

О ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДАВНОСТИ МЕХАНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ НА ОСНОВАНИИ ИЗМЕНЕНИЯ ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КОРКОВОГО И МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА ДОЛЕК ТИМУСА

Халиков А.А.¹, Гаврилов С.Н.², Агзамов В.В.¹, Кузнецов К.О.³, Банникова Е.Н.¹, Абдрахманова Д.Р.¹

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа;

²ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», Чебоксары;

³ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва; e-mail: kirillkuznetsov@aol.com

В ответ на механическую травму организм отвечает стрессовой реакцией, приводящей к активации адаптивной перестройки органов и тканей. Ключевым механизмом этого процесса является воспалительная реакция. В тимусе происходят дифференцировка и «обучение» Т-лимфоцитов, что играет важную роль в поддержании иммунитета живых организмов. При воздействии острых стрессовых ситуаций в организме развивается акцидентальная инволюция тимуса, что может привести к развитию иммунодефицитных состояний. Нами был проведен количественный анализ динамики показателей лимфоцитов в зависимости от фазы воспалительного процесса в результате нанесения механической травмы животным в эксперименте. Цель исследования – изучить динамику изменений клеточного состава коркового и мозгового вещества долек тимуса крыс в процессе регенерации кожно-мышечного повреждения при механической травме бедра. В эксперименте нами были использованы 84 половозрелые крысы, имеющие массу тела 250–300 г. Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: 1 – контрольная (n=12), 2 – экспериментальная (n=72). Механическое повреждение на задней лапе справа в области бедра наносили с использованием установки, способной дозированно передавать тканям кинетическую энергию, сопоставимую с силой удара винтовки калибра 5,6 мм. Далее животные были разделены на 4 подгруппы в зависимости от времени, прошедшего с момента нанесения механического повреждения. При анализе количественного исследования динамики показателей лимфоцитов в процессе заживления механической раны бедра у крыс в фазе альтерации и острого воспаления выявили увеличение числа больших лимфоцитов и снижение количества средних и малых лимфоцитов, а начиная с фазы регенерации – уменьшение количества больших лимфоцитов и увеличение средних и малых лимфоцитов, что свидетельствует о начальной стадии восстановительного процесса и снижении реактивного напряжения со стороны лимфопоэза. Полученные результаты могут быть использованы в экспертной практике с целью определения давности механических повреждений.

Ключевые слова: тимус, давность повреждений, судебно-медицинская экспертиза, гистология, клеточный состав.

ON THE POSSIBILITY OF DETERMINING THE DATE OF MECHANICAL DAMAGES ON THE BASIS OF CHANGES IN THE DYNAMICS OF THE CELL COMPOSITION OF THE CORTIC AND MEDULAR SUBSTANCE OF THE THYMUS LOBE

Khalikov A.A.¹, Gavrilov S.N.², Agzamov V.V.¹, Kuznetsov K.O.³, Bannikova E.N.¹, Abdrakhmanova D.R.¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa;

²I.N. Ulyanov Chuvash state university, Cheboksary;

³N.I. Pirogov Russian national research medical university, Moscow, e-mail: kirillkuznetsov@aol.com

In response to mechanical injury, the body responds with a stress response, leading to the activation of adaptive restructuring of organs and tissues. The key mechanism of this process is the inflammatory response. The thymus is the central organ of the immune system, which determines the state of immunity of any organism. When exposed to acute stressful situations in the body, an accidental involution of the thymus develops, which can lead to the development of immunodeficiency states. We carried out a quantitative analysis of the dynamics of lymphocyte indices depending on the phase of the inflammatory process as a result of mechanical injury to animals in the experiment. The purpose of the study was to study the dynamics of changes in the cellular composition of the cortical and medulla of the thymus lobules in rats in the process of regeneration of musculocutaneous damage in mechanical trauma to the thigh. In the experiment, we used 84 mature rats with a body weight of 250-300 g. The experimental animals were divided into 2 groups: 1 – control (n=12), 2 –

experimental (n=72). Mechanical damage, on the hind leg on the right in the thigh area, was applied using a device capable of delivering kinetic energy to the tissues in a dosed manner comparable to the impact force of a 5.6 mm caliber rifle. Further, the animals were divided into 4 subgroups depending on the time elapsed since the mechanical damage was applied. The results of the analysis of a quantitative study of the dynamics of lymphocytes in the process of healing a mechanical wound of the thigh in rats in the phase of alteration and acute inflammation revealed an increase in the number of large lymphocytes and a decrease in the number of medium and small lymphocytes, and starting from the regeneration phase, a decrease in the number of large lymphocytes and an increase in medium and small lymphocytes, which indicates the initial stage of the recovery process and a decrease in reactive stress from lymphopoiesis. The results obtained can be used in expert practice in order to determine the prescription of mechanical damage.

