

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ КОРРЕКЦИЯ РЕАКТИВНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ СЕЛЕЗЁНКИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ



Тоиров Ойбек Алиевич, Тешаев Шухрат Жумаевич

Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

СУРУНКАЛИ МИКОБАКТЕРИАЛ ТАЪСИР ШАРОИТИДА ТАЛОҚНИНГ РЕАКТИВ ҚАЙТА ҚУРИЛИШИ МОРФОЛОГИК ДИНАМИКАСИ ВА ИММУНОМОДУЛЯЦИОН КОРРЕКЦИЯСИ

Тоиров Ойбек Алиевич, Тешаев Шухрат Жумаевич

Бухоро давлат тиббиёт институти, Ўзбекистон Республикаси, Бухоро ш.

MORPHOLOGICAL DYNAMICS AND IMMUNOMODULATORY CORRECTION OF THE REACTIVE REORGANIZATION OF THE SPLEEN UNDER CHRONIC MYCOBACTERIAL EXPOSURE

Toirov Oybek Alievich, Teshayev Shuhrat Jumayevich

Bukhara State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Bukhara

e-mail: info@bdti.uz

Резюме. Долзарблиги. Сурункали микобактериал таъсир шароитида талоқнинг реактив қайта қурилиши узоқ давом этганда лимфоид тўқиманинг емирилиши билан алмашилиши мумкин, аммо унинг иммуномодуляцион коррекцияси имконияти етарлича ўрганилмаган. Тадқиқот мақсади - сурункали микобактериал таъсир шароитида оқ зотсиз каламушлар талогининг реактив қайта қурилиши морфологик динамикасини ўрганиш ва уни иммуномодуляцион коррекциялаш имкониятини баҳолаш. 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 бўйиш, морфометрия, ярим миқдорий баҳолаш ва вариацион статистика қўлланилди. Натижалар. Тажриба гуруҳида оқ пульпа майдони, фаол герминатив марказлар улуши, ПАЛМ ва чекка зона индексларининг ошиши, шунингдек қизил пульпанинг макрофагал реакцияси аниқланди; коррекция гуруҳида барча кўрсаткичлар назорат қийматларига қараб қисман меъёрлашди. Хулосалар. Иммуномодуляцион коррекция талоқнинг қисман морфологик меъёрлашувини таъминлайди, ажратилган миқдорий мезонлар эса унинг самарадорлигини холисона баҳолашга имкон беради.

Калим сўзлар: талоқ, оқ пульпа, қизил пульпа, герминатив марказ, периартериал лимфоид муфталар, макрофагал реакция, иммуномодулятор, коррекция, микобактериялар, морфология.

Abstract. Relevance. Reactive reorganization of the spleen under chronic mycobacterial exposure may, if prolonged, be succeeded by exhaustion of the lymphoid tissue, yet the possibility of its immunomodulatory correction remains insufficiently studied. Aim. To study the morphological dynamics of the reactive reorganization of the spleen of white outbred rats and to assess the possibility of its immunomodulatory correction 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, semiquantitative scoring and variation statistics were used. Results. In the experimental group the white pulp area, the proportion of active germinal centres, and the PALS and marginal-zone indices increased, together with a macrophage reaction of the red pulp; in the correction group all indices showed a partial normalization towards control values. Conclusions. Immunomodulatory correction provides a partial morphological normalization of the spleen, and the identified quantitative criteria allow an objective assessment of its efficacy.

Key words: spleen, white pulp, red pulp, germinal centre, periarterial lymphoid sheaths, macrophage reaction, immunomodulator, correction, mycobacteria, morphology.

Введение. Селезёнка является крупнейшим периферическим органом иммунной системы, обеспечивающим фильтрацию крови, презентацию антигена и координацию клеточного и гуморального иммунного ответа. Её структурно-функциональная организация включает белую пульпу (периартериальные лимфоидные муфты, лимфоидные фолликулы с герминативными центрами и краевую зону) и красную пульпу, выполняющую фильтрационно-фагоцитарную функцию [1, 2, 3]. Морфологическая организация органа тесно связана с его функциональной активностью и динамически перестраивается при антигенной стимуляции [4].

