

© Пальчик В.В., Кабалей А. В., Шинкевич В.І., Шликова О.А.

УДК:616.24:599.323.4:612.08

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2023.27.1-2.05>

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГЕНЬ У ЛАБОРАТОРНИХ BALB/C МИШЕЙ

Пальчик В.В., Кабалей А. В., Шинкевич В.І., Шликова О.А.

Полтавський державний медичний університет, Полтава, Україна

Обґрунтування. Порівняння перебігу експериментальних патологічних станів у мишей з патологією людини передбачає глибоке знання морфології легень мишей. І хоча доцільно отримувати патоморфологічні висновки від досвідченого патолога, насправді це не завжди можливо. Тому багато науковців повинні власноруч проводити такий аналіз. Мета. Вивчення та опис нормальної морфології легень BALB/c мишей для удосконалення характеристики фенотипів експериментально індукованих уражень. Матеріали та методи. В дослідження були включені 10 здорових мишей самців BALB/c, віком 8 тижнів, які утримувались в індивідуальних умовах з необмеженим доступом до корму і води. Евтаназію тварин здійснювали інгаляцією етилового ефіру. Некропсію легень здійснювали шляхом інфузії через трахею 10% нейтральним забуференим формаліном. Дослідження проводили на парафінових зрізах 3 мкм, частини лівої легені або однієї з правих долей. Зрізи забарвлювали гематоксиліном-еозинном, Шифф-йодною кислотою та за Маллорі. Морфологію аналізували за допомогою світлового мікроскопу. Результати. Використаний метод евтаназії інгаляцією етиловим ефіром не викликає агональні зміни в легенях. Фіксація через інфузію формаліном через трахею запобігає колапсу легень і забезпечує оптимальну морфологію. Для дослідження експериментальної патології людини оптимально досліджувати ліву долю легень, її орієнтування для отримання зрізів – поздовжнє, має велике значення. Засліплений спосіб опису мікропрепаратів не завжди надає найкращий результат. Навколо великих артерій легень спостерігаються відкладення колагену у зовнішньому шарі; келихоподібні клітини зустрічаються рідко, і тільки у великих бронхах; бронхо-асоційована лімфоїдна тканина (БАЛТ) ледь помітна у здорових легенях миші. Природні патогени миші можуть змінювати фізіологію господаря, роблячи його непридатним для багатьох експериментальних цілей, і хоча кількість і поширеність цих патогенів значно знизилася, багато з них можуть виявлятися у лабораторних тварин і є небажаними в дослідженнях. Висновок. Лабораторні BALB/c миші можуть страждати від фонових хвороб та станів, не залежно від задовільних умов утримання, харчування та експериментальної патології, що слід враховувати у плануванні й описі у дослідженнях.

Ключові слова: BALB/c миші, легені, гістологія, патоморфологія, некропсія, експериментальна патологія.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LUNGS IN LABORATORY BALB/C MICE

Palchuk V. V., Kabalei A. V., Shynkevych V. I., Shlykova O. A.

Poltava State Medical University, Poltava, Ukraine

Substantiation. Comparing the course of experimental pathological conditions in mice with human pathology requires deep knowledge of the morphology of the lungs of mice. Although it is advisable to obtain pathomorphological conclusions from an experienced pathologist, in reality, this is not always possible. Therefore, many scientists have to conduct such an analysis by themselves. The aim of the research was to study and describe the normal lung morphology of BALB/c mice for the improved characterization of phenotypes of experimentally induced lesions. Materials and methods. The study included 10 healthy male BALB/c mice, 8 weeks old, housed in individual conditions with unlimited access to food and water. Animals were euthanized by inhalation of ethyl ether. The lung necropsy was performed by tracheal infusion with 10% neutral buffered formalin. The research was carried out on paraffin sections of 3 μm, part of the left lung or one of the right lobes. Sections were stained with hematoxylin-eosin, Schiff-iodic acid, and according to Mallory. Morphology was analyzed using a light microscope. Results. The applied method of euthanasia by inhalation with ethyl ether does not cause agonal changes in the lungs. Fixation by tracheal formalin infusion prevents lung collapse and ensures optimal morphology. For the study of experimental human pathology, it is optimal to examine the left lobe of the lungs, with its longitudinal orientation for obtaining sections, which is of great importance. A blinded way of describing microspecimens does not always provide the best result. Collagen deposits in the outer layer are observed around the large arteries of the lungs; goblet cells are rare, and only in large bronchi. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is barely visible in healthy lungs of mice. Natural mouse pathogens can alter the physiology of the host, making it unsuitable for many experimental purposes, and although the number and prevalence of these pathogens have decreased significantly, many of them can be found in laboratory animals and are undesirable in research. Conclusion. Laboratory BALB/c mice may suffer from background diseases, regardless of satisfactory housing conditions, nutrition, and experimental pathology, which should be considered in the design and description of studies.

Key words: BALB/c mice, lungs, histology, pathomorphology, necropsy, experimental pathology.

Вступ

Дослідження патоморфологічних змін легень при експериментальному моделюванні патологій людини вимагає глибоких знань будови легень у лаборатор-

них тварин. Найчастіше при проведенні токсикологічних, імунологічних досліджень використовують дрібних гризунів, зокрема мишей. Порівняння перебігу експериментальних патологічних станів у мишей з патологією людини передбачає глибоке знання морфо-

логії легень мишей. Як відмічено в сучасній літературі, існує брак спеціально підготованих патологів, спеціалізованих на оцінці тканин миші не тільки в Україні, але і у світі [39]. І хоча доцільно отримувати патоморфологічні заключення від досвідченого патолога, насправді це не завжди можливо. Тому багато науковців повинні власноруч проводити такий аналіз.

Миші BALB/c поширені по всьому світу та входять до п'яти найбільш широко використовуваних інбредних ліній у біомедичних дослідженнях, зокрема в імунології, дослідженнях інфекційних захворювань, канцерогенезу та серцево-судинних захворювань [31].

Важливість морфологічного опису легень миші пояснюється тим, що численні моделі індукованої інфекційної [15, 23, 24, 49], алергічної [7, 12, 30], токсичної патології, захворювань та їх лікування [25, 28, 37] має обов'язкові прояви саме в дихальній системі. При цих експериментальних дослідженнях виконується оцінка легень мишей, яка не відповідає оцінці легень людини, має інші закономірності та морфологічні особливості.

Отже, нормальна морфологія легень миші разом з поширеними анатомічними варіаціями, артефактами та фоновими ураженнями є важливим питанням для вирішення експериментально індукованих уражень. Тому метою роботи було вивчення та опис нормальної морфології легень BALB/c мишей для удосконалення характеристики фенотипів експериментально індукованих уражень.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження погоджені Комісією з питань біомедицини етики ПДМУ (Витяг з протоколу засідання комісії №1776 від 27.11.2019) і проведені згідно норм Гельсінської Декларації 1975р., ревізованої у 2013р. Робота є фрагментом НДР №ДР 0122U201686 «Розробка методики лікування та профілактики розвитку фіброзу легень шляхом активації PPAR-гамма рецепторів», і окремих фрагмент опублікований раніше [11].

