УДК: [611.438+611.41]:616-002.5-092.9:57.086

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И СТАНДАРТИЗИРОВАННЫЙ КОМПЛЕКСНЫЙ ПРОТОКОЛ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ, МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ТИМУСА И СЕЛЕЗЁНКИ



Тоиров Ойбек Алиевич
Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

МИКОБАКТЕРИАЛ ТАЪСИРНИНГ ЭКСПЕРИМЕНТАЛ МОДЕЛИ ВА ТИМУС ҲАМДА ТАЛОҚНИ МОРФОЛОГИК, МОРФОМЕТРИК ВА ИММУНОГИСТОКИМЁВИЙ БАҲОЛАШНИНГ СТАНДАРТЛАШТИРИЛГАН КОМПЛЕКС ПРОТОКОЛИ

Тоиров Ойбек Алиевич
Бухоро давлат тиббиёт институти, Ўзбекистон Республикаси, Бухоро ш.

AN EXPERIMENTAL MODEL OF MYCOBACTERIAL EXPOSURE AND A STANDARDIZED INTEGRATED PROTOCOL FOR MORPHOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF THE THYMUS AND SPLEEN

Toyirov Oybek Alievich
Bukhara State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Bukhara

e-mail: info@bdti.uz

Резюме. *Мақсад: Фрейнд тўлиқ адъюванти асосидаги микобактериал таъсир эксперимент моделини ҳамда каламушларда ёш омилини ҳисобга олган ҳолда тимус ва талоқни бир вақтда морфологик, гистокимёвий, морфометрик, иммуногистокимёвий ва гематологик баҳолашнинг стандартлаштирилган комплекс протоколини тақдим этиш. Материал ва усуллар: тадқиқот 80 та оқ зотсиз эркак каламушда ўтказилди, улар тўрт гуруҳга ажратилди (4 ва 9 ойлик интакт ва тажриба гуруҳлари, ҳар бирида 20 тадан); танланма ҳажми ресурс тенгламаси ва статистик қувват ҳисоби билан асосланди. Микобактериал таъсир Фрейнд тўлиқ адъювантини (M. tuberculosis H37Ra, 0,2 мл) бир марта юбориш орқали моделлаштирилди. Гематоксилин-эозин, Ван Гизон бўйича бўяш, Гомори бўйича кумуш импрегнацияси, QuPath 0.5.1 дастурида рақамли морфометрия, иммуногистокимёвий панел (CD3, CD20, CD68, Caspase-3, CD138), гематологик ва иммунобиокимёвий таҳлил ҳамда параметрик ва нопараметрик статистик усуллар қўлланилди. Натижалар: протокол ҳужайра (иммуногистокимёвий маркерлар экспрессияси), тўқима (тимус ва талоқ зоналари морфометрияси, коллаген ва ретикуляр толалар улуши) ва тизим (қон кўрсаткичлари) даражаларида ягона миқдорий маълумотлар тизимини шакллантиради; кодланган препаратларни «кўр» усулда баҳолаш ва интакт гуруҳларга нисбатан меъёрлаш фарқларни микобактериал омил ва ёш таъсирига боғлаш имконини беради. Хулоса: таклиф этилган модель ва протокол тимус ва талоқдаги ўзгаришларни объектив, такрорланувчан ва статистик асосланган баҳолашни таъминлайди ҳамда иммун аъзоларни эксперимент-морфологик ўрганишда қўллаш учун тавсия этилади.*

Калит сўзлар: *эксперимент модель, Фрейнд адъюванти, тимус, талоқ, морфометрия, иммуногистокимё, QuPath, статистик таҳлил, танланма ҳажмини асослаш.*

Abstract. *Aim: to present an experimental model of mycobacterial exposure based on complete Freund's adjuvant and a standardized integrated protocol for the simultaneous morphological, histochemical, morphometric, immunohistochemical and haematological assessment of the thymus and spleen in rats, taking the age factor into account. Materials and methods: the study was performed on 80 white outbred male rats allocated to four groups (intact and experimental, aged 4 and 9 months, 20 each); the sample size was justified by the resource-equation method and statistical power analysis. Mycobacterial exposure was modelled by a single injection of complete Freund's adjuvant (M. tuberculosis H37Ra, 0.2 mL). Haematoxylin-eosin and Van Gieson staining, Gomori silver impregnation, digital morphometry in QuPath 0.5.1, an immunohistochemical panel (CD3, CD20, CD68, Caspase-3, CD138), haematological and immunobiochemical analysis, and parametric and non-parametric statistics were applied. Results: the protocol provides a unified*

system of quantitative data at the cellular (expression of immunohistochemical markers), tissue (morphometry of thymic and splenic zones, proportion of collagen and reticular fibres) and systemic (blood indices) levels; blinded assessment of coded slides and normalization to the intact groups allow the differences to be attributed to the mycobacterial factor and age. Conclusion: the proposed model and protocol ensure an objective, reproducible and statistically justified assessment of changes in the thymus and spleen and can be recommended for experimental morphological studies of immune organs.