Реакция селезёнки на антигенное воздействие реализуется в виде реактивной гиперплазии белой пульпы, активации герминативных центров и усиления макрофагальной реакции красной пульпы. Формирование и функционирование герминативных центров лежит в основе гуморального ответа, аффинного созревания и образования плазматических клеток и клеток памяти [5], а популяции макрофагов краевой зоны и красной пульпы реализуют захват антигена и фагоцитоз [6]. При микобактериальной инфекции периферические лимфоидные органы становятся ареной интенсивного иммунного ответа, в котором участвуют антиген-специфические В-клетки и фолликулярные хелперы [7].

Хроническое микобактериальное воздействие представляет собой классическую модель системной иммуностимуляции. Оно сопровождается активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и продукцией провоспалительных цитокинов [8, 9], а неполный адьювант Фрейнда, содержащий инактивированные микобактерии, служит воспроизводимым инструментом моделирования такой стимуляции [10]. Характерной тканевой формой ответа при этом является продуктивная гранулёма, отражающая взаимодействие возбудителя с мононуклеарными фагоцитами [11, 12].

Принципиально важно, что при длительном сохранении антигенной стимуляции реактивная гиперплазия лимфоидной ткани может сменяться её истощением с развитием вторичного иммунодефицита. В связи с этим всё большее значение приобретает иммуномодулирующая (хот-направленная) терапия микобактериальной инфекции, направленная на поддержание сбалансированного иммунного ответа и предотвращение органных повреждений [13, 14, 15]. Экспериментальные морфометрические исследования показывают, что структурные изменения селезёнки при системном воспалении поддаются количественной оценке [16], а сопоставление с реакцией других лимфоидных органов при микобактери-

альной патологии раскрывает системный характер ответа [17].

Вместе с тем морфологическая динамика реактивной перестройки селезёнки и возможность её иммуномодулирующей коррекции при хроническом микобактериальном воздействии остаются недостаточно изученными, что определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить морфологическую динамику реактивной перестройки селезёнки белых беспородных крыс и оценить возможность её иммуномодулирующей коррекции 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 селезёнку 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.

В отделении патогистологии симуляционного центра Бухарского государственного медицинского института из фрагментов селезёнки изготавливали парафиновые блоки, из которых на микротоме получали срезы толщиной 5–6 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	Реактивная перестройка селезёнки
Коррекция	4 мес / 300–350 г	НАФ + иммуномодулятор	Морфологическая нормализация органа

Применяли окраску гематоксилином-эозином (Г-Э) - для оценки общей архитектоники, состояния белой и красной пульпы, герминативных центров и макрофагальной реакции, а также окраску по Ван-Гизону - для оценки соединительнотканной стромы и капсулы. Готовые препараты изучали под тринокулярным микроскопом и фотографировали.

Морфометрическую оценку выполняли с определением относительной площади белой пульпы, доли активных герминативных центров, индекса ширины периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) и индекса краевой зоны. Дополнительно четыре качественных гистологических признака оценивали полуколичественно 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 селезёнка имела обычное строение: умеренно развитая белая пульпа с немногочисленными первичными фолликулами без выраженных герминативных центров, обычной ширины периартериальные лимфоидные муфты и краевая зона, а также красная пульпа со слабой макрофагальной реакцией (рис. 1).

В опытной группе развивалась выраженная реактивная перестройка: гиперплазия белой пульпы с увеличением размеров лимфоидных фолликулов, расширение периартериальных лимфоидных муфт, формирование крупных активных герминативных центров с многочисленными митозами и макрофагами с фагоцитированными апоптотическими тельцами, а также отчётливая макрофагальная реакция красной пульпы. В группе коррекции морфологическая картина занимала промежуточное положение: размеры фолликулов и активность герминативных центров уменьшались, ширина ПАЛМ и краевой зоны приближалась к контрольной, а соотношение белой и красной пульпы нормализовалось (рис. 2).