В дослідження були включені 10 здорових мишей самців BALB/c, віком 8 тижнів, які утримувались в індивідуальних умовах з необмеженим доступом до корму і води.

Евтаназію тварин здійснювали інгаляцією етилового ефіру. Після вскриття грудної порожнини виконували некропсію легень, інфузували їх через трахею 10% нейтральним забуференим формаліном при постійному тиску 30 см H₂O, забезпечуючи рівномірне розширення легеневої паренхіми [3], після цього легень занурювали у 10% нейтральний забуферений формалін на, щонайменше, 24 годин. Після фіксації, частину лівої легень або одну з правих долей заливали в парафін, виготовляли зрізи товщиною 3 мкм, які забарвлювали гематоксиліном-еозинном, Шифф-йодною кислотою (Periodic acid-Schiff, PAS) та за Маллорі. Морфологію аналізували за допомогою світлового мікроскопу Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Göttingen, Німеччина). Всі біопсії описував один той самий морфолог без засліплення стосовно належності.

Результати та їх обговорення

Метод евтаназії впливає на морфологію легень мишей. Евтаназія вуглекислим газом є швидкою і гуманною формою для мишей старше семи днів [16], але може призвести до значної агональної кровотечі, яка може ускладнити мікроскопічне дослідження легень. Цервікальна дислокація вперше була схвалена для евтаназії мишей у 1972 році AVMA Panel on Euthanasia [6], але недоліком є пошкодження тканин в ділянці шиї і вивільнення великої кількості крові в по-

рожнини тіла [16]. Загалом агональний крововилив і застій в судинах, поширені в легенях мишей. Від патологічного крововиливу відрізняється відсутністю пігментованих макрофагів (рис.1, Б), які вказують на хронічний процес, або запалення.

Метод інгаляції етилового ефіру, який було використано у цьому дослідженні, не викликає агональний крововилив і застій в судинах легень. І ще один спосіб запобігти притоку крові до основи легень – знекровлення тварин шляхом перерізання каудальної порожнистої вени [3].

Некропсія є фундаментальною частиною процесу дослідження, і важливо, щоб у кожній лабораторії, де проводяться дослідження на тваринах, відповідальні за некропсію або патологоанатомічне дослідження були навчені виконувати повну некропсію миші, зокрема легень.

Ми проаналізували 68 джерел бази даних PubMed за ключовими словами «mouse lung necropsy (некропсія легень миші)» за останні 5 років, серед яких виявили 37 відповідних робіт, які включали морфологічне дослідження легень мишей, і 15 публікації в яких описано інфузію забуференим нейтральним формаліном при некропсії та фіксації легень [2, 8, 10, 18, 19, 22, 34, 35, 38, 50, 41, 42, 43, 51, 52], та 4 роботи де використано перфузію крізь лівий шлуночок серця або судини для збереження об'єму легень [4, 5, 10, 40]. Отже, тільки у 51% робіт зазначено конкретну процедуру по попередженню колапсу легень.

Інтратрахеальна інфузія 10% формаліном вимагає досвіду патолога, оскільки може призводити до артефактів зміщення альвеолярних макрофагів, або розрідження інфільтратів.

Метод перфузії (введення фіксатора в судинне русло) виключає можливість виявити зміни у судинах. Цей метод використовують для забезпечення мінімальних аутолітичних змін та максимального збереження морфології й утримання антигенів у тканинах. При нетренованому виконанні створює більше артефактів, ніж приносить користі. Існує кілька технік, найпростіша з яких з мінімальним додатковим приладдям включає підготовку двох шприців по 10 мл, один з яких містить фізіологічний розчин, а інший містить фіксатор на вибір (зазвичай 10% нейтральний забуферений формалін). Мишу анестезують за допомогою перитонеальної ін'єкції пентобарбіталу (0,1 мл/10 грам ваги миші), оголюють яремні нижче слинної залози і відкривають грудну порожнину. Потім розрізають яремні вени і шприц із фізіологічним розчином вводять у лівий шлуночок серця (якщо ввести розчин у правий шлуночок – легень не перфузуються). Серце перфузують фізіологічним розчином до видимого виливання з перерізанних яремних вен. Після введення 4–8 мл фізіологічного розчину, процедуру повторюють із фіксатором. Органи твердіють і набувають сірого кольору [39].

Ще один метод уникнення артефактів спадіння легень, полягає в роздуванні легень повітрям до об'єму, що дорівнює загальній ємності легень. Потім легень поміщають у фосфатно-сольовий буфер і легеневу тканину фіксують протягом 4 хв. при 60°C в мікрохвильовій печі [47], але, за результатами пошуку, останні 5 років не згадується широко.

Ми використали інфузію-фіксацію легень через трахею під тиском 30 см 10% забуференим нейтральним формаліном протягом години з наступним зануренням у контейнер з 10% забуференим нейтральним формаліном на 48 годин [52]. Макропрепарат після інфузії продемонстровано на рис. 1, А).