Keywords: *experimental model, Freund's adjuvant, thymus, spleen, morphometry, immunohistochemistry, QuPath, statistical analysis, sample size justification.*

Микобактериальная инфекция и её экспериментальные модели вызывают глубокую морфофункциональную перестройку не только в лёгких, но и в органах иммунной системы. Полный адъювант Фрейнда (complete Freund's adjuvant, CFA), содержащий убитые микобактерии, признан международным «золотым стандартом» моделирования хронического иммунного воспаления и аутоиммунных процессов [1, 4, 8]. Системная воспалительная реакция сопровождается сопряжёнными изменениями тимуса и селезёнки [6], а морфология и иммуногистохимическая характеристика этих органов у крыс существенно зависят от возраста [10, 14]. Однако сопоставимость и воспроизводимость результатов морфологических исследований лимфоидных органов часто ограничиваются отсутствием единого стандартизированного протокола, недостаточным обоснованием объёма выборки и субъективностью визуальной оценки.

Цель исследования: описать экспериментальную модель микобактериального воздействия и стандартизированный комплексный протокол одновременной оценки тимуса и селезёнки, устраняющий указанные методические недостатки.

Материал и методы. *Дизайн исследования.* Работа представляет собой проспективное контролируемое сравнительно-аналитическое экспериментально-морфологическое исследование с двухфакторным дизайном: первый фактор – наличие (опыт) или отсутствие (контроль) микобактериального воздействия, второй – возраст животных. Такой подход позволяет раздельно оценить возрастную реактивность лимфоидных органов и их реакцию на инфекционно-воспалительный стресс.

Животные и этика. Объектом исследования служили тимус и селезёнка белых беспородных крыс-самцов. В начале эксперимента животные были в возрасте 3 мес (масса 240–310 г) и 8 мес (масса 450–550 г); к моменту забора материала (срок наблюдения 1 мес) их возраст составил соответственно 4 и 9 мес. Содержание, манипуляции и выведение из эксперимента проводили в соответствии с международными требованиями гуманного обращения с лабораторными животными (принципы ARRIVE и Директива 2010/63/EU) [9, 13]. Распределение животных по группам представлено в таблице 1.

Обоснование объёма выборки. Число животных обосновано двумя методами [5, 7]. Метод ресурсного уравнения ($E = N - k$, где $k = 4$; допустимый диапазон $E = 10–20$) показал, что допустимый объём составляет 4–6 животных на группу. Расчёт статистической мощности по формуле $n = 2 \times (Z\alpha/2 + Z\beta)^2 \times \sigma^2 / \delta^2$ при уровне значимости $\alpha = 0{,}05$ ($Z\alpha/2 = 1{,}96$) и мощности 80% ($Z\beta = 0{,}84$) показал необходимость не менее 6–7 животных на группу для каждого направления анализа. С учётом нескольких параллельных направлений исследования и резерва численность каждой группы была увеличена до 20 животных (всего 80).

Модель микобактериального воздействия. Применяли полный адъювант Фрейнда, содержащий штамм M. tuberculosis H37Ra. Адъювант вводили однократно в объёме 0,2 мл на животное; животные контрольных групп препарат не получали. Модель воспроизводит хроническое гранулематозное иммунное воспаление и системную перестройку лимфоидной ткани [1, 4], а выраженность воспалительной реакции зависит от дозы адъюванта [12].

Жадвал 1. Распределение экспериментальных животных по группам

Группа	Возраст на момент забора	Воздействие	n	Срок
Контроль-1	4 мес	Интактные (без адъюванта)	20	1 мес
Опыт-1	4 мес	Полный адъювант Фрейнда	20	1 мес
Контроль-2	9 мес	Интактные (без адъюванта)	20	1 мес
Опыт-2	9 мес	Полный адъювант Фрейнда	20	1 мес
Всего	–	–	80	–

Жадвал 2. Морфометрические показатели, оцениваемые в программе QuPath

Орган	Морфометрические показатели	Ед.
Селезёнка	Диаметр и относительная площадь лимфоидных фолликулов и герминативных центров; ширина маргинальной и мантийной зон; толщина стенки сосудов ПАЛМ; доля красной пульпы	%, мкм
Тимус	Площадь коркового и мозгового вещества; корково-мозговой индекс; толщина трабекул; число и размер телец Гассаля	%, мкм
Оба органа	Доля коллагена (Ван Гизон); плотность ретикулярных волокон (Гомори)	%

Примечание: ПАЛМ – периартериальные лимфоидные муфты.

