномодулирующей коррекции акцидентальной инволюции тимуса при хроническом микобактериальном воздействии остаётся недостаточно изученным, а количественная оценка восстановления структуры органа на фоне коррекции практически не проводилась [20]. Это определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования. Дать морфологическое обоснование иммуномодулирующей коррекции акцидентальной инволюции вилочковой железы белых беспородных крыс в условиях экспериментального хронического микобактериального воздействия.

Материал и методы исследования. Эксперимент выполнен на 30 белых беспородных половозрелых крысах-самцах, распределённых на три равные группы. Исходно использовали животных в возрасте 2 месяцев (что по биологическому возрасту соответствует 18–25 годам человека) с массой тела 230–260 г; воздействие продолжалось в течение 2 месяцев, по завершении которого исследовали животных в возрасте 4 месяцев (соответствует 25–30 годам человека) с массой тела 300–350 г. Выбор данного возрастного периода обусловлен максимальной иммунной реактивностью молодого половозрелого организма.

Для моделирования хронического микобактериального воздействия применяли неполный адьювант Фрейнда (НАФ), содержащий инактивированные (убитые) микобактерии *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Схема введения: однократная подкожная инъекция в область крестца; объём введения - 0,2 мл на каждое животное. Животным группы коррекции наряду с НАФ вводили иммуномодулятор по стандартной схеме. Содержание животных и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с международными стандартами работы с лабораторными животными (GLP, Directive 2010/63/EU) (табл. 1).

По завершении сроков наблюдения животных подвергали декапитации под высокой дозой эфирного наркоза. Для исследования забирали вилочковую железу целиком; орган взвешивали и рассчитывали относительную массу. Полученный материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине в течение 24–48 часов с последующей стандартной гистологической проводкой, изготовлением парафиновых блоков и приготовлением срезов толщиной 4–5 мкм.

Таблица 1. Дизайн эксперимента и характеристика групп

Группа	Возраст / масса тела	Воздействие	Изучаемый эффект
Контрольная (интактные)	4 мес / 300–350 г	-	Физиологическая норма
Опытная	2 → 4 мес / 230–260 → 300–350 г	НАФ с <i>M. tuberculosis</i> H37Ra; п/к, 0,2 мл	Акцидентальная инволюция тимуса
Коррекция	4 мес / 300–350 г	НАФ + иммуномодулятор	Морфологическое восстановление органа

В отделении патогистологии симуляционного центра Бухарского государственного медицинского института из фрагментов вилочковой железы изготавливали парафиновые блоки, из которых на микротоме получали срезы толщиной 5–6 мкм. Применяли окраску гематоксилином-эозином (Г-Э) - для оценки общей архитектоники, соотношения коркового и мозгового вещества, плотности тимоцитов и телец Гассаля, а также окраску по Ван-Гизону - для оценки соединительнотканного компонента. Готовые препараты изучали под тринокулярным микроскопом и фотографировали.

Морфометрическую оценку выполняли с определением кортико-медуллярного индекса (отношение площади коркового вещества к площади мозгового), плотности тимоцитов в корковом веществе, числа телец Гассаля на стандартный срез и индекса апоптоза тимоцитов. Дополнительно четыре качественных гистологических признака оценивали полуквантитативно по четырёхбалльной шкале (0 - отсутствует, 1 - слабо, 2 - умеренно, 3 - выражено). Статистическую обработку полученного материала проводили традиционными методами вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel; при

организации и проведении исследования использовали принципы доказательной медицины.

Результаты исследования. В контрольной группе вилочковая железа имела типичное дольчатое строение с широким корковым веществом, богатым плотно расположенными тимоцитами, и относительно узким мозговым веществом с единичными тельцами Гассаля; граница между корковым и мозговым веществом была отчётливой (рис. 1).