Рис. 1. Схема реактивной перестройки селезёнки и её иммуномодулирующей коррекции

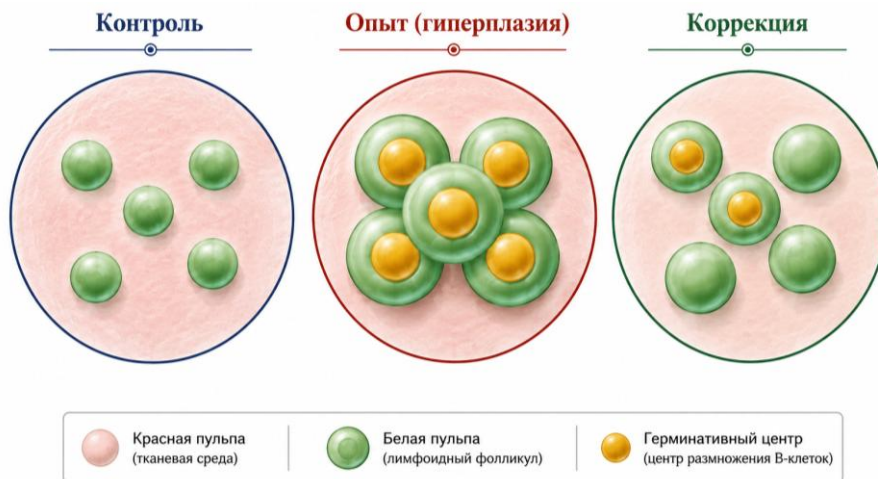


Рис. 2. Сравнительная структурная организация селезёнки в контрольной, опытной группах и группе коррекции

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

Признак	Контроль	Опыт	Коррекция
Гиперплазия белой пульпы	0	3	1
Активация герминативных центров	0	3	2
Макрофагальная реакция красной пульпы	1	3	2
Расширение ПАЛМ (Т-зоны)	0	3	1
Полнокровие красной пульпы	1	2	1

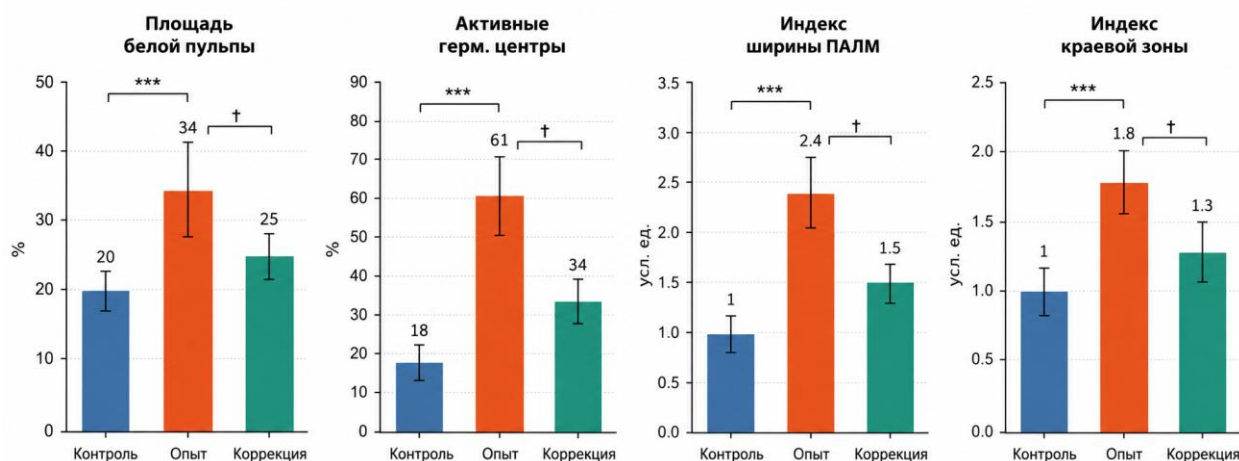


Рис. 3. Морфометрические показатели селезёнки в трёх группах (среднее $\pm$ SD; *** - $p < 0,001$ относительно контроля; † - $p < 0,05$ относительно опытной группы)