Жадвал 3. Иммуногистохимическая панель

Маркёр	Орган	Локализация	Что оценивает
CD3	Селезёнка, тимус	Мембранная (Т-зона, мозговое вещество)	Т-звено, Т-лимфопоэз
CD20	Селезёнка	Мембранная (фолликулы)	В-звено, гуморальный иммунитет
CD68	Селезёнка	Цитоплазматическая (красная пульпа, маргинальная зона)	Активность макрофагов, воспаление
Caspase-3	Тимус	Цитоплазматическая (корковое и мозговое вещество)	Апоптоз, акцидентальная инволюция
CD138	Тимус	Мембранная	Плазматические и секреторные клетки

Забор материала и гистологическая проводка. Извлечённые тимус и селезёнку немедленно фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, обезвоживали, просветляли в ксилоле и заливали в парафин; на ротационном микротоме готовили срезы толщиной 4–5 мкм.

Гистологические и гистохимические методы. Использовали окраску гематоксилином и эозином (общая морфология), по Ван Гизону (пикрофуксин; количество и распределение коллагена) и серебрение по Гомори (ретикулярные волокна стромы).

Морфометрия. Цифровую морфометрию проводили в программе QuPath [3]. Оценивали стандартный набор параметров, единый для контрольных и опытных групп; ключевые морфометрические показатели приведены в таблице 2.

Иммуногистохимия.
Иммуногистохимические реакции выполняли на парафиновых срезах: депарафинизация, демаскировка антигенов, авидин-биотиновая пероксидазная система, хромоген DAB. Панель маркёров приведена в таблице 3. Экспрессию оценивали количественно в QuPath 0.5.1 при увеличении ×200 как долю (%) позитивно окрашенных клеток в стандартных полях зрения [3, 11].

Гематологический и иммунобиохимический анализ. Параллельно оценивали показатели периферической крови и иммунобиохимический профиль, что позволило сопоставить тканевые изменения с системной реакцией организма.

Статистический анализ. Количественные показатели представляли в виде M±m при нормальном распределении и Me [Q1; Q3] при отклонении от нормального. Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро–Уилка. Для сравнения двух независимых групп применяли t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении) или U-критерий Манна–Уитни (при отклонении от нормальности), для сравнения нескольких групп – дисперсионный анализ (ANOVA) или критерий Краскела–Уоллиса; взаимосвязи оценивали коэффициентом корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$. Такой подход обеспечивает выбор метода, адекватного природе каждого показателя, и снижает вероятность ошибочных выводов.

Результаты. Разработанный протокол формирует унифицированную систему получения количественных, воспроизводимых и сопоставимых данных на трёх уровнях: клеточном (экспрессия CD3, CD20, CD68, Caspase-3, CD138), тканевом (морфометрия зон тимуса и селезёнки, доля коллагена) и системном (гематологический и иммунобиохимический профиль). Кодированная «слепая» оценка и нормирование относительно интактных (контрольных) референсных показателей позволяют относить выявленные различия к действию микобактериального фактора и возраста. Единая аппаратно-программная база (QuPath) обеспечивает высокую воспроизводимость цифровой морфометрии и иммуногистохимического скоринга.

Обсуждение. Предложенный протокол устраняет ряд типичных методических ограничений морфологических исследований лимфоидных органов. Во-первых, одновременное изучение тимуса и селезёнки в рамках единого протокола отражает целостную ось «центральный – периферический иммунитет», тогда как раздельное изучение органов не позволяет оценить их сопряжённую реакцию [6]. Во-вторых, включение возрастного фактора (4 и 9 мес) разделяет эффекты микобактериального воздействия и возрастной инволюции тимуса [10, 14]. В-третьих, цифровая морфометрия и иммуногистохимический скоринг в QuPath снижают субъективность визуальной оценки и повышают воспроизводимость [3, 11]. В-четвёртых, обоснование объёма выборки двумя независимыми методами и корректный выбор статистических критериев повышают доказательность результатов [5, 7].

Ограничения исследования. Использован единый срок наблюдения (1 мес), отражающий ранние изменения; авирулентный штамм H37Ra моделирует иммунно-воспалительный, а не деструктивно-инфекционный компонент; для исключения влияния полового цикла исследованы только самцы. Эти ограничения следует учитывать при экстраполяции данных и планировании последующих исследований с несколькими сроками наблюдения.

Заключение. Представленные экспериментальная модель микобактериального воздействия и стандартизированный комплексный морфологический протокол обеспечивают объективную, воспроизводимую и статистически обоснованную оценку структурных, гистохимических, иммуногистохимических и системных изменений тимуса и селезёнки. Данный методический подход служит надёжной основой для сравнительного анализа контрольных и опытных групп разного возраста и может быть рекомендован для экспериментально-морфологических исследований иммунных органов.