В опытной группе развивалась выраженная акцидентальная инволюция: резкое истончение коркового вещества с «просветлением» коркового слоя, глубокий апоптоз тимоцитов, снижение их плотности, стирание кортико-медуллярной границы, относительное расширение мозгового вещества и увеличение числа телец Гассаля; отмечался периваскулярный отёк. В группе коррекции морфологическая картина занимала промежуточное положение: корковое вещество было шире, чем в опытной группе, плотность тимоцитов частично восстанавливалась, кортико-медуллярная граница становилась более различимой, а число телец Гассаля и выраженность апоптоза уменьшались, приближаясь к контрольным значениям (рис. 2).



Рис. 1. Схема патогенеза акцидентальной инволюции вилочковой железы и её иммуномодулирующей коррекции

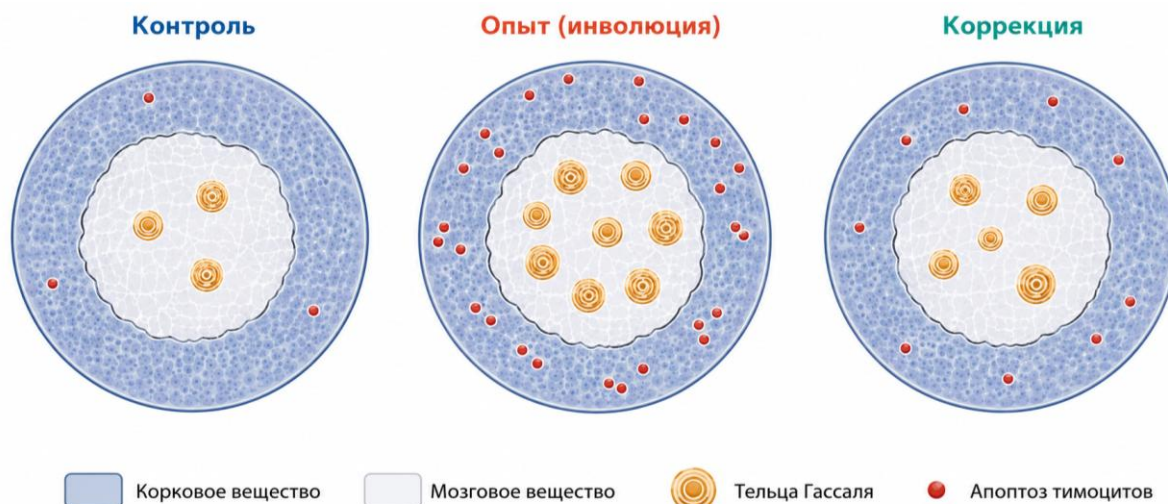
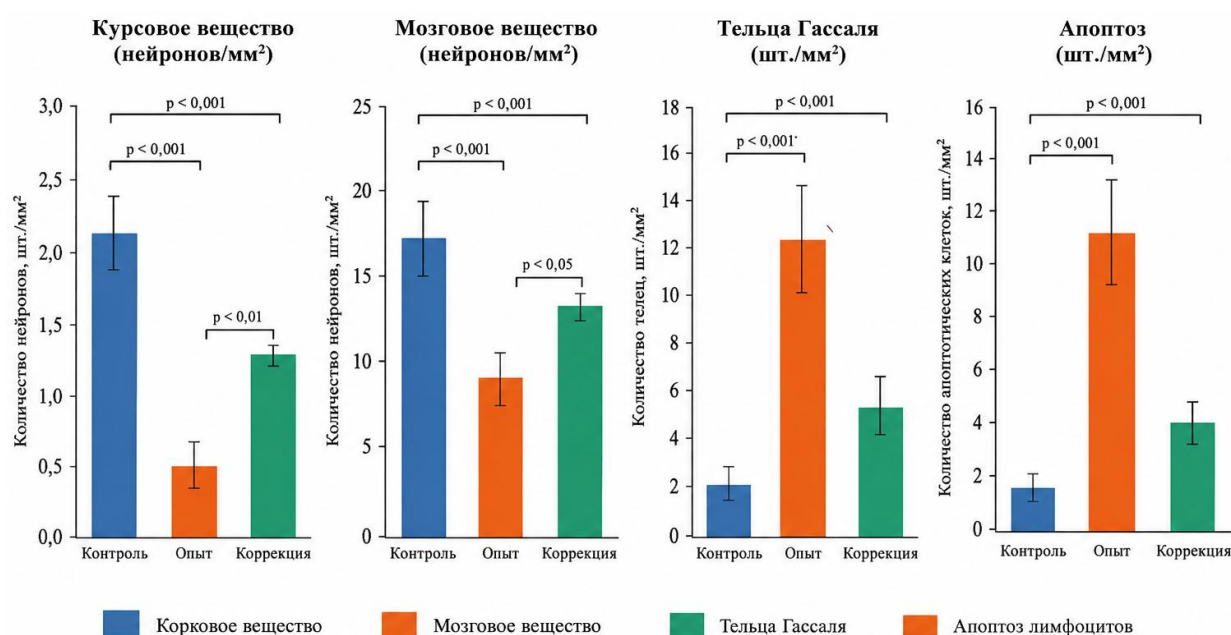


