

## РАЗЛИЧИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ МОЛОДЫХ И ВЗРОСЛЫХ КРЫС НА ТРАВМУ ТКАНЕЙ В РЕГИОНЕ ЛИМФОСБОРА

Майбородин И.В.<sup>1,2</sup>, Агзаев М.К.<sup>1,2</sup>, Майбородина В.И.<sup>1</sup>, Клиникова М.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной патологии и патоморфологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск

Состояние лимфатических узлов (ЛУ), которые играют ключевую роль в защите организма от неблагоприятных факторов внешней среды, является маркером адекватности функций иммунной системы. Однако литература практически не содержит результатов сравнения изменений ЛУ у пациентов различного возраста после повреждения тканей в регионе лимфосбора. В связи с этим проведено сравнительное патоморфологическое исследование особенностей реакций регионарных поднижнечелюстных ЛУ (ПЛУ) крыс-самцов линии Wag различного возраста на повреждение костной ткани нижней челюсти. Было найдено, что изменения ПЛУ молодых и взрослых животных в ответ на мандибулярную травму проходят в одном направлении, но степень выраженности и время продолжительности динамики клеточных и структурных ответов обусловлены возрастом. Выраженность реакций коркового плато ПЛУ, продолжительность клеточных ответов этой структуры и паракортикальной зоны у взрослых крыс были менее значимыми, а мантия в лимфоидных узелках со светлыми центрами и узелков без центра – наоборот, интенсивнее, относительно молодых. Кроме того, в этой группе происходит более интенсивное и более продолжительное возрастание содержания деструктивных форм клеточных элементов, макрофагов, иммуно- и плазмобластов. Наиболее вероятно, что особенности реакций ПЛУ на травму тканей с повреждением кости у молодых животных вызваны несовершенством иммунного ответа.

Ключевые слова: лимфатические узлы, возрастные изменения, повреждение нижней челюсти, реакции на травму, макрофаги.

## THE DIFFERENCES IN MORPHOLOGICAL REACTIONS OF REGIONAL LYMPH NODES FROM YOUNG AND ADULT RATS TO TISSUE INJURY IN THE REGION OF LYMPH COLLECTION

Maiborodin I.V.<sup>1,2</sup>, Agzaev M.K.<sup>1,2</sup>, Maiborodina V.I.<sup>1</sup>, Klinnikova M.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine" of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Novosibirsk, e-mail: imai@mail.ru;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Institution of Science "Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS", Novosibirsk

The state of the lymph nodes (LN), which play a key role in protecting of the organism from adverse environmental factors, is a marker of the functional adequacy of the immune system. However, the literature contains practically no results of comparing LN changes from patients of different ages after tissue damage in the lymph collection region. In this regard, a comparative pathomorphological study of the peculiarities of reactions the regional submandibular LN (SLN) from Wag-male rats of different age groups to mandibular destroy was made. It was detect that in animals of different age groups the SLN react in one direction to bone fracture in region of the lymph collection, but the intensity and duration by time of reactions are related to age. The duration of changes in the volume of the cortical plateau of the SLN, the intensity of cell reactions in deep and surface cortex in the adult group were less, but the lymphoid follicles without light center and the mantle in nodules with the center were, on the contrary, higher than in rats from young group. In adult group, relatively young, the quantity of macrophages, destructive cells, immuno- and plasmablasts increase a less pronounced and less prolonged. Probably, the main differences in the SLN state after surgery in the lymph collection region in rats of different age groups are due to imperfect immunity in young animals.

Keywords: lymph nodes, age-related changes, mandibular damage, reactions to trauma, macrophages.

Типичные процессы взросления выраженно влияют на состояние здоровья субъекта. Недостаточная активность иммунитета в юном возрасте обуславливает рост заболеваемости, при этом эффективность применения вакцин у молодых людей часто снижена, что способствует росту инфекционных процессов, даже независимо от все более совершенных мероприятий по иммунизации [1; 2].

Состояние лимфатических узлов (ЛУ), которые играют ключевую роль в защите организма от неблагоприятных факторов внешней среды, является маркером состояния иммунной системы. ЛУ детей и молодых животных содержат больше стромальных, бластных и находящихся в митозе клеточных элементов. Постепенно, по мере взросления, появление все более значительного содержания плазматических клеток в ЛУ свидетельствует об их возрастающей роли в системе защиты организма. Не исключено, что онтогенетические различия в состоянии иммунных и лимфоидных органов связаны с нарастающей в течение взросления антигенной стимуляцией [3-5].

