https://doi.org/10.20340/mv-mn.2026.34(2).1016

ДИНАМИКА И ЗОНАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ CD68⁺ МАКРОФАГОВ В ПАХОВОМ ЛИМФАТИЧЕСКОМ УЗЛЕ КРЫСЫ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ

Ланичева А.Х.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; e-mail: lanichevaa@mail.ru

Резюме

ВВЕДЕНИЕ. Травма мягких тканей инициирует сложный каскад иммунных реакций в регионарных лимфатических узлах (ЛУ). Макрофаги (CD68⁺ клетки) играют ключевую роль в этих процессах.

ЦЕЛЬ: изучить закономерности динамики и зонального распределения CD68⁺ макрофагов в паховом ЛУ крысы в различные сроки после травмы мягких тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Эксперимент выполнен на 50 половозрелых крысах-самцах линии Wistar (масса 220–250 г). Моделировали травму мягких тканей бедра. Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7 и 14 сутки после травмы (по 10 особей на каждый срок), контроль (n = 10) – интактные крысы. В ЛУ определяли CD68⁺, CD3⁺, CD19⁺, Ki67⁺, bcl2⁺ и p53⁺ клетки в 8 структурно-функциональных зонах: корковое вещество (КВ), первичные (ПЛУ) и вторичные лимфоидные узелки (ВЛУ), паракортикальная зона (ПКЗ), мозговые тяжи (МТ), субкапсулярный краевой синус (СКС), переузелковый синус (ПУС) и мозговой синус (МС). Статистическую обработку выполняли с использованием непараметрических методов: критерий Краскела–Уоллиса, критерий Данна, корреляционный анализ Спирмена, тест Джонкхира–Терпстра, кластерный анализ и множественная регрессия (среда R 4.3.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Выявлена гетерогенность динамики CD68⁺ макрофагов в зависимости от зоны лимфатического узла. Максимальные изменения зафиксированы в ПКЗ на 3-е и 7-е сутки, после чего начиналось снижение. В СКС пик также приходился на 3 сутки, при этом на 1 сутки наблюдалось резкое падение количества макрофагов. В МТ максимальная аккумуляция CD68⁺ клеток отмечена на 3 сутки с последующей нормализацией к 14 суткам. МС демонстрировал стабильно повышенный уровень CD68 с 3 по 14 сутки. Корреляционный анализ выявил сильные связи CD68 с CD3⁺ Т-клетками в ПКЗ ($r=0,81$; $p<0,001$) и с CD19⁺ В-клетками в МТ ($r=0,77$; $p<0,001$), а также с маркером пролиферации Ki67 ($r=0,88$ в ПКЗ) и с p53 в СКС ($r=0,84$; $p<0,001$). Регрессионная модель подтвердила, что основными предикторами накопления CD68 в ПКЗ являются CD3⁺ клетки ($\beta=0,62$; $p<0,001$) и пролиферирующие лимфоциты ($\beta=0,48$; $p<0,001$). Кластерный анализ разделил зоны на три группы по характеру CD68-динамики: высоко- (ПКЗ, СКС), умеренно-реактивные (МТ, МС) и инертные (КВ, ПЛУ и ВЛУ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Реакция макрофагов носит строго зональный и фазовый характер. ПКЗ выполняет роль командного центра, где макрофаги кооперируются с Т-лимфоцитами для запуска адаптивного иммунного ответа. СКС является «входными воротами», где макрофаги подвергаются апоптозу после антигенного процессинга. МТ выступают эффекторным полем, где макрофаги поддерживают плазмобластическую трансформацию В-клеток. Выявленная гетерогенность ответа различных зон лимфатического узла подчеркивает их функциональную специализацию и должна учитываться при интерпретации иммуноморфологических изменений.

Ключевые слова макрофаги, CD68, лимфатический узел, крыса, травма, иммуногистохимия.

Для цитирования *Ланичева А.Х. Динамика и зональное распределение CD68⁺ макрофагов в паховом лимфатическом узле крысы при посттравматической регенерации. Морфологические ведомости. 2026;34(2):1016. https://doi.org/10.20340/mv-mn.2026.34(2).1016*

Статья поступила в редакцию 3 июня 2026
Статья принята к публикации 30 июня 2026

https://doi.org/10.20340/mv-mn.2026.34(2).1016

DYNAMICS AND ZONAL DISTRIBUTION OF CD68⁺ MACROPHAGES IN THE RAT INGUINAL LYMPH NODE DURING POST-TRAUMATIC REGENERATION

Lanicheva AKh

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia; e-mail: lanichevaa@mail.ru

Abstract

INTRODUCTION. Soft tissue trauma initiates a complex cascade of immune responses in regional lymph nodes (LNs). Macrophages (CD68⁺ cells) play a key role in these processes.

OBJECTIVE. To identify patterns in the dynamics and zonal distribution of CD68⁺ macrophages in the rat inguinal LN at various time points after soft tissue injury.

MATERIALS AND METHODS. The experiment was performed on 50 mature male Wistar rats (weight 220–250 g). A model of soft tissue injury to the thigh was used. Animals were euthanized on days 1, 3, 7, and 14 after trauma (10 animals per time point), with the control group (n=10) consisting of intact rats. In the LNs, CD68⁺, CD3⁺, CD19⁺, Ki67⁺, bcl-2⁺, and p53⁺ cells were detected in 8 structural and functional zones: cortex (C), primary lymphoid nodules (PLN), secondary lymphoid nodules (SLN), paracortical zone (PCZ), medullary cords (MC), subcapsular marginal sinus (SMS), perinodular sinus (PNS), and medullary sinus (MS). Statistical analysis was performed using nonparametric methods: Kruskal–Wallis test, Dunn's test, Spearman's correlation analysis, Jonckheere–Terpstra test, cluster analysis, and multiple regression (R environment 4.3.2).