Рис. 2. Сравнительная структурная организация вилочковой железы в контрольной, опытной группах и группе коррекции



Примечание: Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с пост-хок тестом Тьюки. $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Рис. 3. Морфометрические показатели вилочковой железы в трёх группах (среднее $\pm$ SD; *** - $p < 0,001$ относительно контроля; † - $p < 0,05$ относительно опытной группы)

Таблица 2. Полуколичественная оценка гистологических признаков вилочковой железы (баллы 0–3)

Признак	Контроль	Опыт	Коррекция
Истощение коркового вещества	0	3	1
Апоптоз тимоцитов	0	2	1
Увеличение числа телец Гассалья	1	3	2
Периваскулярный отёк	0	2	1
Расширение мозгового вещества	0	3	1

Количественная оценка подтвердила направленность выявленных изменений и эффект коррекции. В опытной группе кортико-медулярный индекс и плотность тимоцитов коркового вещества резко снижались, тогда как число телец Гассалья и индекс апоптоза возрастали; в

группе коррекции все показатели демонстрировали отчётливое, хотя и неполное, восстановление в сторону контрольных значений. Результаты морфометрической оценки представлены на диаграмме (рис. 3).

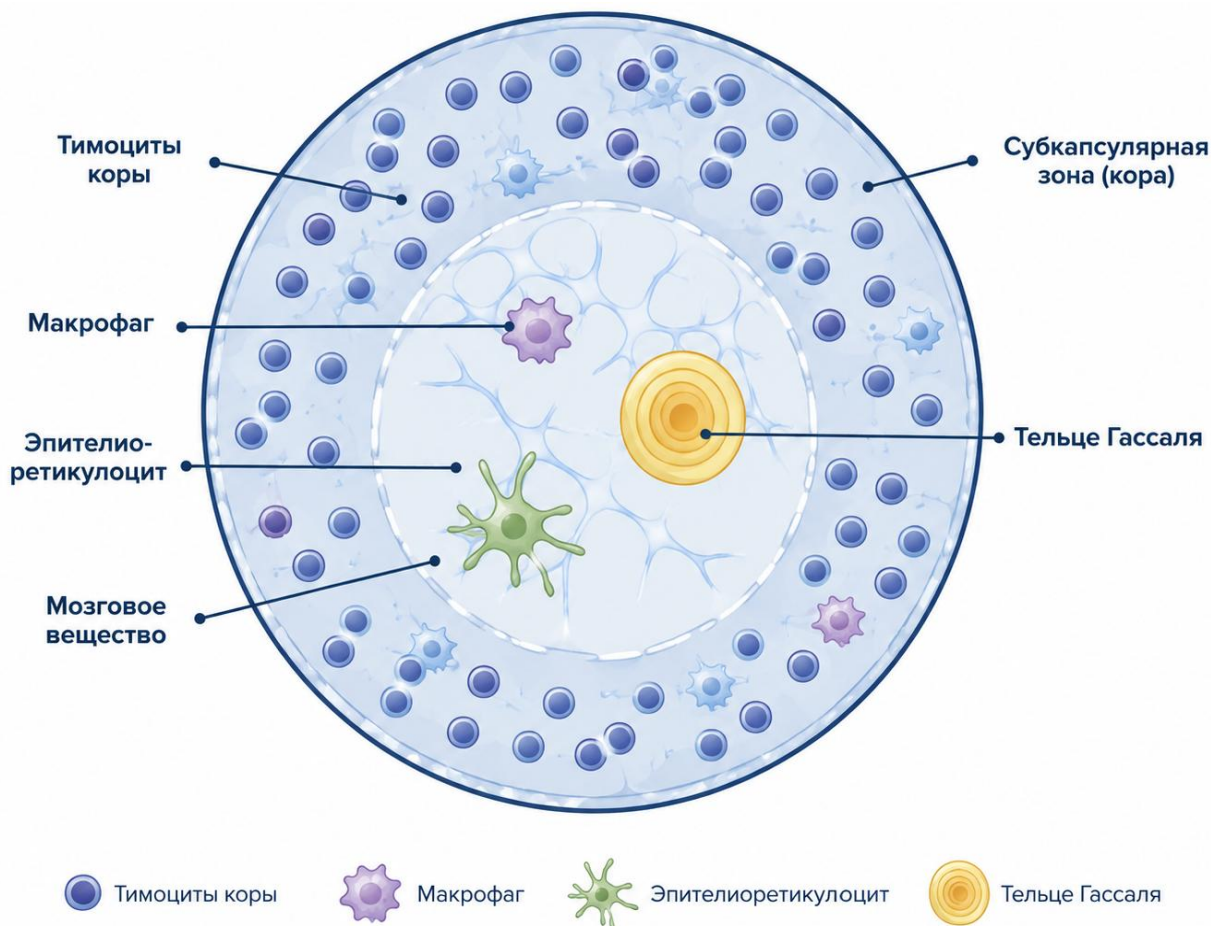


Рис. 4. Схема структурно-функциональных зон вилочковой железы

Полуколичественная оценка качественных гистологических признаков показала ту же закономерность: максимальная выраженность инволюционных изменений в опытной группе и их частичный регресс на фоне коррекции (табл. 2).

Для наглядного представления структурно-клеточной организации органа, к которой стремится процесс восстановления, на рисунке 4 приведена схема микроокружения дольки вилочковой железы в норме с указанием основных компонентов - субкапсулярной зоны и коркового вещества с тимоцитами, мозгового вещества, телец Гассалья, эпителиоретикулоцитов и макрофагов.