Keywords: thymus, age of injury, forensic medical examination, histology, cellular composition.

Диагностика давности механических повреждений является важным вопросом в практике судебно-медицинского эксперта. В настоящее время предложено достаточное количество различных методик, позволяющих в той или иной степени дать ответ на поставленный вопрос [1], однако, несмотря на неоспоримые преимущества каждой из них, они имеют свои недостатки, что делает актуальными дальнейшую разработку и поиск новых методов.

Иммунная система и гистофизиологические процессы, происходящие в ней, являются автономными, однако немалое влияние на них оказывают нервная и эндокринная системы, а также другие факторы внешней и внутренней среды. Иммунная система, в свою очередь, оказывает влияние на функции нервной и эндокринных систем согласно принципу обратных отрицательных связей. Именно поэтому иммунная система может рассматриваться как общерегуляторная. Специфическими функциями иммунной системы являются: обнаружение, связывание и удаление антигенов, как экзогенных, так и эндогенных. Выполнение этих функций обеспечивают гистофизиологические процессы. Высокая динамичность является важной особенностью гистофизиологии иммунной системы. В ней непрерывно протекают процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, кооперации, апоптоза лимфоцитов [2].

В ответ на механическую травму организм отвечает стрессовой реакцией, приводящей к активации адаптивной перестройки органов и тканей. Ключевым механизмом этого процесса является воспалительная реакция. В тимусе происходят дифференцировка и «обучение» Т-лимфоцитов, что играет важную роль в поддержании иммунитета живых организмов [2]. Морфологические сдвиги в структуре тимуса определяют развитие дефектов в иммунной системе. При воздействии острых стрессовых ситуаций в организме происходит акцидентальная инволюция тимуса, что может привести к развитию иммунодефицитных состояний [3].

Избыточная продукция глюкокортикоидов может приводить к инволюции тимуса, что связано с быстрой реакцией коры надпочечников на стресс. Именно поэтому травму нельзя

рассматривать только как локальное поражение, она всегда сопровождается общими процессами с вовлечением иммунной и эндокринной систем [3]. Тимусная инволюция – осложнение многих клинических проявлений, включая развитие инфекции, нарушение аппетита, развитие иммунодепрессивных состояний. Системные повышения уровней глюкокортикоидов и воспалительных цитокинов, как известно, способствуют тимусной атрофии. Немного известно, однако, о внутритимусных механизмах, которые, с одной стороны, способствуют истощению тимуса, с другой – тимусному восстановлению после воздействия стресса [4].

Старение повышает нарушения продукции цитокинов после травмы. Продукция ИФН γ и IL – 2 была значительно ниже у старых животных в ранний период после травмы, что может увеличивать частоту сепсиса и смерти у пожилых. Мужской пол и возраст, видимо, являются причинными неблагоприятными факторами в развитии иммуносупрессии после травмы [5].

Было установлено, что фазовые изменения показателей иммунного ответа, сопровождающие развитие раневой инфекции у пострадавших с тяжелой механической травмой, отличаются от изменений иммунной системы при инфекционных, хирургических заболеваниях более длительным восстановлением показателей клеточного иммунитета и выраженной дисиммуноглобулинемией – повышением иммуноглобулина М и снижением иммуноглобулина G. Зависимость иммуногенеза от состояния обменных процессов позволяет отнести изменения иммунитета к проявлениям общей катаболической реакции организма на травму, которые наиболее выражены на 3–5-е сутки после травмы, в эти же сроки выражена иммуносупрессия. Вторая фаза изменений иммунной системы в процессе посттравматической регенерации тканей начинается со 2-й недели и продолжается до 3 недель – фаза Т-клеточной гиперплазии. Эта фаза характеризуется генерализованным накоплением Т-клеток в тимусе, регионарном лимфатическом узле и селезенке, что является результатом постстрессовой перестройки иммунной системы [6].

