

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ АДЬЮВАНТА ФРЕЙНДА: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ



Саноев Бахтиёр Абдурасулович

Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

ТАЖРИБА ҲАЙВОНЛАРИДА ФРЕЙНД АДЬЮВАНТИ ЁРДАМИДА КАСАЛЛИКНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛ МОДЕЛЛАШТИРИШ: МЕТОДОЛОГИК АЛГОРИТМ

Саноев Бахтиёр Абдурасулович

Бухоро давлат тиббиёт институти, Ўзбекистон Республикаси, Бухоро ш.

EXPERIMENTAL MODELING OF DISEASE IN LABORATORY ANIMALS USING FREUND'S ADJUVANT: A METHODOLOGICAL ALGORITHM

Sanoyev Baxtiyor Abdurasulovich

Bukhara State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Bukhara

e-mail: sanoyev.baxtiyor@bsmi.uz

Резюме. Микобактериялар сақловчи Фрейнднинг тўлиқ адьюванти (CFA) тажриба ҳайвонларида сурункали ва аутоиммун яллиғланиш касалликларини моделлаштиришнинг классик воситаси ҳисобланади. Ушбу мақолада замонавий адабиётлар асосида Фрейнд адьюванти ёрдамида касалликни экспериментал қақриш методологияси тизимли равишда умумлаштирилган ҳамда жараённинг аниқ, босқичма-босқич методологик алгоритми (блок-схемаси) таклиф этилган. Алгоритм тадқиқотни режаслаштириш, ҳайвонларни танлаш ва сонини асослаш, антиген-адьювант эмульсиясини тайёрлаш, иммунизация схемаси, касаллик ривожланиши мониторинги, материал олиш ҳамда моделни морфологик, иммуногистокимёвий ва гормонал мезонлар бўйича верификация қилиш босқичларини қамрайди. Мақолада моделнинг иммунобиологик асослари, биоэтик талаблар (3R, 2010/63/EU), стандартлаштириш ва такрорланувчанлик масалалари ҳам ёритилган.

Калим сўзлар: Фрейнд адьюванти, микобактериялар, экспериментал модель, тажриба ҳайвонлари, иммунизация, сурункали яллиғланиш, методологик алгоритм, биоэтика.

Abstract. Mycobacteria-containing complete Freund's adjuvant (CFA) is a classical tool for modeling chronic and autoimmune inflammatory diseases in laboratory animals. Based on current literature, this article systematizes the methodology of experimental disease induction using Freund's adjuvant and proposes a clear step-by-step methodological algorithm (flowchart) of this process. The algorithm covers the stages of study planning, animal selection and sample-size justification, preparation of the antigen–adjuvant emulsion, the immunization schedule, monitoring of disease development, tissue sampling, and model verification by morphological, immunohistochemical, and hormonal criteria. The article also addresses the immunobiological basis of the model, bioethical requirements (the 3R principles, Directive 2010/63/EU), and issues of standardization and reproducibility.

Keywords: Freund's adjuvant, mycobacteria, experimental model, laboratory animals, immunization, chronic inflammation, methodological algorithm, bioethics.

Введение. Экспериментальное моделирование заболеваний на лабораторных животных остаётся незаменимым инструментом изучения патогенетических механизмов болезней человека и апробации новых методов диагностики и лечения [11, 17]. Среди множества подходов особое место занимает моделирование хронического и аутоиммунного воспаления с помощью полного адьюванта Фрейнда (Complete Freund's Adjuvant, CFA), содержащего убитые микобактерии [1, 6].

Адьювант Фрейнда в сочетании с соответствующим антигеном воспроизводит ключевые звенья иммунного ответа, характерные для инфекционных и аутоиммунных процессов, и лежит в основе таких классических моделей, как экспериментальный аутоиммунный тиреоидит (ЭАТ), экспериментальный аутоиммунный миокардит (ЭАМ), коллаген-индуцированный артрит (КИА), экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) и адьювантный артрит [6, 7, 8, 10].