Обсуждение. Полученные данные подтверждают, что хроническое микобактериальное воздействие вызывает в вилочковой железе закономерную акцидентальную инволюцию, а применение иммуномодулятора обеспечивает частичное морфологическое восстановление органа. Инволюционные изменения - истощение коры, апоптоз тимоцитов, увеличение числа телец Гассалья и снижение кортико-медулярного индекса - соответствуют классической картине стресс-индуцированной инволюции [4] и роли глюкокортикоидов как основного индуктора апоптоза тимоцитов [6] на фоне цитокин-зависимой активации ГГН-оси [7, 8].

Ключевым результатом является демонстрация обратимости этих изменений. Восстановление кортико-медулярного индекса и плотности тимоцитов, а также уменьшение выраженности апоптоза в группе коррекции согласуются с представлением об акцидентальной инволюции как о потенциально обратимом процессе [5] и с данными о смене инволюции ребаунд-гиперплазией после прекращения иммуностимуляции [13]. Морфологический эффект коррекции можно рассматривать в контексте механизмов регенерации тимуса, включающих восстановление тимического эпителия и действие ростовых факторов [14, 15, 16]; при этом сохранение промежуточных значений показателей указывает на неполное восстановление в использованные сроки наблюдения.

Полученные результаты имеют практическое значение в свете развития иммуномодулирующей (хост-направленной) терапии микобактериальной инфекции [18, 19]. Морфологические критерии восстановления тимуса - кортико-медулярный индекс, плотность тимоцитов, число телец Гассалья и индекс апоптоза - могут служить объективными показателями эффективности такой терапии. Сопоставление с экспериментальными морфометрическими исследованиями иммунных органов при системном воспалении [20] подтверждает адекватность использованных под-

ходов. Ограничением работы являются описание единственного срока наблюдения, полуколичественный характер части оценок и отсутствие гормональных и иммуногистохимических измерений, необходимых для установления причинно-следственных связей; это определяет направления дальнейших исследований.