В эксперименте сравнивали дренаж лимфы и изменения структуры паховых ЛУ крыс породы Вистар возрастом от 3 до 5 и от 12 до 15 месяцев. Было найдено, что в процессе взросления меняется расположение этих ЛУ. Вследствие формирования соединительной ткани становится медленнее ток лимфы через ЛУ. По мере увеличения возраста постепенно снижается численная плотность клеточных элементов в паракортексе, уменьшается митотическая активность в центрах размножения лимфоидных фолликулов [6].

В научной литературе практически нет сравнительных данных по исследованию ЛУ после повреждения тканей в регионе лимфосбора у разного возраста пациентов и экспериментальных животных [7]. В результате изучения литературы была выделена только 1 работа, описывающая реакции ЛУ на фоне травматических повреждений костей голени и стоп у разных по возрасту пациентов. При этом в начале статьи G. Szczesny с соавт. [8] сообщают о выраженной реакции ЛУ на переломы, а затем делают заключение об отсутствии клинических проявлений таких изменений.

Цель исследования: определить особенности патогистологических изменений поднижнечелюстных ЛУ (ПЛУ) на травмировании тканей мандибулярного региона у молодых крыс.

**Материал и методы исследования.** Патогистологическими методами сравнивали изменения ПЛУ молодых и взрослых крыс-самцов инбредной линии Wag на моделирование мандибулярного перелома костной ткани нижней челюсти.

Крысы были выращены и содержались в соответствующем требованиям SPF виварии Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» СО РАН. Хирургическое вмешательство и выведение животных из эксперимента были проведены в

условиях чистой операционной под тотальной ингаляционной эфирной анестезией и, в соответствии с ГОСТ 33215-2014, не были связаны с причинением болевых ощущений.

Периодизация постнатальной жизни крыс сделана на основе рекомендаций В.В. Махинько и В.Н. Никитина [9]. Приняв, что крысы доживают до 3 лет, а человек – до 90 лет, Н.Н. Donaldson [10] рассчитал, что на протяжении всего постнатального развития 1 год жизни крысы эквивалентен 30 годам жизни человека, или 1 месяц жизни крысы соответствует 2,5 годам человеческой жизни.

До начала эксперимента крысы были разделены по возрастному принципу. Группу «Молодые» составили 72 животных от 1 до 2 месяцев жизни и массой 100-150 г, что по указанной выше периодизации [9] соответствует периоду четвертого удвоения веса или, у человека, предпубертатному возрасту. Крысы возрастом от 9,5 до 15 месяцев жизни и массой 300-350 г, что соответствует у человека периоду первой зрелости, были объединены в группу «Взрослые», также состоящую из 72 голов.

Для моделирования мандибулярной травмы по краю нижней челюсти кожу разрезали скальпелем. Тупым способом отслаивали мышечный массив и выделяли поверхность мандибулы. В условиях применения охлаждения стерильным физиологическим раствором высверливали отверстие диаметром 2 мм в углу мандибулы без прохождения в ротовую полость. Животных подвергали эвтаназии через 1; 2; 3; 4 и 5 нед. после мандибулярной травмы [11]. В качестве контроля для каждой группы использовали интактных крыс соответствующего возраста.

После 24-часовой фиксации 4%-ным забуференным раствором параформа, ПЛУ обезжизняли в градиенте этилового спирта, просветляли в орто-толуоле и заливали в гистопласт. Гистологические срезы красили гематоксилином и эозином, просматривали в просвечивающем режиме светового микроскопа Axioimager M1 (Carl Zeiss, Germany).

Для получения данных о строении ПЛУ и составе клеточных элементов в их отделах, на экране компьютера измеряли изображения, которые были сделаны с использованием цифровой видеокамеры. В процессе морфометрии применяли оригинальные программы Axiovision (Zeiss, Германия). При установке объектива X 5 на экране площадь изображения составляла 5 600 000 мкм<sup>2</sup> (границы прямоугольника 2800x2000 мкм), для изучения клеточного состава (объектив X 40) – 87 500 мкм<sup>2</sup> (350x250 мкм). Статистические данные получали, обрабатывая численные результаты посредством программы MS Excel (Microsoft, USA), для сравнения использовали среднее арифметическое с его стандартным отклонением. Отличия сравниваемых средних величин считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Корковое плато *в структуре ПЛУ* у молодых крыс через 1 нед. после мандибулярной травмы было больше, чем в контроле