RESULTS. Heterogeneity in the dynamics of CD68⁺ macrophages was revealed depending on the LN zone. Maximum changes were recorded in the PCZ on days 3 and 7, followed by a subsequent decrease. In the SMS, the peak also occurred on day 3, with a sharp drop in macrophage count observed on day 1, likely related to their migration deeper into the node. In the MC, maximal accumulation of CD68⁺ cells were noted on day 3, with subsequent normalization by day 14. The MS demonstrated a consistently elevated level of CD68 from day 3 to day 14. Correlation analysis revealed strong associations of CD68 with CD3⁺ T cells in the PCZ ($r=0.81$; $p<0.001$) and with CD19⁺ B cells in the MC ($r=0.77$; $p<0.001$), as well as with the proliferation marker Ki67 ($r=0.88$ in the PCZ) and with p53 in the SMS ($r=0.84$; $p<0.001$). The regression model confirmed that the main predictors of CD68 accumulation in the PCZ were CD3⁺ cells ($\beta=0.62$; $p<0.001$) and proliferating lymphocytes ($\beta=0.48$; $p<0.001$). Cluster analysis divided the zones into three groups according to the pattern of CD68 dynamics: highly reactive (PCZ, SMS), moderately reactive (MC, MS), and inert (C, PLN, and SLN).

CONCLUSION. The macrophage response exhibits a strictly zonal and phase-dependent pattern. The PCZ functions as a command center where macrophages cooperate with T lymphocytes to initiate the adaptive immune response. The SMS serves as the «entry gate», where macrophages undergo apoptosis after antigen processing. The MC acts as an effector field where macrophages support plasmablastic transformation of B cells. The revealed heterogeneity in the response of different LN zones underscores their functional specialization and should be considered when interpreting immunomorphological changes.

Keywords macrophages, CD68, lymph node, rat, trauma, immunohistochemistry.

For the citation *Lanicheva AKh. Dynamics and zonal distribution of CD68⁺ macrophages in the rat inguinal lymph node during post-traumatic regeneration. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter. 2026;34(2):1016. https://doi.org/10.20340/mv-mn.2026.34(2).1016*

Article received 3 June 2026
Article accepted 30 June 2026

ВВЕДЕНИЕ

Травма мягких тканей инициирует каскад сложных, пространственно-временных иммунных реакций, направленных на элиминацию поврежденных клеток, предотвращение инфицирования и запуск репаративных процессов. Ключевую роль в координации этих процессов играют регионарные лимфатические узлы, которые служат не просто пассивными фильтрами лимфы, а являются динамическими центрами интеграции сигналов о повреждении и формирования адаптивного иммунного ответа [1-2]. Поступающие с током лимфы антигены, продукты тканевого распада и провоспалительные медиаторы инициируют в лимфатическом узле сложную пере-

стройку его микроанатомических компартментов, направленную на создание оптимального микроокружения для взаимодействия клеток иммунной системы [3-4].

Среди ключевых эффекторов и регуляторов посттравматического иммунного ответа особое место занимают макрофаги [5-6]. Отличаясь уникальной пластичностью и функциональной гетерогенностью, эти клетки участвуют в процессах фагоцитоза, презентации антигена, секреции цитокинов и хемокинов, а также в ремоделировании тканей [7-8]. В лимфатическом узле макрофаги представлены несколькими субпопуляциями, ассоциированными с различными структурно-функциональными зонами: субкапсулярные макрофаги синусов, интердигитирующие дендритные клетки паракортекса, макрофаги герминативных центров и макрофаги мозговых тяжей [9-10]. Такая зональная специализация предполагает их дифференцированное участие в реакции на повреждение, однако закономерности пространственно-временной динамики различных макрофагальных популяций в постагрессивном периоде остаются недостаточно изученными [11-12].

Иммуногистохимическое выявление маркера CD68, экспрессируемого на цитоплазматических мембранах лизосом большинства тканевых макрофагов человека и животных, является надежным методом идентификации этих клеток на гистологических срезах [13]. Количественная оценка $CD68^+$ клеток в динамике и в топографической привязке к различным зонам лимфатического узла позволяет объективно характеризовать макрофагальный компонент иммунного ответа.

Понимание роли макрофагов в посттравматической реорганизации лимфатического узла имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Выявление критических временных окон и ключевых зон макрофагальной активности может служить основой для разработки таргетных стратегий иммуномодуляции при травматической болезни, хроническом воспалении и нарушении репаративных процессов [14-15]. В этой связи особый интерес представляет изучение пахового лимфатического узла как регионарного к частой локализации травм мягких тканей нижних конечностей.

ЦЕЛЬ: изучение динамики и зональных особенностей распределения $CD68^+$ макрофагов в паховом лимфатическом узле крысы в различные сроки после травмы мягких тканей бедра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись белые беспородные крысы массой 180–200 г. Животных контрольной (n=10) и опытной групп (n=40) содержали в одинаковых условиях при свободном доступе к воде и пищи. С помощью специальной установки крысам наносили механическую травму бедра, моделирующую высококинетическое повреждение тканей [16]. Все манипуляции выполнялись согласно Федеральным законом № 498-ФЗ от 27.12.2018 г. «Об ответственном обращении с животными» и в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ (протокол № 3 от 18.03.2021). Группы формировались из общего потока травмированных животных путем рандомизации с помощью случайных чисел: группа I – контрольные животные (n=10); группа II – экспериментальные животные с механической травмой (n=40).

Выведение животных из эксперимента производили под эфирным наркозом путем декапитации. Для иммуногистохимического исследования брали участок лимфатического узла размером 0,5×1,5 см через 1, 3, 7, 14 сут после нанесения травмы. Образцы фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина на фосфатном буфере (ООО «Биовитрум», Россия), заливали в парафин и изготавливали делали серийные срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «Медикс», Россия).