Лимфоцит является круглой клеткой, ядро занимает его большую часть, оно окружено ободком протоплазмы. По происхождению и функции различают Т-лимфоциты (образуются из клеток-предшественников, расселяющихся из костного мозга в тимус, и обеспечивают реакции клеточного иммунитета) и В-лимфоциты (образуются в красном костном мозге), которые отвечают за обеспечение гуморального иммунитета. По размеру лимфоциты разделяются на малые, средние и большие. Наивысшей пролиферативной активностью обладают большие лимфоциты, которые являются начальной стадией дифференцировки стволовых клеток после попадания в субкапсулярную зону дольки тимуса. Новые клетки перемещаются в корковое вещество тимуса, а затем трансформируются в средние и малые

лимфоциты, они слабо пролиферируются, однако продолжают дифференцироваться. Средние лимфоциты – это промежуточное звено в дифференцировке и пролиферации лимфоидных клеток до зрелых форм, то есть до малых лимфоцитов [4].

Лимфоциты внутренней кортикальной зоны составляют 60–80% всех лимфоцитов. Такие лимфоциты несут хоминг-рецепторы, с помощью которых осуществляется миграция в Т-зависимые зоны периферических лимфоидных органов.

Корковая зона дольки подразделяется на субкапсулярную и внутреннюю кортикальную зоны. Функция субкапсулярной зоны заключается в создании микроокружения для костномозговых предшественников с целью дальнейшей пролиферации. Внутренняя кортикальная зона представляет собой сеть эпителиальных клеток. Участки без эпителиальной сети называются резервуарами для Т-лимфоцитов. Популяции лимфоцитов внутрикортикальной зоны гетерогенны, они составляют 60–80% от всех лимфоцитов тимуса. Функция внутрикортикальной зоны состоит в дальнейшей дифференцировке ранее поступивших тимоцитов.

Мозговое вещество долек представлено сетью крупных эпителиальных клеток и меньшим числом Т-лимфоцитов, а также мезенхимальными клетками. В медуллярной зоне находятся тельца Гассалья. Т-лимфоциты медуллярной зоны составляют 15–20% всех лимфоцитов тимуса и являются функционально активными. Т-лимфоциты являются либо рециркулирующими (при поступлении из крови), либо отдельной субпопуляцией лимфоцитов. Мозговая зона отвечает за обеспечение антигензависимого созревания Т-лимфоцитов за счет использования тимических гормонов, а также при прямом контакте с интердигитальными клетками и воздействию интерлейкинов. Кроме того, гормоны коры тимуса обладают местным действием, а гормоны мозгового вещества выделяются в кровь [4].

Нами был проведен количественный анализ динамики показателей лимфоцитов в зависимости от фазы процесса воспаления на фоне нанесения механической травмы крысам.

Цель исследования – изучить динамику изменений клеточного состава коркового и мозгового вещества долек тимуса крыс в процессе регенерации кожно-мышечного повреждения при механической травме бедра.

Материал и методы исследования

Мы использовали 84 половозрелые крысы массой тела 250–300 г. Экспериментальное исследование, содержание и последующая эвтаназия животных осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с экспериментальными животными» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.09.1977 г. № 755). Протокол заседания этического комитета экспериментального исследования № 3.14.2 от 06.02.2019 г.

Животные были разделены на 2 группы: 1 – контрольная (n=12), 2 – экспериментальная (n=72). Механическое повреждение на задней лапе справа в области бедра наносили при помощи специальной установки, которая дозированно предавала тканям кинетическую энергию, сопоставимую с силой удара винтовки калибра 5,6 мм [7]. Далее животные были разделены на 4 подгруппы в зависимости от времени, прошедшего с момента нанесения механического повреждения: 1 – 1 сутки; 2 – 3 суток; 3 – 15 суток; 4 – 25 суток. Выбор таких сроков исследования обусловлен фазами посттравматической регенерации тканей [8]. Животные выводились из эксперимента путем декапитации с последующим извлечением тимуса для гистологического исследования. Морфологические исследования включали приготовление, микроскопирование и морфометрию гистологических препаратов тимуса. Биоматериал фиксировали в 10%-ном растворе формалина с последующим обезвоживанием в спиртах, просветляли в ксилоле и заливали в парафин по общепринятой методике с дальнейшим формированием срезов толщиной 7 мкм. Готовые срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопирование осуществляли под бинокулярным микроскопом (Германия) при увеличении x7 или x10, объективы x40 или x90. Для проведения морфометрии была использована микросетка. При исследовании тимуса определяли соотношение содержания больших, средних и малых лимфоцитов в корковом и мозговом веществе долек. Общее количество исследованных микропрепаратов – 168. Для статистической оценки полученных результатов был использован пакет программ SPSS for Windows.

Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной группе в корковом веществе долек тимуса содержание больших лимфоцитов составило $8,1 \pm 0,7\%$, средних – $40,6 \pm 2,4\%$ и малых – $51,3 \pm 1,7\%$. Изменения соотношения разновидностей лимфоцитов в тимусе на этапах раневого процесса приведены на рисунке 1.

*- $p < 0,05$

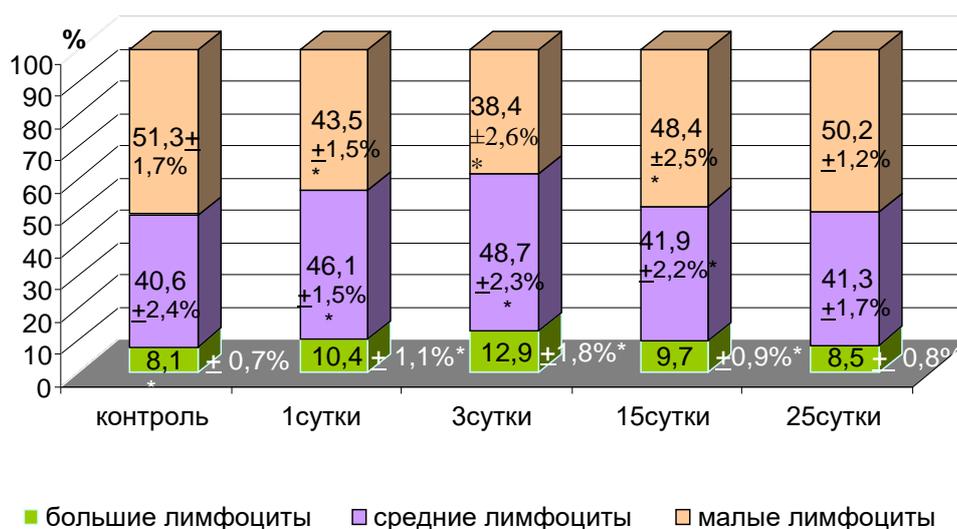


Рис. 1. Динамика уровня лимфоцитов коркового слоя долек тимуса у крыс в процессе заживления механической раны конечности

Анализ результатов изменения соотношения разных видов лимфоцитов у крыс в корковом веществе долек тимуса к концу 1-х суток опыта, в фазе альтерации, показал, что количество больших и средних лимфоцитов имело тенденцию к увеличению на 2,3% и 5,4% соответственно в сравнении с контролем. Содержание малых лимфоцитов у животных в этой фазе было ниже на 7,8% ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой.

На 3-и сутки исследования количество больших и средних лимфоцитов у крыс основной группы было выше, чем в контрольной группе (12,9±1,8% и 48,7±2,3% против 8,1±0,7% и 40,6±2,4%; p_1 и $p_2 < 0,05$). При этом содержание малых лимфоцитов снижалось в сравнении с контролем (38,4±2,6% и 51,3±1,7%, $p < 0,05$).

На 15-е сутки в фазе регенерации у крыс экспериментальной группы в корковом веществе долек тимуса содержание средних лимфоцитов снизилось на 6,8% ($p < 0,05$) в сравнении с фазой острого воспаления, а количество малых лимфоцитов увеличивалось с 38,4±2,7% до 48,4±2,5% ($p < 0,05$), но не достигло уровня контроля. Содержание больших лимфоцитов имело тенденцию к снижению относительно предыдущих сроков эксперимента.

На 25-е сутки, в фазе адаптивной перестройки, динамика количества лимфоцитов показала, что число больших, средних и малых лимфоцитов коркового слоя долек тимуса у крыс экспериментальной группы опыта приблизилось к уровню контрольной группы.

Динамика уровня содержания отдельных видов лимфоцитов в корковом слое тимуса на фоне заживления механической травмы показала, что наибольшее увеличение больших лимфоцитов наблюдалось на 3-и сутки. Фазовые изменения клеточного состава тимуса

характеризовались постепенным повышением количества больших лимфоцитов и снижением их уровня до контрольных значений в восстановительном периоде после травмы. В фазе регенерации (15-е сутки) наблюдаются увеличение числа средних и снижение количества больших лимфоцитов. В фазе адаптивной перестройки (25-е сутки) отмечается восстановление количества больших, средних и малых лимфоцитов. Полное восстановление измененных показателей лимфоцитов отмечалось только к 25-м суткам исследования.

Нами был также проведен анализ результатов исследования показателей разновидностей лимфоцитов мозгового вещества тимуса, результаты которого представлены в таблице.