( $13,7 \pm 0,997\%$  от площади среза ПЛУ), на 82,4%, на 2-й нед. – на 82,4%, к 3-й нед. - на 35,3%, спустя 4 нед. – на 25% и через 5 нед. - на 29,4%. Процент паракортикальной зоны на срезе ПЛУ через 1 нед. стал, наоборот, меньше, по сравнению с контролем ( $46,1 \pm 1,9\%$ ), на 66,7%, на 2-й нед. – на 71%, к 3-й нед. - на 32,6%, спустя 4 нед. – на 28,9% и через 5 нед. - на 29,2%. Площадь, занимаемая лимфоидными узелками без центров размножения, через 1 нед. превосходила контрольные данные ( $4,84 \pm 0,719\%$ ) на 51,8%, а на 2-й нед. – на 43,3%. Процент мантия в узелках со светлыми центрами через 1 нед. был больше, чем в контроле ( $3,66 \pm 0,65\%$ ), на 70,3% и на 2-й нед. – на 63,5%. Процент мозговых синусов от среза ПЛУ возрос только на 1-й нед. на 25,3% относительно органов контрольных крыс ( $9,57 \pm 0,67\%$ ).

У молодых крыс объем коркового плато статистически значимо превосходил контрольный уровень в течение всего времени наблюдения, а у взрослых – только 2 нед. Площадь паракортекса у молодых животных была меньше исходной в течение всего эксперимента, а у взрослых – спустя 4 и 5 нед. уже не отличалась от контроля. Процент на срезе лимфоидных узелков без герминативных центров, а также мантия в фолликулах со светлым центром у молодых крыс превосходил контроль в течение 1 и 2 нед., а у взрослых – до 3 нед. включительно.

При моделировании повреждения нижней челюсти происходит деструкция тканей, образуются геморрагии, фибриновые сгустки, а также клеточный и тканевой детрит, обладающий антигенными свойствами, запускается асептическая воспалительная реакция. При попадании в регионарные ПЛУ антигенные вещества инактивируются и стимулируют начало иммунологических реакций. Необходимость обезвреживания и элиминации большого объема детрита способствует задержке лимфотока через ПЛУ, и даже блокаде его. Все это, видимо, является одной из главных причин расширения просвета мозговых синусов в те сроки после операции, когда объем детрита относительно велик.

После взаимодействия антигена с иммунокомпетентными клетками начинается пролиферация В-лимфоцитов коркового плато. Активно делящиеся клетки формируют лимфоидные узелки без центров размножения, далее в центре этих структур В-лимфоциты дифференцируются до иммуно- и плазмобластов, а по периферии продолжают делиться. Иммуно- и плазмобласты, в отличие от лимфоцитов, имеют более широкую светлую цитоплазму, в связи с этим центр узелка постепенно светлеет и расширяется, а на периферии, где В-лимфоциты продолжают делиться и содержится множество клеток практически без цитоплазмы и с ядром с конденсированным хроматином, образуется мантийная зона. Из-за запуска пролиферации и дифференцировки клеток коркового плато происходит расширение этой зоны, а вследствие формирования новых узелков без центров размножения возрастает процент их площади на срезе всего ПЛУ. Высокая митотическая активность на периферии

лимфоидных узелков со светлыми центрами обуславливает гипертрофию мантия.

Иммунная система до взросления еще не полностью сформирована, после стимуляции антигеном начинается очень выраженная пролиферация клеток и их дифференцирование [5], видимо, в связи с этим произошла более длительная гипертрофия коркового плато в данной группе.

При попадании детрита в ПЛУ взрослых животных можно ожидать уже подготовленность иммунокомпетентных клеток именно к этим антигенам. С ними вступают во взаимодействие, главным образом, уже сформированные В-клетки памяти [2]. Необходимо обратить внимание, что в течение постнатального развития постепенно развивается способность В-лимфоцитов не реагировать на отдельные антигены [12], что предотвращает аутоаллергические и аутоиммунные ответы. Кроме того, по мере взросления снижается активность функционирования не только иммунной, но и лимфатической системы [2]. Со временем становится все меньше бластных форм иммунокомпетентных клеток [1; 2], с этим связаны изменения объема лимфоидных фолликулов без и с центрами размножения.