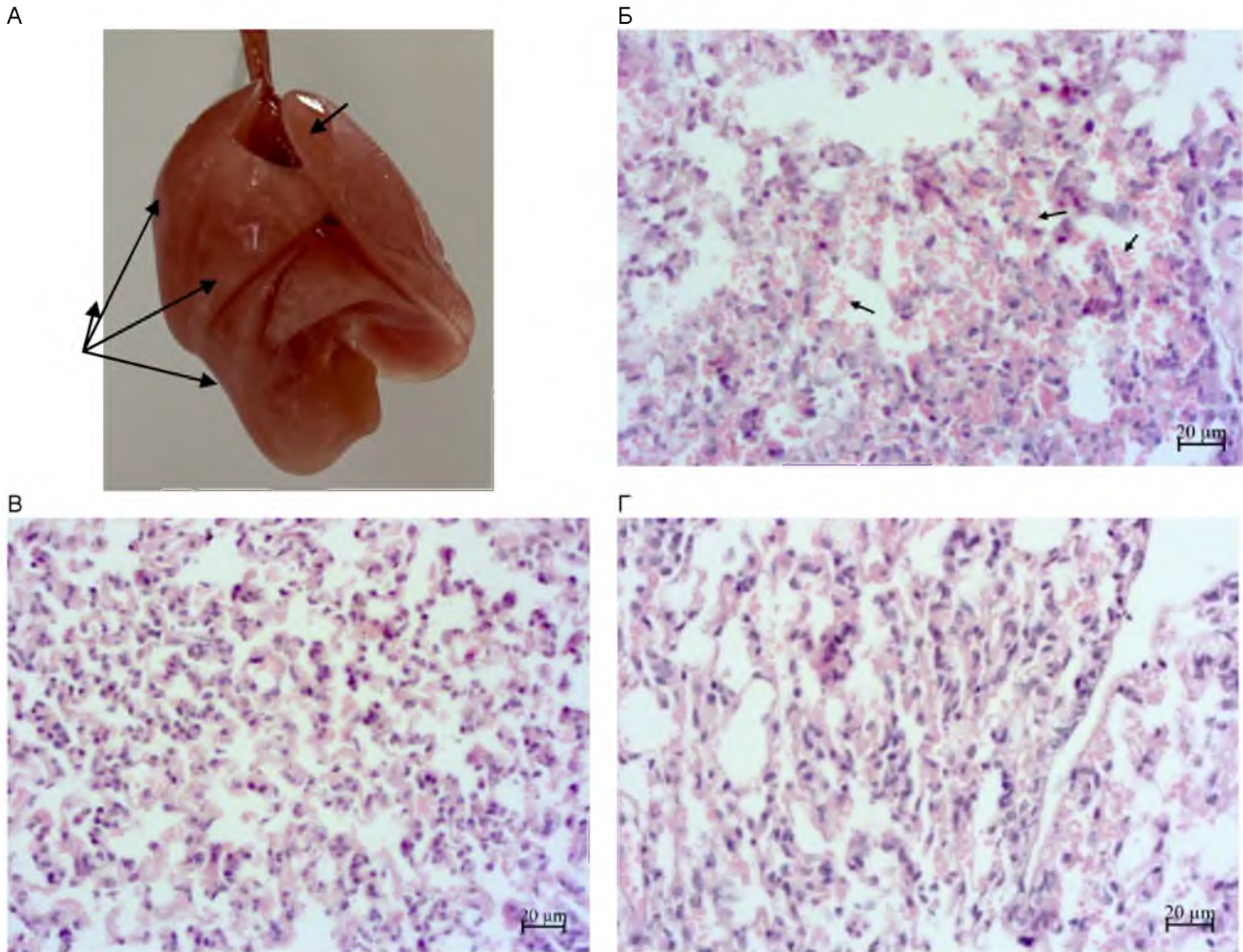


Рис. 1. Макропрепарат інфузованих легень миші на етапі їх фіксації та гістологічна картина поширених артефактів, пов'язаних з колапсом. Забарвлення: гематоксилін та еозин.

А. Макропрепарат легень миші, інстальований формаліном (права доля (1), ліва доля(2).

Б. Агональний крововилив в легені миші (стрілками позначені еритроцити).

В. Ділянка колапсу альвеолярної тканини легені, що має гістологічний вигляд багатоклітинності.

Г. Ділянка артефактного пошкодження легені внаслідок необережної некропсії.

При дослідженні розвитку пухлини передбачений аналіз всього органоконструкції трахеї з легеньми [24]. Але дослідження моделі хвороб людини, таких як астма або тестування інгаляційних медикаментів, можуть обмежуватися відбором лише частини долей легень миші як описано [23]. Ми досліджували частину лівої легені та одну з трьох основних долей правої легені.

Тканини легень вимагають обережності при некропсії внаслідок ризиків колапсу та пошкодження пінцетом, що призводить до дефектів, які не усуваються під час подальшої заливки в парафін (рис.1, Г). Оскільки легені на 90% складається з повітря і на 10% з власне тканин легень, то при поміщенні у фіксатор, настає колапс, дефляція та відбувається руйнування легеневої тканини, що призводить до гістопатологічного вигляду, який нагадує інтерстиційну пневмонію і створює враження потовщення альвеолярних перетинок та гіперклітинності [48] (рис.1, В), що може ускладнювати опис.

Отже, інтратрахеальна інфузія легень 10% нейтральним забуференим формаліном [3] є адекватним методом для більшості гістологічних досліджень і забезпечує оптимальну патоморфологічну деталізацію легень.

Забарвлення препаратів гематоксиліном та еозином достатньо для рутинного гістологічного дослідження легень, але PAS-реакція може бути корисною для дослідження таких змін, як гіперплазія келихоподібних слизових клітин респіраторного епітелію [44], а забарвлення за Массоном та за Маллорі рекомендується для виявлення колагену при фіброзі [14].

Ми використали у дослідженні забарвлення за Маллорі для візуалізації колагенових волокон (рис. 2 А, Б) і PAS-реакцію – для ідентифікації слизових клітин у бронхіальному епітелії (рис. 2 В, Г).

Рішення про те, чи оцінювати мікропрепарати із засліпленням чи відкритим шляхом є суперечливим [39]. При токсикологічній патології, опис «всліпу» розглядається недоцільним, і вказівки щодо найкращої практики не рекомендують засліпений опис мікропрепаратів [9, 33]. На це є ряд причин але, загалом, для кваліфікованих патологів, засліпений опис, як правило, суперечить їхньому навчанню, яке, задля уникнення претензій щодо недбалої практики, вимагає від них інтегрувати мікроскопічні дані з усіма іншими доступними джерелами інформації (включаючи, але не обмежуючись деталями експериментального протоколу, спостереженням за життям тварини, макроскопічною інформацією, даними клінічної патології,

змiнами ваги органiв), щоб отримати найкращу iнтерпретацiю [17]. Заслiплення може зменшити ймовiрнiсть iдентифiкацiї будь-яких змiн, особливо тих, що представляють собою вiдхилення вiд «нормальних» фонових результатiв [33]. Крім того, «заслiплення» стосовно належностi до певної групи або лiкування може бути ефективно та швидко розкрите за рахунок

очевидних змiн тканин пiд час дослiдження. Отже, якщо немає поважної причини, зазвичай не слiд рекомендувати слiпий опис мiкропрепаратiв, оскiльки це навряд чи дасть найкращий результат. У цiй роботi всi бiопсiї описував один той самий морфолог без заслiплення стосовно належностi.