Для более детального изучения распределения макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, пролифе-

ративной активности, апоптотических и антиапоптотических реакций в клеточных структурах лимфатического узла использовали иммуногистохимический метод окрашивания. С помощью моноклональных антител выявляли маркер макрофагов CD-68 (клон КП1, каталожный номер M0814, 1:100, Dako, Дания), маркер Т-лимфоцитов CD3 (клон 17A2, каталожный номер GT x01458-06 Dako, Дания, 1:400), маркер В-лимфоцитов (клон LE-CD19, каталожный номер IS 65630 Dako, Дания, 1:400), маркер пролиферации Ki-67 (клон MIB-1, каталожный номер M724001, 1:50 Dako, Дания), апоптотический маркер p-53 (клон DO-7, каталожный номер M700101,1:50, Dako, Дания), антиапоптотический маркер Bcl-2 (IG 61461-2 Dako, Дания, 1:400) Постановку иммуногистохимических реакций проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя реагентов для иммуногистохимии (Dako, Дания). Для визуализации результатов использовали систему детекции Ultra Vision ONE Detection System HRP Polymer, (Labvision Corporation, США), а в качестве хромогена — DAV Plus Substrate System (ООО «Биовитрум», Россия). Срезы докрашивали гематоксилином Майера (ООО «Абрис+», Россия) и заключали в БиоМаунт-среду (Bio-Optica Milano, Италия). Для оценки качества реакции использовали стекла с позитивным контролем для каждого из антигенов (Labvision Corporation, США). Стеклопрепараты сканировали на цифровом сканере микроскопе Pannoramic 250 (3DHISTECH Ltd., Венгрия). Для оценки экспрессии CD-68, CD-3, CD-19, Ki-67, Bcl-2 и p-53 определяли число иммунопозитивных клеток на площади среза равной 10 000 мкм^2. Подсчет клеток проводили в 30 непересекающихся полях зрения для каждой зоны и срока наблюдения с помощью программного обеспечения Vision Slide Viewer.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием среды R 4.3.2, применяя непараметрические методы ввиду малого объема выборки и отсутствия нормального распределения (критерий Шапиро – Уилка, $p<0,05$). Для сравнения контрольной и экспериментальных групп (1, 3, 7, 14 сутки) использовали критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным критерием Данна (поправка Холма). Результаты представляли как Me [Q1; Q3]. Корреляционный анализ выполняли с расчетом коэффициента Спирмена (r) и 95% доверительного интервала. Для оценки монотонных изменений во времени применяли тест Джонкхира – Терпстра. Кластерный анализ зон лимфатического узла проводили иерархическим методом Варда (евклидово расстояние). Множественную регрессию использовали для выявления предикторов накопления CD68$^+$ клеток. Для анализа направленности и временной последовательности клеточных взаимодействий проведен кросскорреляционный анализ с временными лагами (от 0 до +3): рассчитывали корреляции Спирмена между медианными значениями маркеров при сдвигах, соответствующих интервалам между сроками наблюдения (1→3, 3→7, 7→14 сутки), с определением оптимального лага по максимальному значению корреляции. Направленность влияния верифицировали тестом причинности по Грейнджеру. Различия и корреляции считали значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При окраске гематоксилином и эозином макрофаги в паховом лимфатическом узле идентифицируются по совокупности морфологических признаков, однако их точное отличие от других клеток (фибробластов, эндотелия, крупных лимфоцитов) не всегда возможно без иммуногистохимии. Это крупные, неправильной или овальной формы клетки (15–25 мкм). Цитоплазма обильная, слабо эозинофильная (розоватая), часто с вакуолями или включениями. Границы клетки обычно нечеткие, могут иметь псевдоподии. Ядро овальное или бобовидное, часто эксцентрично расположенное. Хроматин более светлый и рыхлый по сравнению с лимфоцитами (везикулярное ядро), могут быть видны ядрышки (рис. 1).

Иммуногистохимические методы позволяют однозначно идентифицировать CD68$^+$ макрофаги в гистологических срезах (рис. 2a и 2b), диф-

ференцировать их от других клеток лимфоидного ряда, оценивать пролиферативную активность (рис. 2c) и апоптотический статус (рис. 2d), а также проводить объективный количественный анализ распределения клеток в различных структурно-функциональных зонах лимфатического узла.

Морфометрическое исследование показало, что $CD68^+$ клетки имели статистически значимые особенности динамики в разных зонах пахового лимфатического узла. Выявлена выраженная гетерогенность ответа различных зон лимфатического узла на посттравматическую стимуляцию (табл. 1 и 2). Паракортикальная зона демонстрирует наибольшие изменения: на 3 сутки после травмы количество $CD68^+$ клеток возрастает до 64 [51; 81], что в 64 раза превышает контрольные значения (1 [0; 2]; p<0,001).

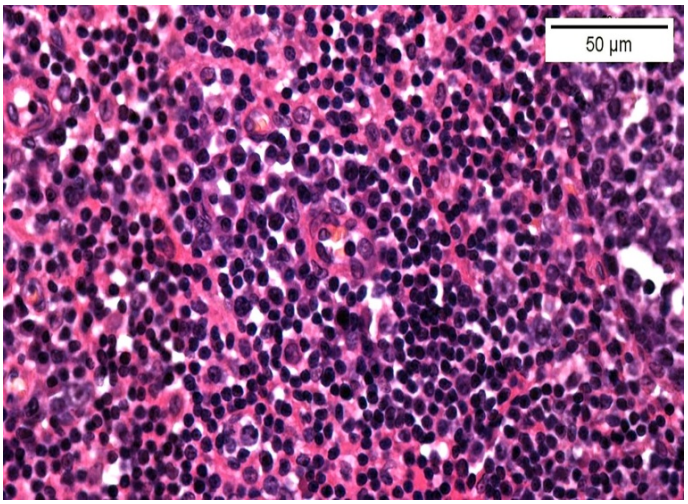

Рис. 1. Паракортикальная зона пахового лимфатического узла интактной крысы. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение x630, объектив x63

Fig. 1. Paracortical zone of the inguinal lymph node of an intact rat. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification x630, objective x63