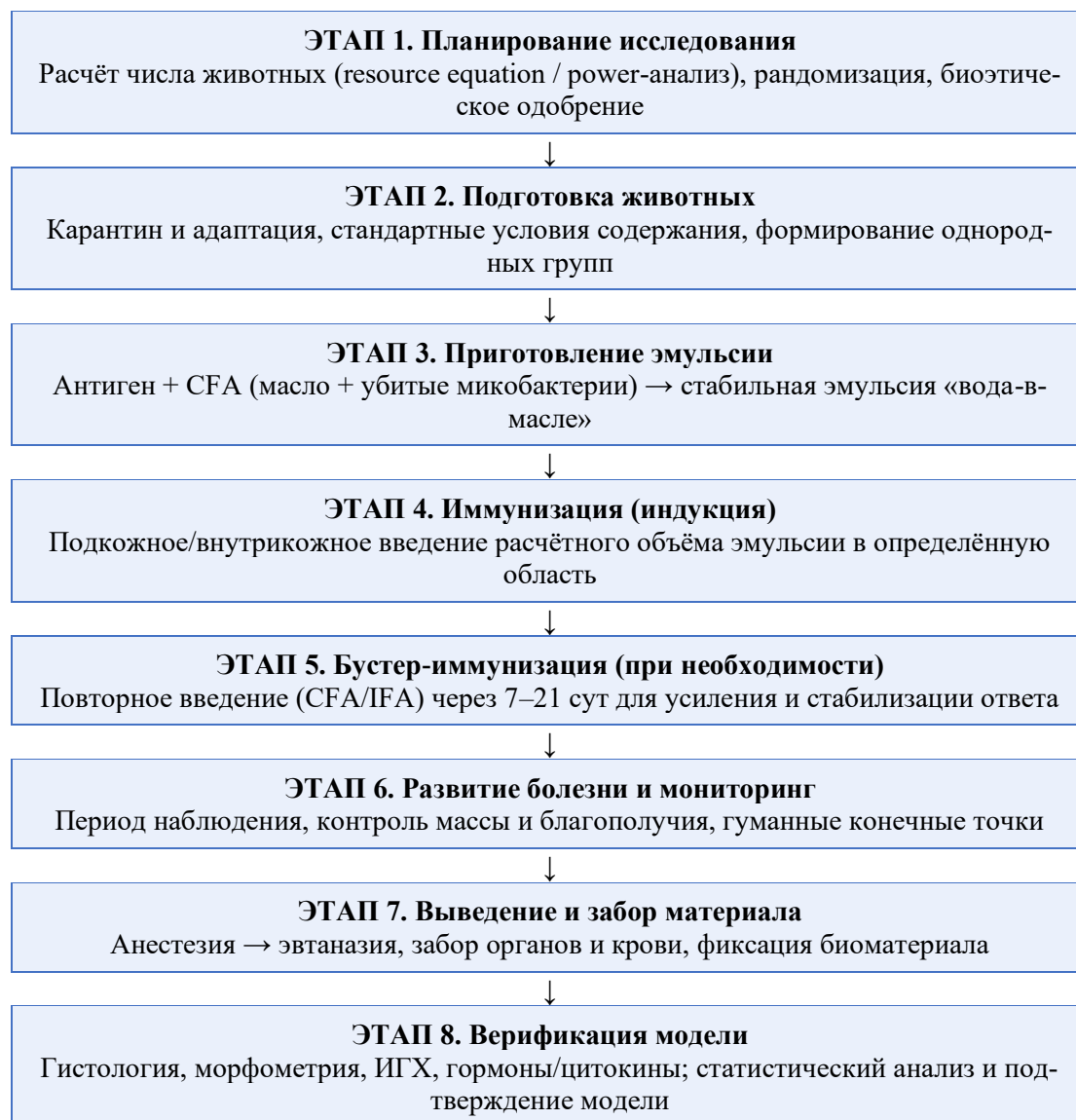


Рис. 1. Алгоритм экспериментального моделирования заболевания с помощью адьюванта Фрейнда

Несмотря на широкое применение, результаты моделирования во многом зависят от строгого соблюдения методологии - качества эмульсии, дозы и способа введения, схемы иммунизации, а также корректной верификации модели [13, 14].