Реакции паракортекса в молодом возрасте были отмечены в течение более длительного возраста. Возможно, что вследствие еще не сформированной антительной защиты до наступления взросления [3-5] происходит компенсация защитных процессов за счет усиления активности клеточного компонента. Т-лимфоциты более активно выходят из паракортекса и направляются к воспаленным тканям [13], и вследствие этого паракортикальная зона более выражено сокращается у молодых особей, и это уменьшение объема сохраняется более длительное время.

Процент лимфоцитов в *паракортикальной зоне* у молодых крыс через 1 нед. стал ниже, чем в контроле ( $72,8 \pm 3,07\%$  от общего числа клеток), на 13,9%, а на 2-й нед. – на 16,5%. Количество макрофагов через 2 нед. было, наоборот, больше, по сравнению с контролем ( $1,87 \pm 0,717\%$ ), в 2,6 раза, на 3-й нед. – также в 2,6 раза, к 4-й нед. - в 2,5 раза и спустя 5 нед. - в 2,7 раза. Численность фигур митозов через 1 нед. была выше, чем в контроле ( $1,41 \pm 0,516\%$ ), в 2,6 раза и на 2-й нед. – в 2,8 раза. Число клеток с явлениями некробиоза через 1 нед. было больше, чем в контроле ( $1,32 \pm 0,491\%$ ), в 2,9 раза и на 2-й нед. – в 2,5 раза.

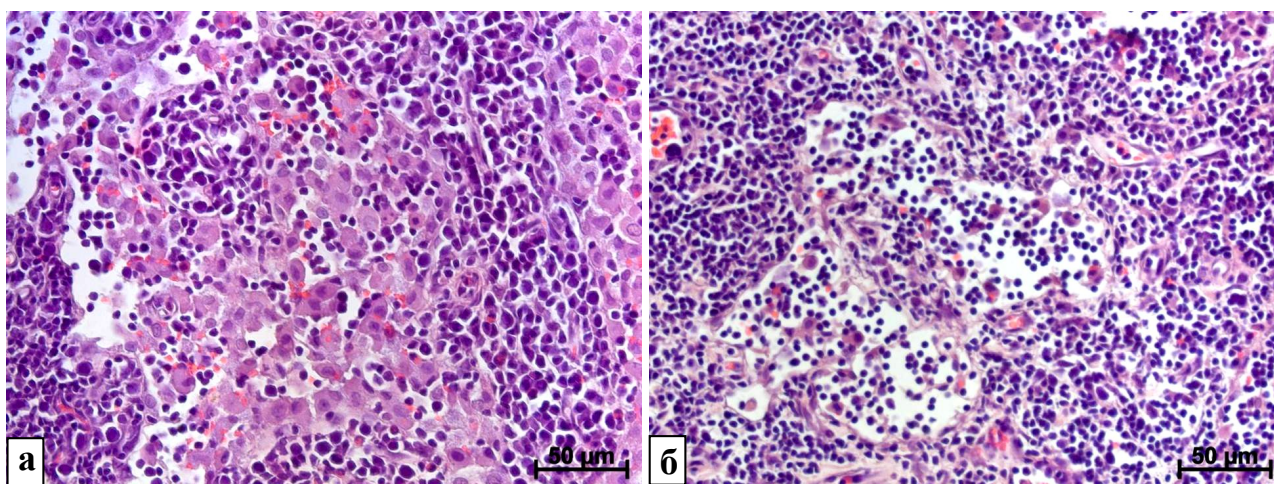
Макрофагальная инфильтрация паракортикальной зоны у молодых особей на все сроки наблюдения была выше контрольной, тогда как у взрослых – только в течение первых 3 нед. после хирургического вмешательства. Количество клеток на стадиях митоза и с некробиотическими изменениями у молодых крыс было больше, чем в контроле, на протяжении 2 нед., а у взрослых – только в течение 7 сут. после моделирования мандибулярной травмы.