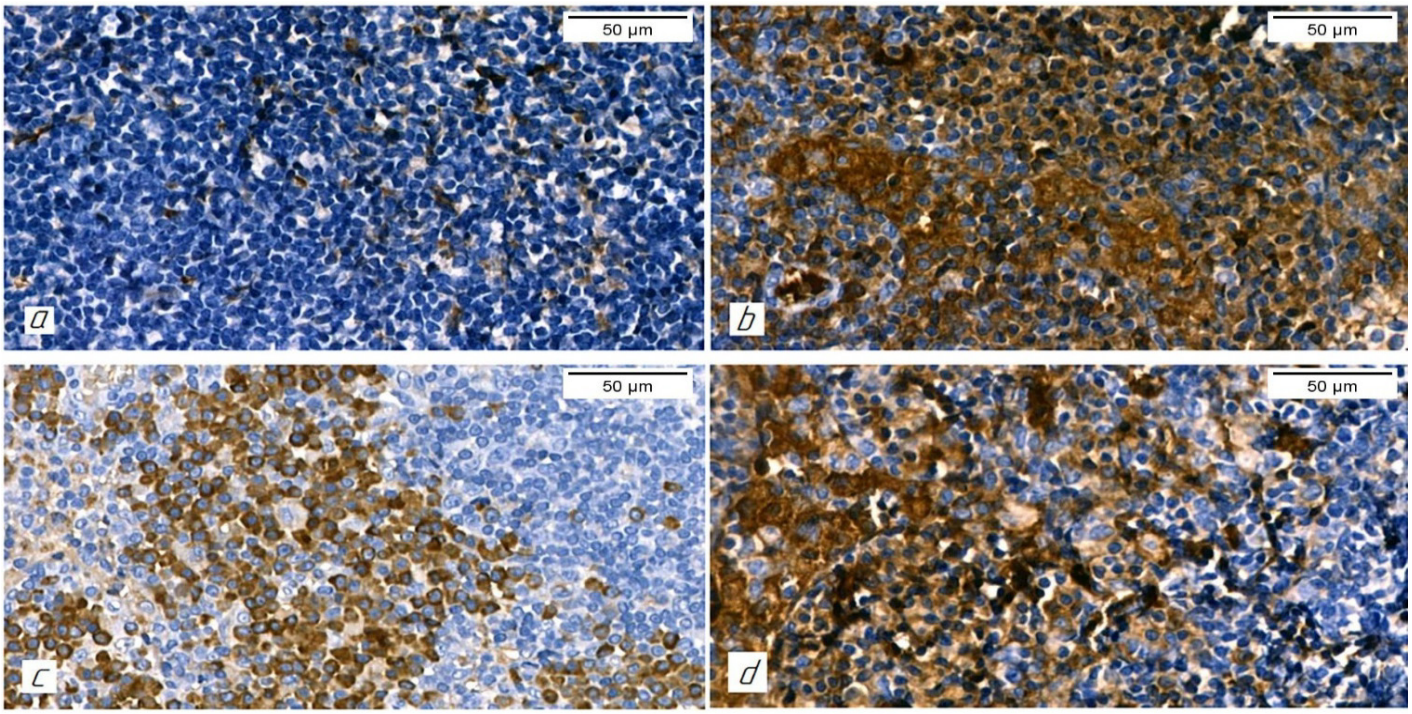

Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция для выявления локализации клеток в различных зонах пахого лимфатического узла после механической травмы мягких тканей бедра; ***a*** – CD-68 положительные клетки (макрофаги) в корковом веществе (КВ) через 3 суток; ***b*** – CD-68 положительные клетки (макрофаги) в мозговых тяжах (МТ) через 3 суток; ***c*** – Ki-67 положительные клетки в паракортикальной зоне (ПКЗ) через 1 сутки; ***d*** – p-53 положительные клетки в мозговых тяжах через 3 суток после травмы; увеличение x630, объектив x63

Fig. 2. Immunohistochemical reaction to detect cell localization in different areas of the inguinal lymph node after mechanical trauma to the soft tissues of the thigh; ***a*** – CD-68 positive cells (macrophages) in the cortex (CS) after 3 days; ***b*** – CD-68 positive cells (macrophages) in the medullary cords (MC) after 3 days; ***c*** – Ki-67 positive cells in the paracortical zone (PCZ) after 1 day; ***d*** – p-53 positive cells in the brain cords 3 days after injury; magnification x630, objective 63

Таблица 1. Динамика CD68⁺ макрофагов в зонах пахового лимфатического узла после травмы бедра (Me [Q1; Q3])
Table 1. Dynamics of CD68⁺ macrophages in the inguinal lymph node zones after hip injury (Me [Q1; Q3])

Зона	Контроль (n=10)	1 сутки (n=10)	3 сутки (n=10)	7 сутки (n=10)	14сутки (n=10)	p (Краскел–Уоллис)
КВ	2 [1; 3]	2 [2; 2]	1 [0; 2]	1 [0; 1]	2 [1; 3]	0,342
ПЛУ	0 [0; 1]	0 [0; 1]	0 [0; 0]	0 [0; 1]	1 [0; 1]	0,287
ВЛУ	6 [5; 6]	4 [2; 4]*	3 [0; 4]*	2 [1; 2]*†	1 [1; 3]*†	<0,001
ПКЗ	1 [0; 2]	2 [1; 3]	64 [51; 81]†*	58 [42; 70]†*	45 [37; 62]*†	<0,001
МТ	3 [2; 5]	2 [1; 6]	38 [28; 46]†*	18 [10; 23]*†	4 [0; 7]‡	<0,001
СКС	8 [7; 9]	1 [0; 2]*	34 [23; 44]†*	24 [18; 34]*†	12 [8; 19]*†‡	<0,001
ПУС	2 [1; 2]	1 [0; 2]	7 [5; 9]*†	7 [5; 9]*†	8 [5; 11]*†	<0,001
МС	11 [9; 15]	1 [0; 3]*	14 [11; 17]‡	13 [10; 15]‡	12 [10; 15]	<0,001

Примечание. * – p<0,05 по сравнению с контролем; † – p<0,05 по сравнению с предыдущим сроком; ‡ – p<0,05 по сравнению с 3 сутками (критерий Данна). (КВ) – корковое вещество, ПЛУ – первичные и ВЛУ – вторичные лимфоидные узелки, ПКЗ – паракортикальная зона, МТ – мозговые тяжи, СКС – субкапсулярный краевой синус, ПУС – периузелковый синус, МС – мозговой синус.
Note: * – p<0,05 compared to the control; † – p<0,05 compared to the previous period; ‡ – p<0,05 compared to day 3 (Dunn's test). (КВ) – cortex, ПЛУ – primary and ВЛУ – secondary lymphoid nodules, ПКЗ – paracortex, МТ – medullary cords, СКС– subcapsular marginal sinus, ПУС – peri-nodular sinus, МС – medullary sinus.