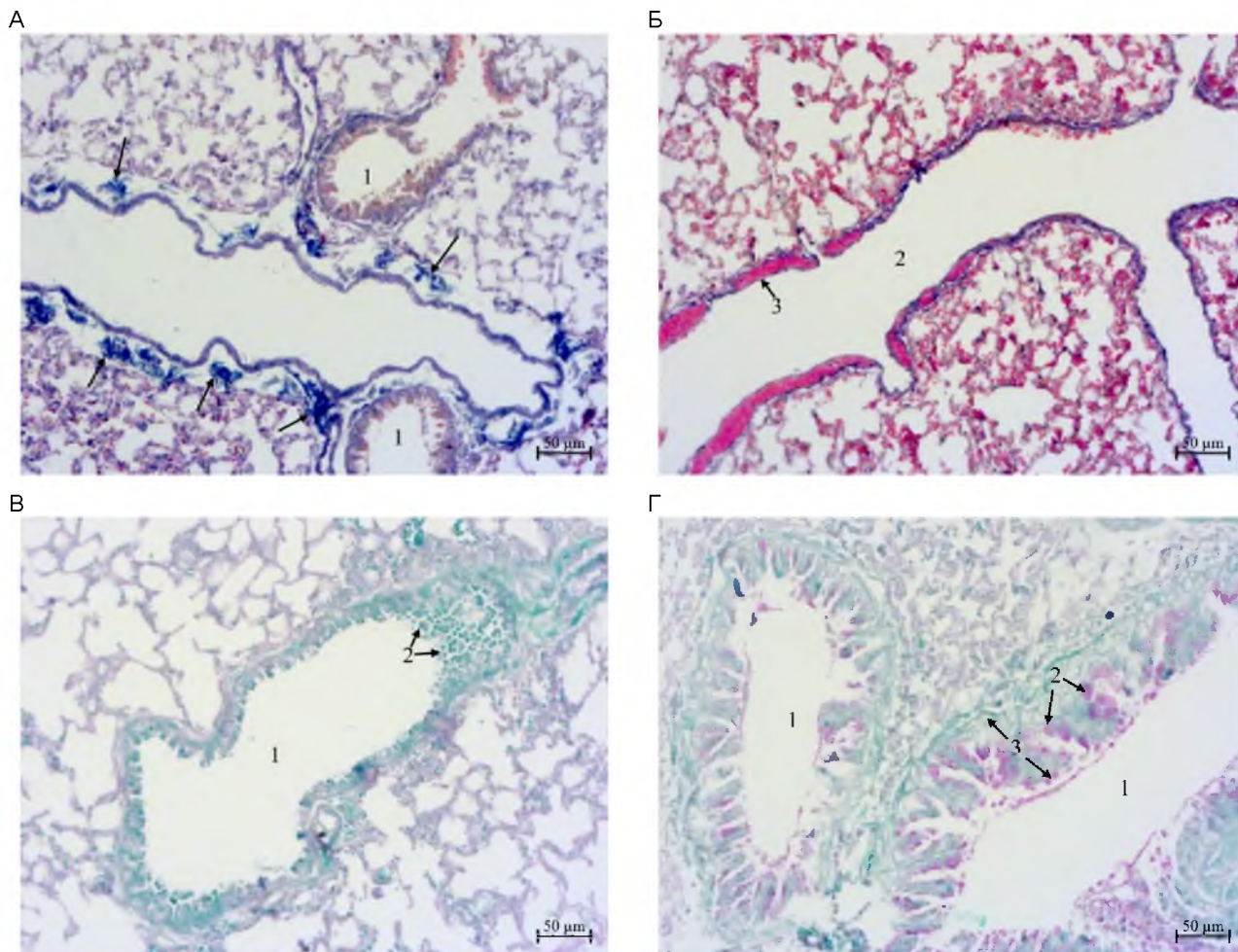


Рис. 2. Візуалізація колагенових структур та слизових клітин в легенях мишей.
А. Колагенові відкладення (стрілки) в зовнішньому шарі легеневої артерії, яка розпізнається за розташуванням у бронхосудинному пучку; просвіт бронхів (1). Забарвлення за Маллорі.
Б. Легенева вена (2), яка по мірі дисталізації втрачає м'язовий шар (3); забарвлення за Маллорі.
В. Негативна PAS-реакція в бронхіальному епітелії (стрілки); просвіт бронхів (1); цитоплазматичні бульбашки клітин Клара (2); контрастування світлим зеленим.
Г. Келихоподібні клітини зі слизом, позитивні за PAS-реакцією (2) в гіпертрофованому бронхіальному епітелії (3); просвіт бронхів (1); контрастування світлим зеленим.

Легені миші BALB/c складаються з шести часток: лівої верхівкової, лівої діафрагмальної, правої верхівкової, правої серцевої, правої медіальної та правої діафрагмальної (як і в інших мишей) [1, 27] (рис. 1, А). Трахея дає початок двом головним бронхам. Термін «бронх» стосується дихальних шляхів нижче трахеї, стінки яких містять хрящ, гладку мускулатуру і підслизові залози [36]. Позалегенові бронхи у миші мають хрящові кільця а внутрішньо легеневі - ні. Бронхи діляться на вторинні бронхи, потім бронхіоли, термінальні бронхіоли і альвеолярні протоки. У легенях миші термінальна бронхіола веде безпосередньо до альвеолярної протоки без вирізнення респіраторних бронхіол [45]. На відміну від дослідження легень людини, рекомендується класифікувати бронхи у мишей за діаметром радше, ніж за порядком розгалуження [27].

На (рис. 2 А, В, Г) та (рис. 3 А, В, Г) продемонстровано внутрішньо легеневі бронхи різних діаметрів, з різним рівнем розвитку епітелію і при різному збільшенні, які добре візуалізуються. Такі утворення як бронхосудинний пучок є орієнтиром для розпізнавання легеневих судин (рис. 2, А).

Слизова оболонка бронхів вистелена стовпчастим, миготливим епітелієм і клітинами Клара, підслизові залози відсутні [36]. Стовпчастий епітелій великих дихальних шляхів представлений переважно нестійкими клітинами Клара, війчастими клітинами, нейроендокринними клітинами, слизовими келихоподібними клітинами та щітинковими клітинами [39]. Епітелій бронхів змінюється від стовпчастого до кубічного по мірі дисталізації бронхіального дерева зі збільшенням присутності клітин Клара.