Динамика уровня лимфоцитов мозгового слоя тимуса у крыс в процессе заживления механической травмы конечности (%)

Фазы	Лимфоциты		
	Большие	Средние	Малые
Контроль	2,5±0,8	60,5±3,1	37±3,4
1-е сутки	4,2±0,7*	57,1±2,4*	38,7±2,5
3-и сутки	5,9±0,9*	54,4±2,3*	39,7±2,5
15-е сутки	4,0±0,7*	55,9±2,3*	38,1±2,6
25-е сутки	3,0±0,8	59,0±3,0	38,0±2,7

* – $p < 0,05$

Как видно из данных, представленных в таблице, у крыс контрольной группы в мозговом слое тимуса преобладали лимфоциты средних размеров (60,5±3,1%), количество больших лимфоцитов было в 3 раза меньше, чем в корковом слое, и составило 2,5±0,8%; малых – почти в 2 раза ниже уровня средних лимфоцитов.

После нанесения экспериментальной механической травмы животным опытной группы в 1-е и 3-и сутки (завершающая фаза альтерации и острого воспаления) изменения лимфоцитов в мозговом слое тимуса характеризовались тенденцией к снижению содержания средних лимфоцитов на 3,4% и на 6,1% соответственно в сравнении с группой контроля. Содержание больших и малых лимфоцитов имело тенденцию к увеличению в 1-е и 3-е сутки – на 1,7% и 3,4%, и на 1,7% и 2,7% соответственно в сравнении с контролем.

На 15-е сутки количество средних лимфоцитов имело тенденцию к увеличению и составило 55,9±2,3% по сравнению с фазой острого воспаления, а содержание больших и малых лимфоцитов – к снижению на 32,2% и 4,1% соответственно.

К 25-м суткам опыта показатели содержания всех разновидностей лимфоцитов в мозговом слое тимуса практически не отличались от контрольного уровня.

Заключение

Таким образом, результаты анализа количественного исследования динамики лимфоцитов в процессе заживления механической раны бедра у крыс в фазе альтерации и острого воспаления выявили увеличение числа больших лимфоцитов и снижение количества средних и малых лимфоцитов, а начиная с фазы регенерации – уменьшение количества больших лимфоцитов и увеличение количества средних и малых лимфоцитов, что свидетельствует о начальной стадии восстановительного процесса и снижении реактивного напряжения со стороны лимфопоэза. В корковом слое отмечается опустошение клеточного состава в основном за счет малых лимфоцитов, а в мозговом слое – средних лимфоцитов; процесс нормализации соотношения разных видов лимфоцитов начинается в фазе пролиферации, а полное восстановление достигается в фазе адаптивной перестройки тканей. Полученные результаты могут быть использованы в экспертной практике с целью определения давности механических повреждений.

Список литературы

1. Халиков А.А., Кузнецов К.О., Канзафарова Г.А., Искужина Л.Р., Халикова Л.В. Современный взгляд на методы определения давности повреждений в практике судебно-медицинского эксперта // Судебно-медицинская экспертиза. 2022. Т. 65. № 1. С. 57-61.
2. Thapa P., Farber D.L. The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thoracic Surgery Clinics*. 2019. vol. 29. no. 2. P. 123-131.
3. Shissler S.C., Bhandoola A. ThymUS in times of stress. *Nature Immunology*. 2021. vol. 22. no. 5. P. 545-549.
4. Piekarska A., Pérès M., Toton M., Kulczycka M., Lewandowski K., Vergez F. Identification of circulating regulatory T lymphocytes with membrane markers - a new multiparameter flow cytometry protocol. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2021. vol. 59. no. 2. P. 75-85.
5. Hu W.T., Howell J.C., Ozturk T., Gangishetti U., Kollhoff A.L., Hatcher-Martin J.M., Anderson A.M., Tyor W.R. CSF Cytokines in Aging, Multiple Sclerosis, and Dementia. *Frontiers in Immunology*. 2019. no. 10. P. 480.
6. Bortolotti P., Faure E., Kipnis E. Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. *Frontiers in Immunology*. 2018. no. 9. P. 1900.
7. Мурзабаев Х.Х., Кашапов И.Г. Способ дозированной передачи кинетической энергии снаряда повреждаемым тканям // Морфология. 2001. Т. 120. № 6. С. 83–84.
8. Kondo T. Timing of skin wounds. *Legal Medicine*. 2007. vol. 9. no. 2. P. 109–114.