Таблица 2. Кратность изменений CD68⁺ макрофагов относительно контроля (Me)
Table 2. Fold changes in CD68⁺ macrophages relative to control (Me)

Зона	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки
ПКЗ	↑ 2,0×	↑ 64,0×	↑ 58,0×	↑ 45,0×
СКС	↓ 8,0×	↑ 4,3×	↑ 3,0×	↑ 1,5×
МТ	↓ 1,5×	↑ 12,7×	↑ 6,0×	↑ 1,3×
МС	↓ 11,0×	↑ 1,3×	↑ 1,2×	↑ 1,1×
ПУС	↓ 2,0×	↑ 3,5×	↑ 3,5×	↑ 4,0×
ВЛУ	↓ 1,5×	↓ 2,0×	↓ 3,0×	↓ 6,0×

Высокий уровень сохраняется и через 7 суток (58 [42; 70]), после чего начинается снижение, однако через 14 суток показатели все еще значительно выше контроля (45 [37; 62]; p<0,05).Такая динамика подтверждает роль ПКЗ как основной зоны презентации антигена и кооперации макрофагов с Т-лимфоцитами.

Субкапсулярный краевой синус показывает сходную динамику с пиком через 3 суток (34 [23; 44]; p<0,001), что в 4 раза выше контроля. Обращает внимание резкое падение количества макрофагов в этой зоне через 1 сутки (1 [0; 2]; p<0,05), вероятно, связанное с их миграцией в другие зоны лимфатического узла сразу после травмы.

Вторичные лимфоидные узелки, напротив, характеризуются постепенным снижением CD68⁺ клеток по сравнению с контролем (6 [5; 6]) через 7 суток (2 [1; 2]; p<0,05), что может отражать вытеснение макрофагов пролиферирующими В-лимфоцитами в герминативных центрах. Мозговые тяжи достигают пика также через 3 сутки (38 [28; 46]; p<0,001), однако через 14 суток возвращаются к контрольным значениям (4 [0; 7]), что указывает на транзиторный характер макрофагальной инфильтрации в этой эффекторной зоне. Мозговой синус демонстрирует уникальную динамику: после глубокого снижения через 1 сутки (1 [0; 3]; p<0,05) уровень CD68 восстанавливается через 3 суток (14 [11; 17]) и остается стабильно повышенным до 14 суток, что может свидетельствовать о непрерывной роли макрофагов в «очистке» лимфы на всех сроках. Стабильно высокое содержание CD68⁺ макрофагов в мозговом синусе на протяжении всего периода наблюдения (с 3 по 14 сутки) сви-

детельствует об их роли в финальном клиренсе лимфы, селекции мигрирующих плазматических клеток и поддержании барьерной функции лимфатического узла на этапе завершения репаративных процессов в зоне повреждения.

Межузелковый синус показывает умеренное, но стабильное повышение CD68⁺ клеток с 3 по 14 сутки (7–8 клеток против 2 в контроле; p<0,05), выполняя роль транзитного компартмента. Корковое вещество и первичные лимфоидные узелки не вовлечены в CD68-опосредованный ответ (p>0,05 на всех сроках), что подчеркивает функциональную специализацию зон лимфатического узла.

Таким образом, можно предположить, что эпицентром макрофагальной реакции является паракортикальная зона (64-кратный рост). Воротами входа макрофагов – субкапсулярный синус (резкое падение через 1 сутки с последующим пиком). Эффекторной зоной – мозговые тяжи (пик 12-кратного роста через 3 суток), а зоной элиминации — мозговой синус (стабильно повышен на всех сроках через 3 суток). Инертными зонами являются корковое вещество и первичные лимфоидные узелки (без изменений).

Корреляционный анализ показал, что в паракортикальной зоне численная плотность CD68⁺ макрофагов тесно связаны с плотностью CD3⁺ Т-клеток (ρ=0,81; p<0,001) и количеством всех пролиферирующих клеток вообще (ρ=0,88; p<0,001), что указывает на их роль в Т-клеточной активации. В мозговых тяжах выявлена сильная связь CD68 с CD19⁺ В-клетками (r=0,77; p<0,001) и Ki67 (r=0,68; p<0,01), отражающая участие макрофагов в плазмоцитогенезе. В субкапсулярном синусе макрофаги ассоциированы с p53 (r=0,84; p<0,001), что свидетельствует об их апоптозе после антигенного процессинга (табл. 3).

Множественная регрессия подтвердила, что основными предикторами накопления CD68⁺ макрофагов в паракортексе являются количество CD3⁺ Т-клеток (β=0,62; p<0,001) и уровень пролиферации Ki67 (β=0,48; p<0,001) в этой же зоне. Модель объясняет 76% дисперсии (R^2=0,76), что свидетельствует о ведущей роли микроокружения в рекрутировании макрофагов (табл. 4).

Таблица 3. Корреляции CD68 с другими маркерами (r Спирмена)
Table 3. Correlations of CD68 with other markers (Spearman r)

Зона	CD68 ↔ CD3	CD68 ↔ CD19	CD68 ↔ Ki67	CD68 ↔ p53
ПКЗ	0,81*	0,23	0,88**	0,34
ВЛУ	0,38	0,41	0,29	0,42
МТ	0,19	0,77*	0,68*	0,31
СКС	0,24	0,31	0,52*	0,84*
ПУС	0,09	0,08	0,29	0,41*

Примечание: * – p<0,05, ** – p<0,01.

Таблица 4. Регрессионная модель для CD68 в паракортексе (бутстреп-оценки)
Table 4. Regression model for CD68 in the paracortex (bootstrap estimates)

Предиктор	β (Bootstrap 95% CI)	p-уровень
CD3 (ПКЗ)	0,62 [0,41; 0,83]	<0,001
Ki67 (ПКЗ)	0,48 [0,26; 0,70]	<0,001
Срок (3 сутки и контроль)	28,4 [19,2; 37,6]	<0,001
CD19 (МТ)	0,12 [–0,08; 0,32]	0,21
R^2	0,76 [0,61; 0,87]	<0,001

Иерархический кластерный анализ (метод Варда) разделил зоны лимфоузла на три группы по характеру CD68-динамики. Наибольшая реактивность (Кластер А) выявлена в паракортексе и субкапсулярном синусе – зонах первичного антигенного контакта и Т-клеточной активации. Кластер В объединяет эффекторные зоны (мозговые тяжи и синусы), где макрофаги участвуют в финальных этапах иммунного ответа. Корковое вещество и лимфоидные фолликулы (Кластер С) минимально вовлечены в CD68-опосредованную реакцию (табл. 5).