Цель настоящего обзора - на основе современной литературы систематизировать методологию экспериментального воспроизведения заболевания с помощью адьюванта Фрейнда и представить чёткий, воспроизводимый пошаговый алгоритм этого процесса, пригодный для использования в морфологических и иммунологических исследованиях.

1. Адьювант Фрейнда: состав и иммунобиологические основы. Полный адьювант Фрейнда представляет собой эмульсию минерального масла с убитыми нагреванием микобактериями (обычно *Mycobacterium tuberculosis*); его неполная форма (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) микобактерий не содержит [1]. Масляная эмульсия обеспечивает длительное депонирование антигена в месте вве-

дения, тогда как микобактериальный компонент является главным фактором активации врождённого иммунитета [1, 2].

Иммунобиологический эффект CFA обусловлен молекулами клеточной стенки микобактерий - трегалозо-6,6'-димиколом (корд-фактор, TDM), N-гликолированным мурамилдипептидом (MDP) и липоарабиноманнаном (LAM), которые распознаются рецепторами врождённого иммунитета (Mincle, NOD2, TLR2/4) и активируют макрофаги и дендритные клетки, направляя иммунный ответ по пути Th1/Th17 [2, 3, 4]. Показано, что именно N-гликолированный пептидогликан и TDM необходимы для полноценного адьювантного эффекта [2], а действие CFA частично связано с формированием «тренированного иммунитета» [5]. Понимание этих механизмов является методологической основой выбора адьюванта и трактовки результатов модели.

2. Спектр моделей, индуцируемых адьювантом Фрейнда. Адьювант Фрейнда в сочетании с органоспецифическим аутоантигеном поз-

воляет воспроизводить широкий спектр аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний. Исторически было показано, что тиреоидит у животных индуцируется введением тиреоглобулина с CFA, тогда как IFA недостаточен для формирования тиреоидных поражений [7, 8, 9]. Этот принцип лёг в основу современных стандартизированных моделей ЭАТ [10, 11].

Помимо тиреоидита, CFA с соответствующим антигеном используется для индукции экспериментального аутоиммунного миокардита [6], коллаген-индуцированного артрита и энцефаломиелита [13], а также экспериментального адреналита (иммунного повреждения надпочечника) [12]. Отдельно применяется адьювантный артрит - модель хронического системного воспаления, вызываемого введением CFA, которая сопровождается стойкой активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [14, 16]. Таким образом, варьируя антиген, дозу и схему введения, исследователь может моделировать различные по локализации и механизму заболевания [6].

3. Методологический алгоритм экспериментального моделирования. На основе обобщения литературы предложен унифицированный пошаговый алгоритм воспроизведения заболевания с помощью адьюванта Фрейнда, представленный ниже в виде блок-схемы (рис. 1). Каждый этап детализирован в последующих разделах.

4. Планирование исследования: животные, их число и рандомизация. Выбор вида и линии животных определяется задачами исследования и генетической предрасположенностью к моделируемому заболеванию; для многих моделей используют крыс и мышей, а для аутоиммунных реакций - генетически предрасположенные линии [10, 11].

Число животных должно быть статистически обоснованным. Для этого применяют метод ресурсного уравнения ($E = N - k$, при $10 \leq E \leq 20$) и анализ статистической мощности [19, 20]. Такой подход обеспечивает достаточную чувствительность исследования при соблюдении принципа сокращения числа животных. Обязательными элементами дизайна являются рандомизация распределения по группам, наличие адекватного контроля (интактные и/или получившие только адьювант/IFA животные) и слепая оценка препаратов для исключения субъективной ошибки [17].