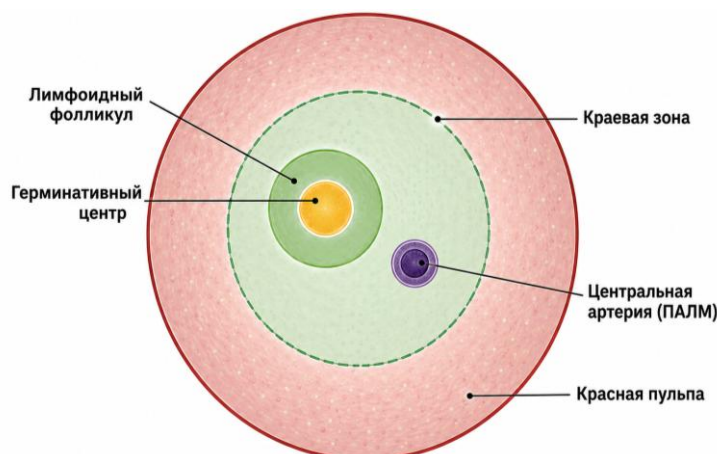


Рис. 4. Схема структурно-функциональных зон селезёнки

Количественная оценка подтвердила направленность выявленных изменений и эффект коррекции. В опытной группе относительная площадь белой пульпы, доля активных герминативных центров, индекс ширины ПАЛМ и индекс краевой зоны значимо возрастали; в группе коррекции все показатели демонстрировали отчётливое, хотя и неполное, снижение в сторону контрольных значений. Результаты морфометрической оценки представлены на диаграмме (рис. 3).

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

Для наглядного представления структурно-функциональных зон органа, соотношение которых восстанавливается в ходе коррекции, на рисунке 4 приведена схема строения селезёнки с указанием белой пульпы (периартериальные лимфоидные муфты, лимфоидный фолликул, герминативный центр, краевая зона) и красной пульпы.

Обсуждение. Полученные данные подтверждают, что хроническое микобактериальное воздействие вызывает в селезёнке выраженную реактивную перестройку, а применение иммуномодулятора обеспечивает частичную морфологическую нормализацию органа. Гиперплазия белой пульпы, активация герминативных центров, расширение ПАЛМ и макрофагальная реакция красной пульпы отражают одновременную активацию адаптивного и врождённого звеньев иммунитета в ответ на интенсивную антигенную стимуляцию [4, 5, 6] и согласуются с современными представлениями о реакции периферических лимфоидных органов при микобактериальной патологии [7].

Ключевым результатом является демонстрация управляемости этих изменений. Уменьшение площади белой пульпы, доли активных герминативных центров и индексов ПАЛМ и краевой зоны в группе коррекции свидетельствует о переходе от избыточной, потенциально истощающей активации к более сбалансированному ответу. Это имеет существенное значение, поскольку длительная антигенная стимуляция может сменяться истощением лимфоидной ткани и развитием вторичного иммунодефицита. Морфологический эффект коррекции согласуется с концепцией иммуномодулирующей (хост-направленной) терапии микобактериальной инфекции, направленной на поддержание сбалансированного иммунного ответа и снижение органных повреждений [13, 14, 15].

Выделенные морфометрические показатели - относительная площадь белой пульпы, доля активных герминативных центров, индекс ширины

ПАЛМ и индекс краевой зоны - могут служить объективными критериями оценки эффективности иммуномодулирующей терапии. Сопоставление с экспериментальными морфометрическими исследованиями селезёнки при системном воспалении [16] и с реакцией других лимфоидных органов [17] подтверждает адекватность использованных подходов и системный характер ответа. Ограничением работы являются описание единственного срока наблюдения, полуколичественный характер части оценок и отсутствие иммуногистохимического фенотипирования клеточных популяций, необходимого для детальной характеристики механизмов; это определяет направления дальнейших исследований.

Хроническое микобактериальное воздействие приводит к реактивной перестройке селезёнки, морфологически проявляющейся гиперплазией белой пульпы, активацией герминативных центров, расширением периартериальных лимфоидных муфт и макрофагальной реакцией красной пульпы. Применение иммуномодулятора обеспечивает частичную нормализацию 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 реактивную перестройку селезёнки с гиперплазией белой пульпы, увеличением доли активных герминативных центров и расширением периартериальных лимфоидных муфт, что отражает активацию адаптивного и врождённого звеньев иммунитета.

2. Макрофагальная реакция красной пульпы является морфологическим маркёром усиления фагоцитоза и вовлечения врождённого иммунитета в ответ на хроническую антигенную стимуляцию.