У молодых крыс лимфоцитов в *герминативных центрах узелков* через 1 нед. стало

меньше, чем в контроле ( $56,4 \pm 2,36\%$  от общего числа клеток), на 42%, на 2-й нед. – на 57,8%, а спустя 3 нед. – на 36,8%. Иммуно- и плазмобластов было больше, чем в контроле ( $20,5 \pm 3,27$ ), на 51%, на 2-й нед. – на 66,5%, а спустя 3 нед. – на 51,9%. Макрофагов через 1 нед. было больше, чем в контроле ( $3,68 \pm 0,777\%$ ), на 95,4%, на 2-й нед. – в 2,3 раза, к 3-й нед. – в 2,1 раза, спустя 4 нед. – на 63,5% и через 5 нед. – также на 63,5%. Клеток на стадиях деления через 1 нед. стало больше, чем в контроле ( $12,68 \pm 0,779\%$ ), на 87,3% и на 2-й нед. – на 93,6%. Нежизнеспособных клеток через 1 нед. было больше, чем в контроле ( $1,32 \pm 0,49\%$ ), в 2,9 раза и на 2-й нед. – в 3,1 раза.

Иммуно- и плазмобластов в светлых центрах у животных из группы «Молодые» было больше, чем в контроле, на протяжении 3 нед., а в группе «Взрослые» рост этого показателя зарегистрирован только в течение первых 2 нед. после мандибулярной травмы. Макрофагов в группе «Молодые» было больше, чем в контроле, на протяжении всех 5 нед. эксперимента, тогда как в группе «Взрослые» этот показатель вернулся к исходным значениям к 3-й нед.

В просвете мозговых синусов ПЛУ крыс группы «Молодые» клеточных элементов с явлениями деструкции было больше исходного в течение 2 нед., а у взрослых – только 1 нед. Количество плазмочитов через 4 и 5 нед. после операции у молодых животных превосходило контрольный уровень, а в группе взрослых данный показатель не менялся все время наблюдения. Число макрофагов у молодых крыс было очень значительным (рис. а), но превышало исходный уровень в течение первых 2 нед., тогда как у взрослых – 3 нед., несмотря на то что через 1 нед. после операции содержание фагоцитов было меньше (рис. а,б).



*Макрофаги в мозговых синусах ПЛУ крыс разных возрастных групп через 1 нед. после моделирования мандибулярной травмы (окраска гематоксилином и эозином): а - у молодого животного просвет синусной системы блокирован макрофагами и детритом; б – у взрослой крысы количество макрофагов в синусах значительно меньше, на некоторых участках просвет синусов остается свободным*

Общим в динамике клеточного состава различных структур СЛУ после хирургического вмешательства для животных всех возрастов являлось той или иной длительности и выраженности уменьшение числа лимфоцитов, на фоне этого возросло содержание макрофагов, иммуно- и плазмобластов, фигур митозов и клеточных элементов с явлениями деструкции. Кроме того, в просвете мозговых синусов увеличилась численность нейтрофилов, моноцитов, эритроцитов и плазмоцитов.

С попаданием антигена в СЛУ там начинается пролиферация лимфоцитов и параллельная дифференцировка их до иммуно- и плазмобластов и, далее, до плазматических клеток. Наиболее вероятно, что в связи с этим во всех структурах СЛУ уменьшается содержание лимфоцитов, увеличивается число иммуно- и плазмобластов и фигур митозов. По мере дифференцировки иммуно- и плазмобластов до незрелых и зрелых плазматических клеток данные клеточные элементы мигрируют из герминативных центров в мозговое вещество, где эти клетки секретируют иммуноглобулины в лимфу, содержащуюся в синусной системе для инактивации антигенов. По-видимому, это служит основной причиной возрастания содержания плазмоцитов в просвете мозговых синусов.

При анализе отличий состояния цитоархитектоники различных структур ПЛУ между сравниваемыми группами, был зарегистрирован менее интенсивный и не такой продолжительный рост численности нежизнеспособных клеточных элементов, макрофагов, иммуно- и плазмобластов.

В детском возрасте строение ПЛУ зависит от антигенной стимуляции, что продолжается до молодого зрелого возраста [3]. У молодых крыс, вследствие незрелости иммунной системы [4] и недостаточных контактов с антигеном, в ПЛУ после мандибулярной травмы мигрирует большое количество макрофагов, которые, адсорбируя антигены и дебрис, замещают недостаточное образование антител.

Из-за несовершенства иммунного ответа на попадание в ПЛУ молодых животных антигенов, там после активации В-лимфоцитов сразу начинается их быстрая пролиферация и дифференцирование, в результате резко увеличивается содержание молодых созревающих клеточных форм: иммуно- и плазмобластов. А так как при активном делении клеток появляется много клеточных элементов с различными дефектами [14], в различных структурах возрастает содержание клеток с явлениями деструкции.