5. Биоэтические требования и принципы 3R. Все манипуляции с лабораторными животными проводятся в соответствии с международными биоэтическими нормами, прежде всего Директивой 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях, и принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) [18]. Ключевое значение имеет соблюдение принципов 3R - заме-

на (Replacement), сокращение (Reduction) и усовершенствование (Refinement) [15, 17].

Поскольку адьювантные модели могут сопровождаться выраженным дискомфортом (гранулёмы в месте введения, боль, системное воспаление), особое внимание уделяется усовершенствованию (refinement): оптимизации дозы и объёма вводимой эмульсии, выбору места инъекции, обезболиванию и определению гуманных конечных точек [14, 15]. Показано, что даже минимальные объёмы CFA достаточны для индукции модели, что позволяет снизить тяжесть страдания животных без потери валидности [14]. Планирование и представление результатов рекомендуется выполнять в соответствии с рекомендациями ARRIVE 2.0 [17].

6. Приготовление антиген-адьювантной эмульсии. Качество эмульсии антиген/адьювант является критическим фактором воспроизводимости модели [13]. Классически готовят стабильную эмульсию типа «вода-в-масле» путём смешивания водного раствора антигена с равным объёмом CFA. Традиционный шприцевой метод трудоёмок и вариателен, поэтому в современных протоколах применяют гомогенизаторы и специальные насадки, обеспечивающие получение стабильных, однородных частиц и повышающих воспроизводимость [13].

Стабильность эмульсии (отсутствие расслоения, сохранение формы капли на поверхности воды) проверяется перед введением; нестабильная эмульсия резко снижает эффективность иммунизации [6, 13].

7. Способ введения, доза и схема иммунизации. Способ и место введения определяются целью моделирования. Для системных и органо-специфических аутоиммунных моделей эмульсию чаще вводят подкожно или внутрикожно (нередко в нескольких точках, в область спины или основания хвоста), тогда как для локальных моделей воспаления и артрита применяют внутрикожное, внутрисуставное или внутривенное введение [6, 14]. Доза антигена и микобактерий, а также объём эмульсии подбираются с учётом вида животного и модели [6].

Схема иммунизации может быть однократной или включать бустер-введение. Для ряда аутоиммунных моделей (например, ЭАМ) необходимы две иммунизации с интервалом около 7 суток (дни 0 и 7); при этом повторное введение усиливает и стабилизирует иммунный ответ [6]. В моделях хронического воспаления однократное введение CFA способно вызвать длительно сохраняющуюся реакцию [14]. Выбор схемы должен быть обоснован и стандартизирован для обеспечения воспроизводимости [6, 13].

8. Развитие патологического процесса, мониторинг и забор материала. После иммуни-

зации следует период развития заболевания, длительность которого зависит от модели (от нескольких суток до нескольких недель) [14]. В этот период проводят регулярный мониторинг состояния животных: контроль массы тела, поведения, местной и системной реакции, а также специфических для модели показателей; при достижении заранее определённых гуманных конечных точек животное выводят из эксперимента [14, 17].

Выведение из эксперимента осуществляют гуманными методами под адекватной анестезией. Далее производят забор целевых органов и крови: органы фиксируют для гистологического и иммуногистохимического исследования, а сыворотку крови используют для определения гормонов и цитокинов. Стандартизация времени и условий забора материала (в том числе с учётом суточных колебаний гормонов) необходима для корректной интерпретации результатов [16, 24].

9. Верификация модели: морфологические, иммуногистохимические и функциональные критерии. Подтверждение того, что заболевание действительно воспроизведено, является обязательным этапом. Морфологическая верификация включает гистологическую оценку характерных изменений в органе-мишени: например, лимфоцитарной инфильтрации, деструкции паренхимы, фиброза при аутоиммунном тиреоидите [22], или гипертрофии/гиперплазии и клеточной инфильтрации при реакции надпочечника [21, 23]. Количественная морфометрия (толщина зон, размеры клеток и ядер, объёмная доля структуры) обеспечивает объективность оценки [23].