3. Применение иммуномодулятора обеспечивает частичную нормализацию структуры селезёнки: относительная площадь белой пульпы, доля активных герминативных центров и индексы ПАЛМ и краевой зоны снижаются, приближаясь к контрольным значениям.

4. Относительная площадь белой пульпы, доля активных герминативных центров, индекс ширины ПАЛМ и индекс краевой зоны представляют собой информативные морфологические критерии оценки эффективности иммуномодулирующей коррекции реактивной перестройки селезёнки.

Литература:

1. Ayodele S., Kumar P., van Eyk A., Choonara Y.E. Advances in immunomodulatory strategies for host-directed therapies in combating tuberculosis. *Biomed Pharmacother.* 2023;162:114588. doi:10.1016/j.biopha.2023.114588.
2. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):849–860. doi:10.1189/jlb.70.6.849.
3. Bronte V., Pittet M.J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* 2013;39(5):806–818. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.010.
4. Cesta M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):455–465. doi:10.1080/01926230600867743.
5. den Haan J.M.M., Kraal G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun.* 2012;4(5–6):437–445. doi:10.1159/000335216.
6. Dzhalilova D.Sh., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Zolotova N.A., Tsvetkov I.S., Mkhitarov V.A., Makarova O.V., Khochanskiy D.N. 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. *Int J Inflam.* 2019;2019:7584685. doi:10.1155/2019/7584685.
7. Ganchua S.K.C., White A.G., Klein E.C., Flynn J.L. Lymph nodes—the neglected battlefield in tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2020;16(8):e1008632. doi:10.1371/journal.ppat.1008632.
8. Harbuz M.S., Rees R.G., Eckland D., Jessop D.S., Brewerton D., Lightman S.L. 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;130(3):1394–1400. doi:10.1210/endo.130.3.1537299.
9. Lewis S.M., Williams A., Eisenbarth S.C. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019;4(33):eaau6085. doi:10.1126/sciimmunol.aau6085.
10. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606–616. doi:10.1038/nri1669.
11. Pagán A.J., Ramakrishnan L. The formation and function of granulomas. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:639–665. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100022.
12. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):352–366. doi:10.1038/nri3211.
13. Silverman M.N., Sternberg E.M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1261:55–63. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x.
14. Swanson R.V., Gupta A., Foreman T.W., et al. Antigen-specific B cells direct T follicular-like helper cells into lymphoid follicles to mediate Mycobacterium tuberculosis control. *Nat Immunol.* 2023;24(5):855–868. doi:10.1038/s41590-023-01476-3.
15. Victora G.D., Nussenzweig M.C. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 2022;40:413–442. doi:10.1146/annurev-immunol-120419-022408.
16. Wallis R.S., Hafner R. Advancing host-directed therapy for tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(4):255–263. doi:10.1038/nri3813.
17. Zumla A., Rao M., Dodoo E., Maeurer M. Potential of immunomodulatory agents as adjunct host-directed therapies for multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Med.* 2016;14:89. doi:10.1186/s12916-016-0635-1.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ КОРРЕКЦИЯ РЕАКТИВНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ СЕЛЕЗЁНКИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Тоуров О.А., Тешаев Ш.Ж.

Резюме. Актуальность. Реактивная перестройка селезёнки при хроническом микобактериальном воздействии при длительном сохранении может сменяться истощением лимфоидной ткани, однако возможность её иммуномодулирующей коррекции изучена недостаточно. Цель исследования - изучить морфологическую динамику реактивной перестройки селезёнки белых беспородных крыс и оценить возможность её иммуномодулирующей коррекции 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 увеличение площади белой пульпы, доли активных герминативных центров, индексов ПАЛМ и краевой зоны, а также макрофагальная реакция красной пульпы; в группе коррекции все показатели демонстрировали частичную нормализацию в сторону контрольных значений. Выводы. Иммуномодулирующая коррекция обеспечивает частичную морфологическую нормализацию селезёнки, а выделенные количественные критерии позволяют объективно оценивать её эффективность.

Ключевые слова: селезёнка, белая пульпа, красная пульпа, герминативный центр, периартериальные лимфоидные муфты, макрофагальная реакция, иммуномодулятор, коррекция, микобактерии, морфология.