Хроническое микобактериальное воздействие приводит к акцидентальной инволюции вилочковой железы, морфологически проявляющейся истощением коркового вещества, апоптозом тимоцитов, увеличением числа телец Гассалья и снижением кортико-медулярного индекса. Применение иммуномодулятора обеспечивает частичное восстановление структуры органа с приближением морфометрических показателей к контрольным значениям. Выделенные количественные и полуколичественные критерии дают морфологическое обоснование иммуномодулирующей коррекции и могут использоваться для оценки её эффективности при хронической микобактериальной патологии.

Выводы:

1. Хроническое микобактериальное воздействие вызывает акцидентальную инволюцию вилочковой железы с резким снижением кортико-медулярного индекса и плотности тимоцитов коркового вещества, что отражает глюкокортикоид-опосредованное угнетение тимопоэза.

2. Увеличение числа телец Гассалья и индекса апоптоза тимоцитов является морфологическим маркёром выраженности инволюционных изменений органа.

3. Применение иммуномодулятора обеспечивает частичное восстановление структуры вилочковой железы: кортико-медулярный индекс и плотность тимоцитов возрастают, а число телец Гассалья и индекс апоптоза снижаются, приближаясь к контрольным значениям.

4. Кортико-медулярный индекс, плотность тимоцитов, число телец Гассалья и индекс апоптоза представляют собой информативные морфологические критерии оценки эффективности иммуномодулирующей коррекции акцидентальной инволюции тимуса.

Литература:

1. Alpdogan O., Hubbard V.M., Smith O.M. et al. Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration // *Blood*. 2006. Vol. 107, № 6. P. 2453–2460. doi: 10.1182/blood-2005-07-2831.
2. Ansari A.R., Liu H. Acute thymic involution and mechanisms for recovery // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2017. Vol. 65, № 5. P. 401–420. doi: 10.1007/s00005-017-0462-x.
3. Ashby K.M., Hogquist K.A. A guide to thymic selection of T cells // *Nature Reviews Immunology*.

2024. Vol. 24, № 2. P. 103–117. doi: 10.1038/s41577-023-00911-8.
4. Barreira-Silva P., Melo-Miranda R., Nobrega C. et al. IFN γ - and iNOS-mediated alterations in the bone marrow and thymus and its impact on *Mycobacterium avium*-induced thymic atrophy // *Frontiers in Immunology*. 2021. Vol. 12. Article 696415. doi: 10.3389/fimmu.2021.696415.
5. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases // *Journal of Leukocyte Biology*. 2001. Vol. 70, № 6. P. 849–860. doi: 10.1189/jlb.70.6.849.
6. Borges M., Barreira-Silva P., Flórido M., Jordan M.B., Correia-Neves M., Appelberg R. Molecular and cellular mechanisms of *Mycobacterium avium*-induced thymic atrophy // *The Journal of Immunology*. 2012. Vol. 189, № 7. P. 3600–3608. doi: 10.4049/jimmunol.1201525.
7. Chaudhry M.S., Velardi E., Dudakov J.A., van den Brink M.R.M. Thymus: the next (re)generation // *Immunological Reviews*. 2016. Vol. 271, № 1. P. 56–71. doi: 10.1111/imr.12418.
8. Collins C.P., Khuat L.T., Sckisel G.D. et al. Systemic immunostimulation induces glucocorticoid-mediated thymic involution succeeded by rebound hyperplasia which is impaired in aged recipients // *Frontiers in Immunology*. 2024. Vol. 15. Article 1429912. doi: 10.3389/fimmu.2024.1429912.
9. Dzhililova D.S. et al. Morphological characteristics of the thymus and spleen and the subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia // *International Journal of Inflammation*. 2019. Vol. 2019. Article 7584685. doi: 10.1155/2019/7584685.
10. Hamasaki N., Isowa K., Kamada K. et al. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits // *Infection and Immunity*. 2000. Vol. 68, № 6. P. 3704–3709. doi: 10.1128/IAI.68.6.3704-3709.2000.
11. Harbuz M.S., Rees R.G., Eckland D. et al. Paradoxical responses of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) messenger ribonucleic acid (mRNA) and CRF-41 peptide and adenohipophysial proopiomelanocortin mRNA during chronic inflammatory stress // *Endocrinology*. 1992. Vol. 130, № 3. P. 1394–1400. doi: 10.1210/endo.130.3.1537299.
12. Klein L., Kyewski B., Allen P.M., Hogquist K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see) // *Nature Reviews Immunology*. 2014. Vol. 14, № 6. P. 377–391. doi: 10.1038/nri3667.
13. Mackall C.L., Fry T.J., Gress R.E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application // *Nature Reviews Immunology*. 2011. Vol. 11, № 5. P. 330–342. doi: 10.1038/nri2970.