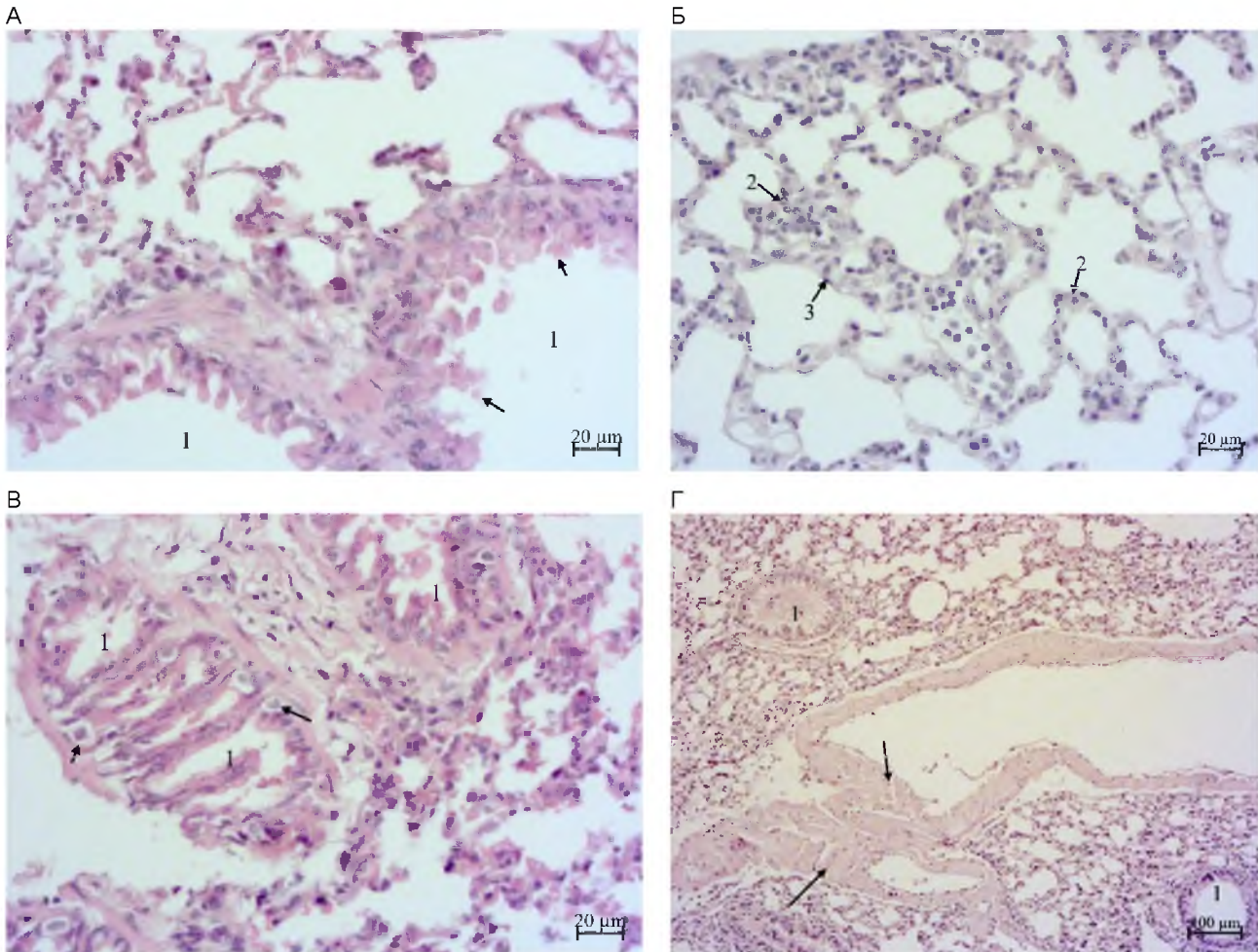


Рис. 3. Морфологічні особливості легень мишей. Забарвлення: гематоксилін та еозин.

А. Цитоплазматичні бульбашки клітин Клара (стрілки); просвіт бронхів (1).

Б. Пневмоцити 2 типу, які помітними при гіперплазії (2) та міофіброласти (3) в стінках альвеол.

В. Альвеолярні макрофаги (стрілки), розташовані в сполучній тканині бронхів; просвіт бронхів (1).

Г. Міокардіоцити (стрілки) у стінках великих легеневих вен миші; просвіт бронхів (1).

Нам вдалося продемонструвати, що у термінальних відділах бронхів слизові клітини в нормі відсутні (рис.2 В, Г), а епітелій переважно представлений клітинами Клара, які мають характерні апікальні цитоплазматичні бульбашки (рис. 3, А), які можна також побачити і при менших збільшеннях (рис. 2, В).

Таким чином, для оцінки гіпертрофії келихоподібних слизових клітин, важливо слідувати гістологічним правилам орієнтування легень при отриманні зрізів – це поздовжні зрізи всіх великих долей [39], що дозволяє отримати оптимальну репрезентацію бронхів різного калібру.

Респіраторна частина дихальних шляхів складається з альвеолярних протоків і альвеол. Альвеолярні протоки вистелені пневмоцитами 1 типу, а альвеоли відгалужуються безпосередньо від стінок. Альвеолярний епітелій утворений плоскими пневмоцитами 1 типу і кубоподібними пневмоцитами 2 типу. Пневмоцити типу 1 беруть участь у газоподібному обмін, тоді як пневмоцити типу 2 виробляють сурфактант.

На рисунку. 3, Б можна ідентифікувати пневмоцити 2 типу (2), які важко визначити в нормальних легенях, але вони стають помітними при гіперплазії; а також міофіброласти (3), які в стінках альвеол контролюють альвеолярний об'єм.

Альвеолярні макрофаги вільно лежать в альвеолярному просторі і відповідають в загальних рисах за поглинання стороннього матеріалу в легенях. Деякі альвеолярні макрофаги можуть бути розташовані в сполучній тканині всіх дихальних шляхів. На рисунку 3, В добре візуалізуються макрофаги, локалізовані субепітеліально в бронхах.

Легеневі вени підтримуються характерними м'язовими клітинами міокарда (стрілки), які можна розпізнати на зрізах, забарвлених гематоксилін-еозином [1, 28], що пов'язують з кардіоміогенезом [1, 20].

На рисунку 3, Г продемонстровано м'язовий шар великої легеневої вени, який схожий на міокард. По мірі дисталізації вен, м'язовий шар стінки втрачається, але посилюються колагенові структури (рис. 2, Б).

Лімфоїдні агрегати виявляють в тканинах середостіння нормальних мишей і навколо плеври. На рисунку 4, А добре візуалізується лімфоїдне скупчення, не пов'язане з тканиною легені, і розташоване уздовж зовнішнього краю легені, який утворює увігнутість у вигляді внутрішньої складки, де розташовувалась плевра або фрагмент середостіння.