Иммуногистохимические методы позволяют оценить иммунные и пролиферативные маркеры (например, макрофаги, Т-лимфоциты, маркеры апоптоза и пролиферации), а определение гормонов и цитокинов в сыворотке - функциональное состояние органа и выраженность системного ответа [21, 24, 25]. Совпадение морфологических, иммуногистохимических и функциональных изменений с ожидаемым фенотипом заболевания служит критерием успешности модели [22, 25].

10. Стандартизация, воспроизводимость и контроль качества. Воспроизводимость адъювантных моделей определяется стандартизацией всех этапов: концентрации микобактерий в CFA, качества эмульсии, дозы, места и схемы введения, а также условий содержания животных [6, 13]. Наличие адекватных контрольных групп и статистически обоснованного числа животных обеспечивает достоверность выводов [19, 20]. Прозрачное и полное описание методики в соответствии с рекомендациями ARRIVE повышает воспроизводимость и качество исследований [17].

Следует учитывать и ограничения модели: индивидуальную вариабельность ответа, зависимость от генетического фона, а также возможные

побочные эффекты адъюванта (гранулёмы, системная реакция), которые необходимо контролировать в рамках биоэтических требований [14, 15]. Современные направления развития включают применение синтетических микобактериальных компонентов вместо цельного CFA для повышения стандартизации [2], а также цифровую морфометрию для объективной верификации модели [23].

Заключение. Моделирование заболевания у лабораторных животных с помощью адъюванта Фрейнда является хорошо обоснованным и широко применяемым методом воспроизведения хронического и аутоиммунного воспаления. Успех модели определяется строгим соблюдением методологии на всех этапах - от планирования и обоснования числа животных до приготовления стандартизированной эмульсии, корректной схемы иммунизации и всесторонней верификации модели морфологическими, иммуногистохимическими и функциональными методами.

Предложенный пошаговый алгоритм систематизирует этот процесс и может служить практическим ориентиром для морфологических и иммунологических исследований. Соблюдение биоэтических принципов (3R, Директива 2010/63/EU) и рекомендаций ARRIVE, а также стандартизация ключевых параметров обеспечивают воспроизводимость, объективность и научную обоснованность получаемых результатов. Дальнейшее развитие метода связано с применением синтетических адъювантных компонентов и цифровых методов количественной оценки.

Литература:

1. Annane D, Pastores SM, Arlt W, Balk RA, Beishuizen A, Briegel J, et al. Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI): a narrative review from a Multispecialty Task Force of the SCCM and ESICM. *Intensive Care Med.* 2017;43(12):1781–1792.
2. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101–105.
3. 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.
4. Caturegli P, De Remigis A, Chuang K, Dembele M, Iwama A, Iwama S. Hashimoto's thyroiditis: celebrating the centennial through the lens of the Johns Hopkins Hospital surgical pathology records. *Thyroid.* 2013;23(2):142–150.
5. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303–306.
6. Dubé JY, McIntosh F, Zarruk JG, David S, Nigou J, Behr MA. Synthetic mycobacterial molecular pat-

terns partially complete Freund's adjuvant. *Sci Rep*. 2020;10:5874.

7. Fang J, Yu L, Zhuang LG, Pei XY, Wang Q, Jin GX. The changes in peripheral blood Th17 and Treg ratios in Hashimoto's thyroiditis are accompanied by differential PD-1/PD-L1 expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:959021.

8. Fontes JA, Barin JG, Talor MV, Stickel N, Schaub J, Rose NR, Čiháková D. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immun Inflamm Dis*. 2017;5(2):163–176.