Таким образом, можно заключить, что основные возрастные отличия реакций ПЛУ после мандибулярной травмы у крыс связаны с еще только формирующейся иммунной защитой, ее несовершенством до периода взросления.

## **Выводы**

1. Направление изменений ПЛУ крыс, вызванных мандибулярной травмой, не связано с возрастом, однако интенсивность и продолжительность по времени реорганизации строения и клеточного состава обусловлены возрастом.

2. Выраженность преобразований коркового плато ПЛУ, продолжительность трансформирования поверхностной и глубокой коры в группе «Взрослые» были меньше, а мантия вокруг светлых центров, а также узелков без центров герминации – наоборот, больше, относительно группы «Молодые». Вместе с этим у животных до взросления зарегистрировано более интенсивное и более продолжительное наращивание численности макрофагов, клеток с признаками необратимых повреждений, иммуно- и плазмобластов.

### Список литературы

1. Ray D., Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. Clin. Immunol. 2018. vol. 196. P. 59-63.
2. Linterman M.A. How T follicular helper cells and the germinal centre response change with age. Immunol. Cell. Biol. 2014. vol. 92. no. 1. P. 72-79.
3. Kunieda M., Hiramoto M., Horie K., Nagata H., Aizawa S., Hoshi H. Formation of lymph follicles and germinal centers in the somatic and mesenteric lymph nodes of growing mice during ontogenesis. Okajimas Folia Anat. Jpn. 2002. vol. 79. no. 2-3. P. 63-74.
4. Parker G.A., Picut C.A., Swanson C., Toot J.D. Histologic Features of postnatal development of immune system organs in the Sprague-Dawley rat. Toxicol Pathol. 2015. vol. 43. no. 6. P. 794-815.
5. Stepanova H., Samankova P., Leva L., Sinkora J., Faldyna M. Early postnatal development of the immune system in piglets: the redistribution of T lymphocyte subsets. Cell. Immunol. 2007. vol. 249. no. 2. P. 73-79.
6. Горчакова О.В., Горчаков В.Н. Структурно-функциональные особенности паховых лимфатических узлов и лимфотока при старении // Морфология. 2013. Т. 144. № 4. С. 25-29.
7. Майбородин И.В., Агзаев М.К., Рагимова Т.М., Майбородин И.И. Возрастные изменения структуры лимфоидных органов: Обзор литературы. // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. № 2. С. 229-238.
8. Szczesny G., Olszewski W.L., Gorecki A. Lymphoscintigraphic monitoring of the lower limb lymphatic system response to bone fracture and healing. Lymphat. Res. Biol. 2005. vol. 3. no. 3. P. 137-145.
9. Махинько В.В., Никитин В.Н. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс // Эволюция темпов индивидуального развития



животных. М.: Наука, 1977. С. 249-266.

10. Donaldson H.H. On the changes in the relative weights of the viscera and other organs from birth to maturity - albino rat. *Am. J. Physiol.* 1923. vol. 67. P. 1-21.
11. Майбородин И.В., Агзаев М.К., Рагимова Т.М., Майбородина В.И. Особенности реакций лимфатических узлов на повреждение тканей региона лимфосбора у старых крыс // *Успехи геронтологии.* 2016. Т. 29. № 4. С. 548-554.
12. Johnson J.L., Scholz J.L., Marshak-Rothstein A., Cancro M.P. Molecular pattern recognition in peripheral B cell tolerance: lessons from age-associated B cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2019. vol. 61. P. 33-38.
13. Benechet A.P., Menon M., Xu D., Samji T., Maher L., Murooka T.T., Mempel T.R., Sheridan B.S., Lemoine F.M., Khanna K.M. T cell-intrinsic S1PR1 regulates endogenous effector T-cell egress dynamics from lymph nodes during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016. vol. 113. no. 8. P. 2182-2187.
14. Xiao S., Zhang X., Mann K.K., Jodo S., Li L., Jarjour W.N., Marshak-Rothstein A., Sherr D.H., Ju S.T. Changes in sensitivity of peripheral lymphocytes of autoimmune gld mice to FasL-mediated apoptosis reveal a mechanism for the preferential deletion of CD4-CD8-B220+ T cells. *Int. Immunol.* 2004. vol. 16. no. 5. P. 759-766.