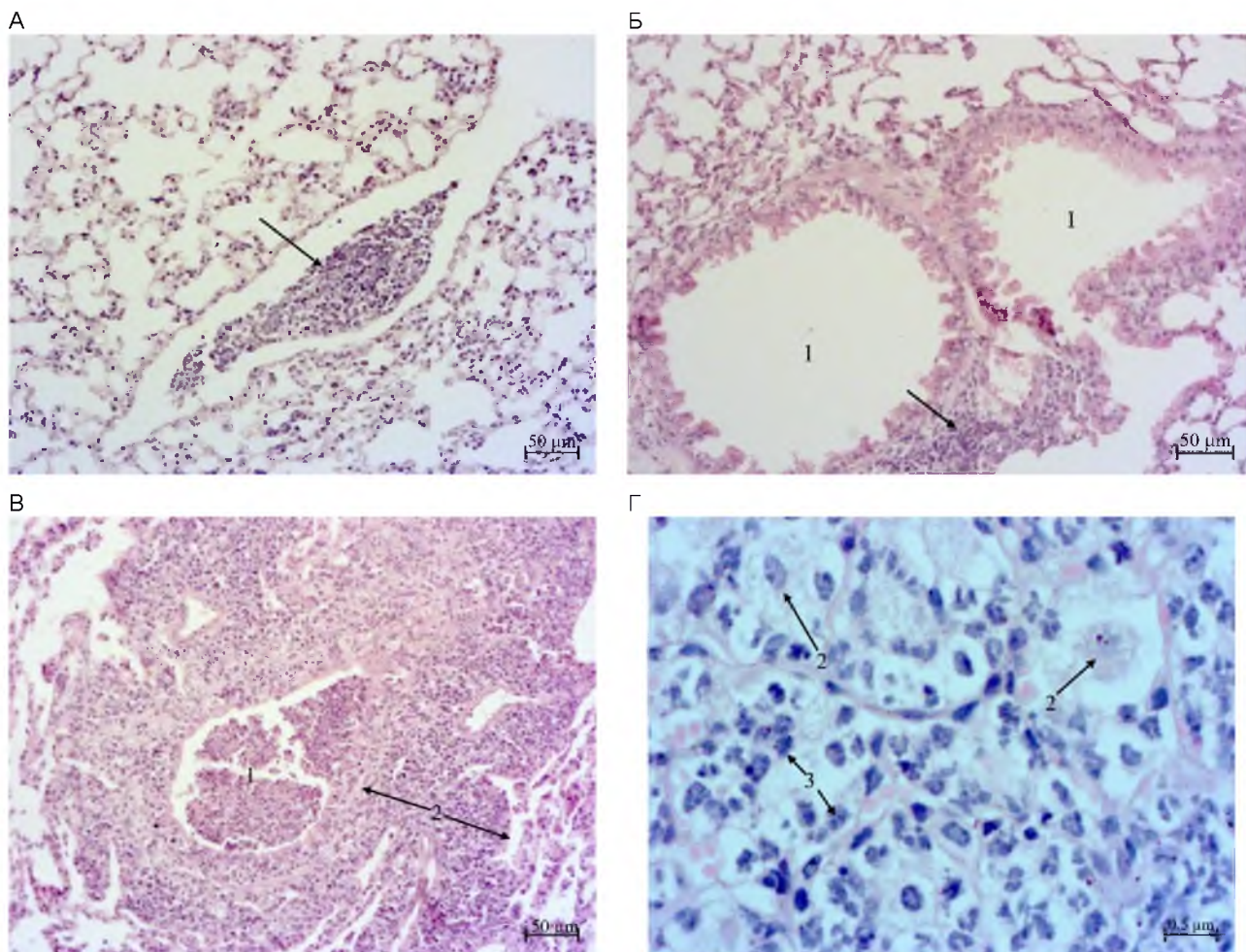


Рис. 4. Поширена фоновна патологія легень BALB/c мишей. Забарвлення: гематоксилін та еозин.
 А. Лімфоїдний агрегат (стрілка), асоційований із фрагментом плеври або середостіння.
 Б. Асоційована з бронхами лімфоїдна тканина (стрілка), яка ледь помітна у здорових легнях миші; просвіт бронхів (1).
 В. Помітно збільшена лімфоїдна тканина, асоційована з бронхами (2) при респіраторній інфекції; просвіт бронху, заповнений клітинним інфільтратом (1).
 Г. Макрофаги та ексудат заповнюють альвеоли (2), інфільтрація нейтрофілами (3) при пневмонії.

Лімфоїдна тканина в легенях називається бронхо-асоційована лімфоїдна тканина (БАЛТ) і ледь помітна у здорових легнях миші. Але БАЛТ стає помітною при респіраторних інфекціях, зокрема вірусних. На рисунку 4 Б, В продемонстровано БАЛТ поруч із нормальними бронхами і при, імовірно, природним вірусом мишей, для порівняння.

Дослідники, які використовують мишей, (та інших тварин) у біомедичних експериментах, повинні знати про глибокі наслідки, які багато з цих агентів можуть робити на дослідження.

Лабораторні миші можуть бути носіями різних вірусних, бактеріальних, паразитарних та грибкових патогенів та джерелом зараження людини [21]. Часто ці мікроорганізми не викликають очевидних ознак захворювання. Однак багато природних патогенів цих лабораторних тварин можуть змінювати фізіологію господаря, роблячи його непридатним для багатьох експериментальних цілей. Хоча кількість і поширеність цих патогенів значно знизилася, багато з них, як і раніше, виявляються у лабораторних тварин і є небажаними в дослідженнях.

Вірус Сендай (SV) є одним з важливих патогенів мишей і щурів [32]. При поширенні у легені викликає вогнищеву інтерстиціальну пневмонію, при якій запалення та гіперпластичні зміни найбільш виражені навколо термінальних бронхіол, на відміну від інфекції *Mycoplasma pulmonis*, яка вражає більш проксимальні дихальні шляхи. Легені вогнищеву почервонілі. Відмінною ознакою SV-інфекції є транзиторна гіпертрофія, некроз і відновлення епітелію дихальних шляхів, коли вірус спускається по дихальних шляхах. Відновлення епітелію дихальних шляхів призводить до гіперплазії епітелію, плоскоклітинної метаблазії та утворення си-циціальних клітин [32].

Але *Mycoplasma pulmonis*, безсумнівно, є одним із найважливіших патогенів, що інфікують лабораторних щурів і мишей, і є причиною респіраторного мікоплазмозу мишей. Інфікування *Mycoplasma pulmonis* може бути моделлю цієї інфекції [37].

Pneumocystis carinii вважають одним з природних збудників лабораторних тварин [13]. Інфекція *P. carinii* є поширеною у імуноскомпрометованих штамів мишей і може призводити до макроскопічних уражень у вигляді гумової консистенції легень, неспроможності їх до колапсу і мультифокальних білих ділянок на поверхні легень [46].

Репрезентативна патогістологічна картина пневмонії, викликана, імовірно, *P. carinii* наведена на рисунку.4, Г.

Звичайно, хворі тварини не можуть представляти контрольну чи референтну групу і вилучаються з дослідження.

Висновок

Таким чином, лабораторні BALB/c миші можуть страждати від фонових хвороб та станів, не залежно від задовільних умов утримання, харчування та експериментальної патології, що слід враховувати у плануванні й описі у дослідженнях.