9. Hu Y, Feng W, Chen H, Shi H, Jiang L, Zheng X, et al. Effect of selenium on thyroid autoimmunity and regulatory T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Transl Sci*. 2021;14(4):1390–1402.

10. Huwiler VV, Maissen-Abgottspon S, Stanga Z, Mühlebach S, Trepp R, Bally L, Bano A. Selenium supplementation in patients with Hashimoto thyroiditis: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid*. 2024;34(3):295–313.

11. Judd AM, Call GB, Barney M, McIlmoil CJ, Balls AG, Adams A, Oliveira GK. Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:628–637.

12. Kanczkowski W, Alexaki VI, Tran N, Großklaus S, Zacharowski K, Martinez A, et al. Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(36):14801–14806.

13. Kanczkowski W, Sue M, Bornstein SR. Adrenal gland microenvironment and its involvement in the regulation of stress-induced hormone secretion during sepsis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:156.

14. Kong YM, Audibert F, Giraldo AA, Rose NR, Chedid L. Effects of natural or synthetic microbial adjuvants on induction of autoimmune thyroiditis. *Infect Immun*. 1985;49(1):40–45.

15. Mazzieri A, Montanucci P, Basta G, Calafiore R. The role behind the scenes of Tregs and Th17s in Hashimoto's thyroiditis: toward a pivotal role of FOXP3 and BACH2. *Front Immunol*. 2022;13:1098243.

16. Nakashima I, Yokochi T, Kato N, Asai J-Y. Microbial adjuvant and autoimmunity. *Microbiol Immunol*. 1977;21(11):1013–1022.

17. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020;18(7):e3000410.

18. Perricone C, Colafrancesco S, Mazar RD, Soriano A, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects. *J Autoimmun*. 2013;47:1–16.

19. Ragusa F, Fallahi P, Elia G, Gonnella D, Paparo SR, Giusti C, et al. Hashimoto's thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019;33(6):101367.

20. Rose NR, Bonita R, Burek CL. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev*. 2002;1(1–2):97–103.

21. Steiner JW, Langer B, Schatz DL, Volpé R. Experimental immunologic adrenal injury. *J Exp Med*. 1960;112(1):187–202.

22. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999;79(1):1–71.

23. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a sub-region-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(5):E965–E973. PMID:16772325.

24. Vargas-Uricoechea H. Molecular mechanisms in autoimmune thyroid disease. *Cells*. 2023;12(6):918.

25. Weigle WO, High GJ, Nakamura RM. The role of mycobacteria and the effect of proteolytic degradation of thyroglobulin on the production of autoimmune thyroiditis. *J Exp Med*. 1969;130(2):243–262.

26. Zhu X, Zhang C, Feng S, et al. Intestinal microbiota regulates the gut-thyroid axis: the new dawn of improving Hashimoto thyroiditis. *Clin Exp Med*. 2024;24(1):39.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ АДЬЮВАНТА ФРЕЙНДА: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ

Саноев Б.А.

Резюме. Содержащий микобактерии полный адъювант Фрейнда (CFA) является классическим инструментом моделирования хронических и аутоиммунных воспалительных заболеваний у лабораторных животных. В настоящей статье на основе современной литературы систематизирована методология экспериментального воспроизведения заболевания с помощью адъюванта Фрейнда и предложен чёткий пошаговый методологический алгоритм (блок-схема) этого процесса. Алгоритм охватывает этапы планирования исследования, выбора животных и обоснования их числа, приготовления антиген-адъювантной эмульсии, схемы иммунизации, мониторинга развития заболевания, забора материала и верификации модели по морфологическим, иммуногистохимическим и гормональным критериям. В статье также освещены иммунобиологические основы модели, биоэтические требования (принципы 3R, Директива 2010/63/EU), вопросы стандартизации и воспроизводимости.

Ключевые слова: адъювант Фрейнда, микобактерии, экспериментальная модель, лабораторные животные, иммунизация, хроническое воспаление, методологический алгоритм, биоэтика.