Литература:

1. Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А. Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адъюванта Фрейнда // Биомедицина. 2019;15(2):75–87. doi: 10.33647/2074-5982-15-2-75-87.
2. Axmedova Sh.M. Investigation of thymus changes after traumatic brain injury using immunohistochemical markers (CD-68) // Doktor axborotnomasi. 2024;4(116):10–13.
3. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., et al. QuPath: open source software for digital pathology image analysis // Sci Rep. 2017;7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5. PMID: 29203879.
4. 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. PMID: 11739546.
5. Charan J., Kantharia N.D. How to calculate sample size in animal studies? // J Pharmacol Pharmacother. 2013;4(4):303–306. doi: 10.4103/0976-500X.119726. PMID: 24250214.
6. Dzhalilova D.Sh., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Zolotova N.A., Tsvetkov I.S., Mkhitarov V.A., 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 // Int J Inflam. 2019;2019:7584685. doi: 10.1155/2019/7584685.
7. Festing M.F.W., Altman D.G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals // ILAR J. 2002;43(4):244–258. doi: 10.1093/ilar.43.4.244. PMID: 12391400.
8. Ismail C.A.N., Noh A.S.M., Tan D.C., Khir N.A.M., Shafin N. A review on complete Freund's adjuvant-induced arthritic rat model: factors leading to its success // IIUM Med J Malays. 2022;21(4). doi: 10.31436/imjm.v21i4.2026.
9. Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C., et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research // PLoS Biol. 2010;8(6):e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412. PMID: 20613859.
10. Kodama R., Okazaki T., Sato T., et al. Age difference in morphology and immunohistology in the thymus and spleen in rats // J Toxicol Pathol. 2012;25(1):55–61. doi: 10.1293/tox.25.55. PMID: 22481859.
11. Mehrvar S., Maisonave K., Buck W., Guffroy M., Bawa B., Himmel L. Immunohistochemistry-free enhanced histopathology of the rat spleen using deep learning // Toxicol Pathol. 2025. doi: 10.1177/01926233241303907. PMID: 39726256.
12. Noh A.S.M., Chuan T.D., Khir N.A.M., et al. Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis // PLoS One. 2021;16(12):e0260423. doi: 10.1371/journal.pone.0260423. PMID: 34879087.
13. Percie du Sert N., Hurst V., Ahluwalia A., et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research // PLoS Biol. 2020;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410. PMID: 32663219.
14. Turdiyev M.R., Teshayev Sh.J., Sokhibova Z.R. Morphofunctional features of the thymus of white rats depending on age periods in alimentary selenium

deficiency // Am J Med Med Sci. 2026;16(1):50–53. doi: 10.5923/j.ajmms.20261601.13.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И СТАНДАРТИЗИРОВАННЫЙ КОМПЛЕКСНЫЙ ПРОТОКОЛ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ, МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ТИМУСА И СЕЛЕЗЁНКИ

Тоиров О.А.

Резюме. *Цель: представить экспериментальную модель микобактериального воздействия на основе полного адъюванта Фрейнда и стандартизированный комплексный протокол одновременной морфологической, гистохимической, морфометрической, иммуногистохимической и гематологической оценки тимуса и селезёнки у крыс с учётом возрастного фактора. Материал и методы: исследование выполнено на 80 белых беспородных крысах-самцах, распределённых на четыре группы (интактные и опытные в возрасте 4 и 9 мес, по 20 животных); объём выборки обоснован методом ресурсного уравнения и расчётом статистической мощности. Микобактериальное воздействие моделировали однократным введением полного адъюванта Фрейнда (M. tuberculosis H37Ra, 0,2 мл). Применяли окраску гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, серебрение по Гомори, цифровую морфометрию в QuPath 0.5.1, иммуногистохимическую панель (CD3, CD20, CD68, Caspase-3, CD138), гематологический и иммунобиохимический анализ, параметрические и непараметрические методы статистики. Результаты: протокол формирует единую систему количественных данных на клеточном (экспрессия иммуногистохимических маркёров), тканевом (морфометрия зон тимуса и селезёнки, доля коллагена и ретикулярных волокон) и системном (показатели крови) уровнях; «слепая» оценка кодированных препаратов и нормирование относительно интактных групп позволяют относить различия к действию микобактериального фактора и возраста. Заключение: предложенные модель и протокол обеспечивают объективную, воспроизводимую и статистически обоснованную оценку изменений тимуса и селезёнки и могут быть рекомендованы для экспериментально-морфологических исследований иммунных органов.*

Ключевые слова: *экспериментальная модель, адъювант Фрейнда, тимус, селезёнка, морфометрия, иммуногистохимия, QuPath, статистический анализ, обоснование объёма выборки.*