Література

- Barthold S.W., Griffey S.M., Percy D.H. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits, 4th Ed. Wiley-Blackwell, 2016. 384 p.
- Blázquez-Prieto J, Huidobro C, López-Alonso I, Amado-Rodríguez L, Martín-Vicente P, López-Martínez C, et al. Activation of p21 limits acute lung injury and induces early senescence after acid aspiration and mechanical ventilation. *Transl Res.* 2021;233:104-116. doi: 10.1016/j.trsl.2021.01.008.
- Braber S, Verheijden KA, Henricks PA, Kraneveld AD, Folkerts G. A comparison of fixation methods on lung morphology in a murine model of emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(6):L843-51. doi: 10.1152/ajplung.00192.2010.
- Buehler PW, Swindle D, Pak DI, Ferguson SK, Majka SM, Karoor V, et al. Hemopexin dosing improves cardiopulmonary dysfunction in murine sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* 2021;175:95-107. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.238.
- Buehler PW, Swindle D, Pak DI, Fini MA, Hassell K, Nuss R, et al. Murine models of sickle cell disease and beta-thalassemia demonstrate pulmonary hypertension with distinctive features. *Pulm Circ.* 2021;11(4):20458940211055996. doi: 10.1177/20458940211055996.
- Carbone L, Carbone ET, Yi EM, Bauer DB, Lindstrom KA, Parker JM, Austin JA, Seo Y, Gandhi AD, Wilkerson JD. Assessing cervical dislocation as a humane euthanasia method in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012;51(3):352-6.
- Casaro M, Souza VR, Oliveira FA, Ferreira CM. OVA-Induced Allergic Airway Inflammation Mouse Model. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:297-301. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_28.
- Chauhan PS, Wagner JG, Benninghoff AD, Lewandowski RP, Favor OK, Wierenga KA, et al. Rapid Induction of Pulmonary Inflammation, Autoimmune Gene Expression, and Ectopic Lymphoid Neogenesis Following Acute Silica Exposure in Lupus-Prone Mice. *Front Immunol.* 2021;12:635138. doi: 10.3389/fimmu.2021.635138.
- Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, Maronpot RR, Prater DA, Riley JH, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol.* 2004;32(1):126-31. doi: 10.1080/01926230490268756.
- Davenport ML, Sherrill TP, Blackwell TS, Edmonds MD. Perfusion and Inflation of the Mouse Lung for Tumor Histology. *J Vis Exp.* 2020;(162):10.3791/60605. doi: 10.3791/60605.
- Fedchenko T, Izmailova O, Shynkevych V, Shlykova O, Kaidashev I. PPAR- γ Agonist Pioglitazone Restored Mouse Liver mRNA Expression of Clock Genes and Inflammation-Related Genes Disrupted by Reversed Feeding. *PPAR Res.* 2022;2022:7537210. doi: 10.1155/2022/7537210.
- Fu Y, Wang Z, Lu B, Zhao S, Zhang Y, Zhao Z, et al. Immune response and differentially expressed proteins in the lung tissue of BALB/c mice challenged by aerosolized *Brucella melitensis* 5. *J Int Med Res.* 2018;46(11):4740-4752. doi: 10.1177/0300060518799879.
- Gigliotti F, Harmsen AG, Wright TW. Characterization of transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris through immunocompetent BALB/c mice. *Infect Immun.* 2003;71(7):3852-6. doi: 10.1128/IAI.71.7.3852-3856.2003.
- Gregory LG, Mathie SA, Walker SA, Pegorier S, Jones CP, Lloyd CM. Overexpression of Smad2 drives house dust mite-mediated airway remodeling and airway hyperresponsiveness via activin and IL-25. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(2):143-54. doi: 10.1164/rccm.200905-0725OC.
- Hao XY, Li FD, Lv Q, Xu YF, Han YL, Gao H. Establishment of BALB/C mouse models of influenza A H1N1 aerosol inhalation. *J Med Virol.* 2019;91(11):1918-1929. doi: 10.1002/jmv.25550.
- Hickman DL. Minimal Exposure Times for Irreversible Euthanasia with Carbon Dioxide in Mice and Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2022;61(3):283-286. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-21-000113.
- Holland T, Holland C. Unbiased histological examinations in toxicological experiments (or, the informed leading the blinded examination). *Toxicol Pathol.* 2011;39(4):711-4. doi: 10.1177/0192623311406288.
- Ihrle MD, Duke KS, Shipkowski KA, You DJ, Lee HY, Bonner-Just AJ, Bonner JC. STAT6-Dependent Exacerbation of House Dust Mite-Induced Allergic Airway Disease in Mice by Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanoimpact.* 2021;22:100309. doi: 10.1016/j.nano.2021.100309.
- Ihrle MD, Taylor-Just AJ, Walker NJ, Stout MD, Gupta A, Richey JS, et al. Inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes alters the pulmonary allergic response of mice to house dust mite allergen. *Inhal Toxicol.* 2019;31(5):192-202. doi: 10.1080/08958378.2019.1643955.
- Jones WK, Sánchez A, Robbins J. Murine pulmonary myocardium: developmental analysis of cardiac gene expression. *Dev Dyn.* 1994;200(2):117-28. doi: 10.1002/aja.1002000204.
- Kaidashev I, Lavrenko A, Baranovskaya T, Blazhko V, Digtar N, Dziublyk O, et al. Etiology and efficacy of antimicrobial treatment for community-acquired pneumonia in adults requiring hospital admission in Ukraine. *Acta Biomed.* 2022;93(2):e2022238. doi: 10.23750/abm.v93i2.13137.
- Kilburg-Basnyat B, Reece SW, Crouch MJ, Luo B, Boone AD, Yaeger M, et al. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators Regulate Ozone-Induced Pulmonary and Systemic Inflammation. *Toxicol Sci.* 2018;163(2):466-477. doi: 10.1093/toxsci/kfy040.
- Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, O'Sullivan MG, Roth DR, Wadsworth PF; RITA Group; NACAD Group. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol.* 2004;55(6):413-31. doi: 10.1078/0940-2993-00349.
- Lai WC, Linton G, Bennett M, Pakes SP. Genetic control of resistance to *Mycoplasma pulmonis* infection in mice. *Infect Immun.* 1993;61(11):4615-21. doi: 10.1128/iai.61.11.4615-4621.1993.
- Li L, Foo BJW, Kwok KW, Sakamoto N, Mukae H, Izumikawa K, Mandard S, et al. Antibody Treatment against Angiopoietin-Like 4 Reduces Pulmonary Edema and Injury in Secondary Pneumococcal Pneumonia. *mBio.* 2019;10(3):e02469-18. doi: 10.1128/mBio.02469-18
- Li X, Liu R, Cui Y, Liang J, Bi Z, Li S, et al. Protective Effect of Remdesivir Against Pulmonary Fibrosis in Mice. *Front Pharmacol.* 2021;12:692346. doi: 10.3389/fphar.2021.692346.
- Madl P, Hofmann W, Oldham MJ, Asgharian B. Stochastic morphometric model of the BALB/c mouse lung. *Anat Rec (Hoboken).* 2010;293(10):1766-75. doi: 10.1002/ar.21208.
- Mahmoud M, Borthwick GM, Hislop AA, Arthur HM. Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH. *Lab Invest.* 2009;89(1):15-25. doi: 10.1038/labinvest.2008.112.
- Mao M, Kong J, Chen K, Zhang J, Chen Z, Li J, et al. Evaluation of Nano-Particulate-Matter-Induced Lung Injury in Mice Using Quantitative Micro-Computed Tomography.