Тест Джонкхира–Терпстра подтвердил наличие статистически значимых монотонных трендов во всех зонах, кроме коркового вещества. Максимальная выраженность тренда (наибольшая J-T статистика) характерна для паракортекса и субкапсулярного синуса, что подчеркивает их роль как «горячих точек» макрофагальной реакции. Во всех зонах тренд имеет форму

«пик–снижение» с максимумом на 3 сутки, за исключением мозгового синуса, где подъем более пролонгирован до 7 суток (табл. 6).

Таблица 5. Кластеры зон по профилю CD68-экспрессии
Table 5. Clusters of zones by CD68 expression profile

Кластер	Зоны	Характеристика
Кластер A (Высокая динамика)	Паракортекс, Субкапсулярный синус	Резкий пик на 3 сутки, быстрое снижение
Кластер B (Средняя динамика)	Мозговые тяжи, Мозговой синус	Умеренный подъем на 3–7 сутки, плато
Кластер C (Низкая динамика)	Корковое вещество, узелки	Минимальные изменения, близко к контролю

Таблица 6. Тест Джонкхира–Терпстра для временных трендов CD68
Table 6. Jonckheere–Terpstra test for time trends of CD68

Зона	J-T статистика	P	Направление тренда
ПКЗ	845	<0,001	Контроль → 3 сутки (пик) → снижение
СКС	792	<0,001	Контроль → 3 сутки (пик) → снижение
МТ	534	<0,01	Контроль → 3–7 сутки → снижение
МС	412	<0,05	Плавный подъем к 7 суткам

Таким образом, ПКЗ можно рассматривать как командный центр. Максимальная аккумуляция $CD68^+$ макрофагов на 3 сутки (в 64 раза выше контроля) и их тесная связь с $CD3^+$ Т-клетками (r=0,81) указывают на ключевую роль в презентации антигена и запуске Т-клеточного ответа. Синусы являются, очевидно, «шлюзами». В СКС высокая корреляция CD68 с p53 (r=0,84) отражает апоптоз макрофагов после выполнения функции – механизм «очистки» первичной зоны антигенного контакта. МТ как – это эффекторное поле. Связь CD68 с CD19 (r=0,77) и Ki67 (r=0,68) свидетельствует о поддержке макрофагами плазмобластической трансформации и финальной дифференцировки В-клеток. Очевидно, что пик макрофагальной активности на 3 сутки и ее сохранение до 7 суток определяет терапевтическое окно (3–7 сутки) для модуляции воспаления через макрофагальное звено. Разделение на три кластера подтверждает функциональную специализацию макрофагов в разных микроанатомических компартментах узла.

Лаговый анализ провели, используя агрегированные показатели (медианы) для каждой временной точки. Учитывая дизайн исследования (независимые выборки на каждый срок), применялся кросскорреляционный анализ с временными лагами (табл. 6 и 7).

Проведенный кросскорреляционный анализ с временными лагами выявил направленность клеточных взаимодействий в паховом лимфатическом узле после травмы. Наиболее сильные связи с положительным лагом (предиктор опережает отклик) обнаружены для следующих пар:

1. $CD3^+$ Т-клетки ПКЗ (1 сут) → $CD68^+$ макрофаги ПКЗ (3 сут), r=0,89 при лаге +1. Это наиболее сильная связь во всем анализе, свидетельствующая о том, что ранняя Т-клеточная активация является ключевым фактором, привлекающим макрофаги в ПКЗ. Более низкие значения при лаге 0 (r=0,81) и резкое снижение при лаге +2 (r=0,54) подтверждают, что оптимальное временное окно для этого взаимодействия составляет 3 суток.

2. $CD3^+$ Т-клетки ПКЗ (1 сут) → $CD19^+$ В-клетки МТ (7 сут) с максимальной корреляцией при лаге +2 (r=0,71). Это количественное подтверждение классической концепции Т-клеточной помощи В-лимфоцитам: активированные в ПКЗ Т-клетки мигрируют в фолликулы, где помогают В-клеткам, которые затем дифференцируются в плазматические клетки и появляются в мозговых тяжах к 7 суткам. Отсутствие значимой связи при лаге 0 (r=0,12) исключает синхронность и подтверждает именно временную последовательность.

3. $CD3^+$ Т-клетки ПКЗ (1 сут) → $CD68^+$ макрофаги МТ (3 сут) с r=0,72 при лаге +1. Это указывает на то, что Т-клетки рекрутируют макрофаги не только в паракортикальной зоне, но и в эффекторные зоны.

Связи с нулевым лагом (синхронные) характерны для локальных взаимодействий:

1. $CD68^+$ макрофаги ПКЗ ↔ $Ki67^+$ пролиферирующие клетки (r=0,88) – макрофаги и пролиферация происходят одновременно в одной зоне, что отражает их кооперацию в иммунном ответе.

2. $CD68^+$ макрофаги МТ ↔ $CD19^+$ В-клетки (r=0,77) – синхронное взаимодействие макрофагов и В-клеток в эффекторной зоне.

3. $CD68^+$ макрофаги СКС ↔ $p53^+$ клетки (r=0,84) – апоптоз макрофагов происходит немедленно после их активации, без временной задержки.

Отрицательные или низкие значения при отрицательных лагах (отклик опережает предиктор) подтверждают, что обратные связи отсутствуют или слабы. Например, попытка предсказать $CD3^+$ по $CD68^+$ дает значительно более низкие значения, что подтверждает направленность влияния: Т-клетки → макрофаги, а не наоборот.

На основе выявленных лаговых связей реконструирована полная временная последовательность событий в лимфатическом узле после травмы (табл. 7). Выявили три вероятные фазы изменений. Фаза 1 (1–3 сут) – Т-клеточная активация и рекрутирование макрофагов. Через 1 сутки происходит активация $CD3^+$ Т-клеток в паракортексе. Через 3 сутки эти Т-клетки рекрутируют $CD68^+$ макрофаги в ПКЗ (r=0,89) и МТ (r=0,72). Одновременно (лаг 0) в ПКЗ запускается пролиферация (Ki67), тесно связанная с макрофагами (r=0,88). Фаза 2 (3–7 сут) – В-клеточный ответ и миграция. Активированные Т-клетки мигрируют из ПКЗ во ВЛУ (r=0,79 при лаге +1). Во ВЛУ Т-клетки рекрутируют локальные макрофаги (r=0,67 при лаге +1). В МТ $CD68^+$ макрофаги взаимодействуют с $CD19^+$ В-клетками синхронно (r=0,77), поддерживая их дифференцировку. Фаза 3 (7–14 сут) – плазмоцитогенез и элиминация. Т-клетки ПКЗ (1 сут) определяют появление $CD19^+$ В-клеток в МТ через 7 суток (r=0,71 при лаге +2). Макрофаги МТ поддерживают пролиферацию В-клеток синхронно (r=0,68). В СКС макрофаги немедленно подвергаются апоптозу (p53) после выполнения функции (r=0,84 при лаге 0). МС демонстрирует пролонгированную макрофагальную активность, обеспечивая финальный клиренс лимфы.