- 14.Ozeki Y., Kaneda K., Fujiwara N. et al. In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) // *Infection and Immunity*. 1997. Vol. 65, № 5. P. 1793–1799. doi: 10.1128/IAI.65.5.1793-1799.1997.
- 15.Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology // *Endocrine Reviews*. 2000. Vol. 21, № 4. P. 412–443. doi: 10.1210/edrv.21.4.0402.
- 16.Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases // *PLoS Pathogens*. 2006. Vol. 2, № 6. Article e62. doi: 10.1371/journal.ppat.0020062.
- 17.Silverman M.N., Sternberg E.M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012. Vol. 1261. P. 55–63. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x.
- 18.Wallis R.S., Hafner R. Advancing host-directed therapy for tuberculosis // *Nature Reviews Immunology*. 2015. Vol. 15, № 4. P. 255–263. doi: 10.1038/nri3813.
- 19.Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation // *Nature*. 1980. Vol. 284, № 5756. P. 555–556. doi: 10.1038/284555a0.
- 20.Zumla A., Rao M., Dodoo E., Maeurer M. Potential of immunomodulatory agents as adjunct host-directed therapies for multidrug-resistant tuberculosis // *BMC Medicine*. 2016. Vol. 14. Article 89. doi: 10.1186/s12916-016-0635-1.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА И ИММУНО-МОДУЛИРУЮЩАЯ КОРРЕКЦИЯ АКЦИДЕНТАЛЬНОЙ ИНВОЛЮЦИИ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Тешаев Ш.Ж., Тоуров О.А.

Резюме. Актуальность. Акцидентальная инволюция вилочковой железы при хроническом микобактериальном воздействии является потенциально обратимым процессом, однако морфологическое обоснование её иммуномодулирующей коррекции изучено недостаточно. Цель исследования - дать морфологическое обоснование иммуномодулирующей коррекции акцидентальной инволюции вилочковой железы белых беспородных крыс в условиях экспериментального хронического микобактериального воздействия. Материал и методы. Исследование проведено на 30 белых беспородных крысах (контроль, опыт, коррекция); хроническое воздействие моделировали однократным подкожным введением неполного адьюванта Фрейнда с инактивированными микобактериями *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* (0,2 мл), в группе коррекции дополнительно вводили иммуномодулятор. Применяли окраску гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону, морфометрию, полуколичественную оценку и вариационную статистику. Результаты. В опытной группе установлены снижение кортико-медулярного индекса и плотности тимоцитов, увеличение числа телец Гассалья и индекса апоптоза; в группе коррекции все показатели демонстрировали частичное восстановление в сторону контрольных значений. Выводы. Иммуномодулирующая коррекция обеспечивает частичное морфологическое восстановление вилочковой железы, а выделенные количественные критерии позволяют объективно оценивать её эффективность.

Ключевые слова: вилочковая железа, тимус, акцидентальная инволюция, кортико-медулярный индекс, тельца Гассалья, апоптоз, иммуномодулятор, коррекция, микобактерии, морфология.