- J Nanosci Nanotechnol. 2021;21(12):6041-6047. doi: 10.1166/jnn.2021.19522.
30. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3279-95. doi: 10.1172/JCI85664.
 31. Nakamura H., in Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2nd Ed. Academic Press, 2013. Pages 290-292. ISBN 9780080961569. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9.
 32. National Research Council. Infectious diseases of mice and rats: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. Washington: National Academy Press, 1991.
 33. Neef N, Nikula KJ, Francke-Carroll S, Boone L. Regulatory forum opinion piece: blind reading of histopathology slides in general toxicology studies. *Toxicol Pathol.* 2012;40(4):697-9. doi: 10.1177/0192623312438737.
 34. Ortega-Gil A, Vaquero JJ, Gonzalez-Arjona M, Rullas J, Muñoz-Barrutia A. X-ray-based virtual slicing of TB-infected lungs. *Sci Rep.* 2019;9(1):19404. doi: 10.1038/s41598-019-55986-y.
 35. Pollard AC, Paolillo V, Radaram B, Qureshy S, Li L, Maity T, et al. PET/MR Imaging of a Lung Metastasis Model of Clear Cell Renal Cell Carcinoma with (2S,4R)-4-[¹⁸F]Fluoroglutamine. *Mol Imaging Biol.* 2022;24(6):959-972. doi: 10.1007/s11307-022-01747-9.
 36. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicol Pathol.* 2009;37(7 Suppl):5S-73S. doi: 10.1177/0192623309353423.
 37. Savchenko L, Mykytiuk M, Cinato M, Tronchere H, Kunduzova O, Kaidashev I. IL-26 in the induced sputum is associated with the level of systemic inflammation, lung functions and body weight in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:2569-75. doi: 10.2147/COPD.S164833.
 38. Schuler BA, Habermann AC, Plosa EJ, Taylor CJ, Jetter C, Negretti NM, et al. Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium. *J Clin Invest.* 2021;131(1):e140766. doi: 10.1172/JCI140766.
 39. Scudamore C.L. A Practical Guide to the Histology of the Mouse. 1st ed. John Wiley & Sons, 2014. 232 p.
 40. Shrestha N, Lateef Z, Martey O, Bland AR, Nimick M, Rosengren R, et al. Does the mouse tail vein injection method provide a good model of lung cancer? *F1000Res.* 2019;8:190. doi: 10.12688/f1000research.17964.1.
 41. Soni S, Jiang Y, Tesfaigzi Y, Hornick JL, Çataltepe S. Comparative analysis of ACE2 protein expression in rodent, non-human primate, and human respiratory tract at baseline and after injury: A conundrum for COVID-19 pathogenesis. *PLoS One.* 2021;16(2):e0247510. doi: 10.1371/journal.pone.0247510.
 42. Stober VP, Garantziotis S. Assessment of Ozone-Induced Lung Injury in Mice. *Methods Mol Biol.* 2018;1809:301-314. doi: 10.1007/978-1-4939-8570-8_19.
 43. Taylor-Just AJ, Ihrle MD, Duke KS, Lee HY, You DJ, Hussain S, et al. The pulmonary toxicity of carboxylated or aminated multi-walled carbon nanotubes in mice is determined by the prior purification method. *Part Fibre Toxicol.* 2020;17(1):60. doi: 10.1186/s12989-020-00390-y.
 44. Tomlinson KL, Davies GC, Sutton DJ, Palframan RT. Neutralisation of interleukin-13 in mice prevents airway pathology caused by chronic exposure to house dust mite. *PLoS One.* 2010;5(10):e13136. doi: 10.1371/journal.pone.0013136.
 45. Treuting P.M., Dintzis S, Montine K.S, eds. 2nd ed. Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas. Academic Press, 2017. doi.org/10.1016/C2014-0-03145-0.
 46. Treuting PM, Clifford CB, Sellers RS, Brayton CF. Of mice and microflora: considerations for genetically engineered mice. *Vet Pathol.* 2012;49(1):44-63. doi: 10.1177/0300985811431446.
 47. Turner CR, Zuczek S, Knudsen DJ, Wheeldon EB. Microwave fixation of the lung. *Stain Technol.* 1990;65(2):95-101. doi: 10.3109/10520299009108063.
 48. van Kuppevelt TH, Robbesom AA, Versteeg EM, Veerkamp JE, van Herwaarden CL, Dekhuijzen PN. Restoration by vacuum inflation of original alveolar dimensions in small human lung specimens. *Eur Respir J.* 2000;15(4):771-7. doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.15d23.x.
 49. Wu XX, Tang SJ, Yao SH, Zhou YQ, Xiao LL, Cheng LF, et al. The viral distribution and pathological characteristics of BALB/c mice infected with highly pathogenic Influenza H7N9 virus. *Virology.* 2021;18(1):237. doi: 10.1186/s12985-021-01709-7.
 50. You DJ, Lee HY, Taylor-Just AJ, Linder KE, Bonner JC. Sex differences in the acute and subchronic lung inflammatory responses of mice to nickel nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2020;14(8):1058-1081. doi: 10.1080/17435390.2020.1808105.
 51. Yuan W, Fulgar CC, Sun X, Vogel CFA, Wu CW, Zhang Q, et al. In vivo and in vitro inflammatory responses to fine particulate matter (PM_{2.5}) from China and California. *Toxicol Lett.* 2020;328:52-60. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.010.
 52. Yuan W, Velasquez SC, Wu CW, Fulgar CC, Zhang Q, Young DE, et al. Pulmonary health effects of wintertime particulate matter from California and China following repeated exposure and cessation. *Toxicol Lett.* 2022;354:33-43. doi: 10.1016/j.toxlet.2021.10.014.

ORCID та внесок авторів:

Пальчик В.В.: <https://orcid.org/0000-0002-8501-7439>^{ABCDEF}
 Кабалай А. В.: <https://orcid.org/0000-0002-5502-3926>^{ABCDEF}
 Шинкевич В.І.: <https://orcid.org/0000-0002-2436-9449>^{ABCDEF}
 Шликова О.А.: <https://orcid.org/0000-0002-6764-2767>^{ABCDEF}

Конфлікт інтересів:

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

A – концепція та дизайн дослідження; **B** – збір даних; **C** – аналіз та інтерпретація даних; **D** – написання статті; **E** – редагування статті; **F** – остаточне затвердження статті.

Матеріал надійшов до редакції 15.03.2023 р.