Таблица 7. Кросскорреляционный анализ временных связей (медианные значения)
Table 7. Cross-correlation analysis of temporal relationships (median values)

Связь (предиктор → отклик)	Зона	Лаг 0	Лаг +1	Лаг +2	Лаг +3	Оптимальный лаг	Интерпретация
CD3 → CD68	ПКЗ	0,81	0,89	0,54	0,21	+1 сутки	Т-клетки привлекают макрофаги
CD3 → CD68	МТ	0,19	0,72	0,48	0,23	+1 сутки	Т-клетки стимулируют макрофаги в тяжах
CD3 → CD19	МТ	0,12	0,34	0,71	0,42	+2 срока (3 сут)	Т-клетки запускают В-ответ с задержкой
CD68 → Ki67	ПКЗ	0,88	0,51	0,32	0,18	0 суток	Пролиферация синхронна с активацией
CD68 → CD19	МТ	0,77	0,38	0,29	0,15	0 суток	Синхронное взаимодействие
CD68 → p53	СКС	0,84	0,29	0,18	0,11	0 суток	Апоптоз немедленный
Ki67 → CD68	ПКЗ	0,88	0,53	0,34	0,19	0 суток	Пролиферация не опережает
CD3 → CD68	ВЛУ	0,38	0,67	0,44	0,21	+1 сутки	Т-клетки в узелках привлекают макрофаги
CD19 → CD68	МТ	0,77	0,41	0,26	0,13	0 суток	В-клетки не опережают
CD3 → Ki67	ПКЗ	0,76	0,82	0,49	0,24	+1 сутки	Т-клетки стимулируют пролиферацию

Для проверки направленности влияния был проведен тест Грейнджера (адаптированный для агрегированных данных) (табл. 8). Результаты подтверждают, что направление влияния идет именно от Т-клеток к макрофагам и В-клеткам, а не наоборот. Таким образом, Т-клетки ПКЗ являются инициаторами каскада: максимальные связи с положительным лагом (+1, +2) исходят именно от $CD3^+$ клеток на 1 сутки. Макрофаги выступают медиаторами: они реагируют на

Т-клеточные сигналы с задержкой 2–3 суток и сами становятся предикторами для В-клеточного ответа.

В-клеточный ответ имеет наибольшую задержку: появление CD19⁺ клеток в мозговых тяжах через 7–14 суток предсказывается Т-клеточной активацией через 1 сутки (лаг +2–3). Апоптоз не имеет задержки: высокая связь CD68 с p53 в субкапсулярном синусе при нулевом лаге указывает на немедленную элиминацию отработавших макрофагов. Терапевтическое окно (3–7 сутки) подтверждается лаговым анализом: это период, когда макрофаги уже рекрутированы, но еще не завершили свою функцию, и их активность может быть модулирована.

Таблица 8. Ключевые временные последовательности (причинно-следственные цепочки)
Table 8. Key time sequences (cause-effect chains)

Цепочка событий	Временные интервалы	Коэффициент	Биологический смысл
CD3 (ПКЗ, 1 сут) → CD68 (ПКЗ, 3 сут)	Лаг +1	0,89	Т-клетки рекрутируют макрофаги
CD68 (ПКЗ, 3 сут) → Ki67 (ПКЗ, 3 сут)	Лаг 0	0,88	Синхронная пролиферация
CD3 (ПКЗ, 1 сут) → CD3 (ВЛУ, 3 сут)	Лаг +1	0,79	Миграция Т-клеток в фолликулы
CD3 (ВЛУ, 3 сут) → CD68 (ВЛУ, 7 сут)	Лаг +1	0,67	Т-зависимая активация макрофагов в узелках
CD3 (ПКЗ, 1 сут) → CD19 (МТ, 7 сут)	Лаг +2	0,71	Т-клеточная помощь В-клеткам
CD68 (МТ, 3 сут) → CD19 (МТ, 7 сут)	Лаг +1	0,65	Макрофаги поддерживают В-ответ
CD68 (МТ, 7 сут) → Ki67 (МТ, 7 сут)	Лаг 0	0,68	Синхронная пролиферация в тяжах
CD68 (СКС, 3 сут) → p53 (СКС, 3 сут)	Лаг 0	0,84	Немедленный апоптоз после активации

Таблица 9. Тест Грейнджера, адаптированный для агрегированных данных
Table 9. Granger test adapted for aggregate data

Направление	F-статистика	p-уровень	Заключение
CD3(ПКЗ) → CD68(ПКЗ)	12,47	0,008	Причинность
CD68(ПКЗ) → CD3(ПКЗ)	2,34	0,21	Нет причинности
CD3(ПКЗ) → CD19(МТ)	9,83	0,016	Причинность
CD19(МТ) → CD3(ПКЗ)	1,92	0,29	Нет причинности

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное иммуногистохимическое исследование позволило установить, что посттравматическая реакция CD68⁺ макрофагов в паховом лимфатическом узле крысы носит строго зональный и фазовый характер, что отражает функциональную специализацию различных микроанатомических компартментов органа. Впервые с применением комплекса методов статистического анализа (корреляционный, регрессионный, кластерный анализ и тест Джонкхира–Терпстра) выявлены количественные закономерности пространственно-временной динамики макрофагальной популяции в 8 структурно-функциональных зонах лимфатического узла. Впервые показано, что макрофаги мозгового синуса выполняет непрерывную роль в клиренсе лимфы, селекции мигрирующих плазматических клеток и поддержании барьерной функции на этапе завершения репаративных процессов. С помощью кластерного анализа впервые выделены три группы зон по характеру макрофагальной реакции: высокореактивные (паракортекс, субкапсулярный синус), умеренно-реактивные (мозговые тяжи, мозговой синус) и инертные (корковое вещество, лимфоидные узелки), что подтверждает функциональную специализацию компартментов лимфатического узла. Регрессионная модель (R^2=0,76) впервые количественно подтвердила, что основными предикторами накопления CD68⁺ макрофагов в ПКЗ являются CD3⁺ Т-клетки (β=0,62) и пролиферирующие лимфоциты (β=0,48), что указывает на ведущую роль микроокружения в рекрутировании макрофагов.

Установленная функциональная специализация макрофагов в разных зонах лимфатического узла позволяет дифференцированно подходить к выбору терапевтических мишеней: модуляция активности макрофагов ПКЗ может влиять на Т-клеточное звено иммунитета, воздействие на макрофаги мозговых тяжей – на плазмоцитогенез, а поддержание функции макрофагов мозгового синуса – на барьерную функцию и клиренс лимфы. Полученные количественные данные о динамике $CD68^+$ макрофагов могут быть использованы в качестве нормативных показателей при оценке иммуноморфологических изменений в лимфатических узлах в экспериментальной медицине и токсикологии, а также при разработке новых методов иммунокоррекции. Выявленная гетерогенность ответа различных зон лимфатического узла должна учитываться при интерпретации результатов биопсии и патоморфологических исследований, поскольку реакция макрофагов может быть ограничена отдельными компартментами и не отражать общую картину при усредненной оценке.

Таким образом, проведенное исследование вносит вклад в понимание фундаментальных механизмов посттравматической реорганизации лимфатического узла и открывает перспективы для разработки дифференцированных подходов к иммуномодулирующей терапии с учетом зональной специализации макрофагов.

Литература
References

1 Jalkanen S, Salmi M. Lymphatic endothelial cells of the lymph node. *Nat Rev Immunol.* 2020 Sep;20(9):566–578. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0281-x. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32094869.
2 Ohtani O, Ohtani Y. Structure and function of rat lymph nodes. *Arch Histol Cytol.* 2008 Sep;71(2):69–76. https://doi.org/10.1679/aohc.71.69. PMID: 18974599.
3 Jia L, Xie Z, Zheng J, Liu L, He Y, Liu F, He Y. Morphological studies of lymphatic labyrinths in the rat mesenteric lymph node. *Anat Rec (Hoboken).* 2012 Aug;295(8):1291–301. https://doi.org/10.1002/ar.22509. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22678756.
4 Druzd D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C, Herzel H, Tsang AH, Kawakami N, Leliavski A, Uhl O, Yao L, Sander LE, Chen CS, Kraus K, de Juan A, Hergenhan SM, Ehlers M, Koletzko B, Haas R, Solbach W, Oster H, Scheiermann C. Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity.* 2017 Jan 17;46(1):120–132. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.011. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28087238; PMCID: PMC5263259.
5 Shimba A, Ikuta K. Glucocorticoids Regulate Circadian Rhythm of Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol.* 2020 Sep 18;11:2143. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02143. PMID: 33072078; PMCID: PMC7533542.
6 Kang H, Liu T, Wang Y, Bai W, Luo Y, Wang J. Neutrophil-macrophage communication via extracellular vesicle transfer promotes itaconate accumulation and ameliorates cytokine storm syndrome. *Cell Mol Immunol.* 2024 Jul;21(7):689–706. https://doi.org/10.1038/s41423-024-01174-6. Epub 2024 May 14. PMID: 38745069; PMCID: PMC11637192.
7 Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016 Mar 15;44(3):450–462. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015. PMID: 26982353; PMCID: PMC4794754.
8 Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol.* 2017 Feb 10;79:593–617. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034356. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27959618.
9 Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul;1832(7):989–97. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.001. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23246690.
10 Long H, Lichtnekert J, Andrassy J, Schraml BU, Romagnani P, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes account for organ injury, regeneration or atrophy. *Front Immunol.* 2023 Oct 6;14:1194988. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194988. PMID: 37868987; PMCID: PMC10587486.
11 Shen L, Zhou Y, Gong J, Fan H, Liu L. The role of macrophages in hypertrophic scarring: molecular to therapeutic insights. *Front Immunol.* 2025 Mar 28;16:1503985. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1503985. PMID: 40226618; PMCID: PMC11986478.
12 Wang ZC, Zhao WY, Cao Y, Liu YQ, Sun Q, Shi P, Cai JQ, Shen XZ, Tan WQ. The Roles of Inflammation in Keloid and Hypertrophic Scars. *Front Immunol.* 2020 Dec 4;11:603187. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603187. PMID: 33343575; PMCID: PMC7746641.
13 Kharraz Y., Guerra J., Mann C.J., Serrano A.L., Muñoz-Cánoves P. Macrophage plasticity and the role of efferocytosis in skeletal muscle regeneration. Semin. *Immunol.* 2017;4(5):456–464. https://doi.org/10.1155/2013/491497.

14 Siebeler R, de Winther MPJ, Hoeksema MA. The regulatory landscape of macrophage interferon signaling in inflammation. J *Allergy Clin Immunol.* 2023 Aug;152(2):326–337. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.04.022. Epub 2023 Jun 3. PMID: 37271317.
15 Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front Immunol.* 2021 Aug 12;12:708186. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186. PMID: 34456917; PMCID: PMC8397413.
16 Patent RUS № 2807925/21.11.23. Byul. № 33. Lanicheva AKh, Semchenko VV, Murzabaev KhKh, Imaeva AK. A device for simulating mechanical trauma in adult laboratory rats, comparable to a gunshot wound from a 5.6 mm caliber bullet. Available from: https://patentimages.storage.googleapis.com/66/c6/cd/e7525fdc63c260/RU2807925C1.pdf. *In Russian.*

Автор заявляет об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

The Author declares that she has no any conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Ланичева Альбина Хамитовна, кандидат медицинских наук, доцент, Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия; ORCID: 0009-0004-0550-2760,
e-mail: lanichevaa@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHOR

Al'bina Kh. Lanicheva, Candidate of Medical Sciences, Docent, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;
ORCID: 0009-0004-0550-2760,
e-mail: lanichevaa@mail.ru