

*Н.А. Шутский, С.Л. Кашутин, Н.В. Шерстенников, Д.В. Мизгирёв,
Н.С. Феленко, А.К. Шерстенникова*

СООТНОШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА И КРОВИ ПРИ РЕМОДЕЛИРОВАНИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ ПОСЛЕ ОСТРОГО ОТМОРОЖЕНИЯ

ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Архангельск, Российская Федерация

Резюме. В настоящее время накоплено большое количество данных об участии лимфоцитов в ходе репаративной регенерации. Однако информация о морфологических дифференциациях этих клеток в процессе ремоделирования внеклеточного матрикса дермы отсутствует. **Цель.** Изучить соотношение содержания лимфоцитов костного мозга и крови в зависимости от их морфологической дифференцировки при ремоделировании внеклеточного матрикса дермы после острого локального отморожения. **Объект и методы исследования.** Объектами экспериментальных исследований были выбраны 100 практически здоровых крыс в возрасте 4–5 месяцев. Лабораторные животные были условно разделены на 5 групп (n=20). У четырех групп было смоделировано контактное отморожение 3 степени и одна группа была использована в качестве контрольной. **Результаты.** На 3-е сутки после воздействия острого локального отморожения в дерме сформировался лейкоцитарный вал, состоящий главным образом из нейтрофильных лейкоцитов, на фоне уменьшения содержания коллагена дермы и толщины его волокон. Реактивные изменения со стороны некоторых морфологических форм лимфоцитов заключались в преобладании процессов трансмиграции: из костного мозга в кровь – малых лимфоцитов, из крови в дерму – больших лимфоцитов. С повышением содержания дермального коллагена и толщины коллагеновых волокон на 7-е сутки начала проявляться активация клеток, наблюдаемая преимущественно в крови. На 21-е сутки, когда сформировался эпидермис, а под ним – рубцовая ткань, в костном мозге проявилась активация лимфоцитов, результатом которой являлось накопление больших лимфоцитов, в то же время в крови увеличилась концентрация неактивных (малых) форм лимфоцитов, а также снизилось содержание больших форм. **Заключение.** Появление статистически значимой сильной корреляции между увеличением содержанием коллагена дермы и снижением концентрации больших лимфоцитов крови, по всей видимости, можно считать проявлением реципрокных взаимоотношений, не проявившихся в более раннем периоде ремоделирования.

Ключевые слова: острое отморожение, ремоделирование, внеклеточный матрикс, лимфоциты, костный мозг, кровь

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Шерстенникова Александра Константиновна

a.sherstennikova@yandex.ru

Дата поступления: 05.08.2024

Образец цитирования: Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Шерстенников Н.В., Мизгирёв Д.В., Феленко Н.С., Шерстенникова А.К. Соотношение содержания морфологических вариантов лимфоцитов костного мозга и крови при ремоделировании внеклеточного матрикса дермы после острого отморожения. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2024, Том 21, № 5, с. 574–585, DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-5-574-585

Введение

К настоящему времени накоплены факты, свидетельствующие о влиянии лимфоцитов на ход регенеративного процесса. Выявлено, что Т-лимфоциты посредством TNF- α и IFN γ подавляют секрецию коллагена фибробластами, участвуют в ангиогенезе, синтезируя VEGF, регулируют рост стволовых клеток, повышая способность образовывать колонии, что ускоряет восстановление кровотока. Подтверждена опосредованная роль Т-лимфоцитов в процессах репарации путем индуцирования дегрануляции тучных клеток. В-лимфоциты также влияют на продуктивную фазу воспаления через стимуляцию ангиогенеза [1].

Реализация механизмов, посредством которых происходит регуляция регенеративного процесса, напрямую зависит от функционального состояния лимфоидных клеток. Активация иммунных функций Т-лимфоцитов приводит к снижению способности стимулировать клеточный тип регенерации, иными словами, между реализацией иммунных функций и влиянием на регенерацию существуют реципрокные отношения [2].

Функциональная активность внутриклеточных процессов в тканях сопряжена с морфологической дифференцировкой лейкоцитов, в частности, лимфоцитов. Увеличение площади цитоплазмы и ядра лимфоцитов периферической крови напрямую связано с их функциональной активацией, и наоборот, при уменьшении площади лимфоцитов происходит понижение их уровня активации ввиду замедления метаболизма [3].

Учитывая организацию иммунной системы в организме, возникают вопросы: где топографически происходит активация лимфоцитов в ходе регенеративного процесса? Только в периферической крови? Имеется вовлеченность костного мозга? Если имеется, то насколько эта вовлеченность выражена и на какие сутки регенеративного процесса? Эти вопросы представляют не только теоретический интерес, но и практический. Получение ответов на них необходимо учитывать, исходя из организации иммунной системы организма.

Известно, что полипотентная стволовая клетка является источником различных ростков кровотока, в том числе и лимфоцитарного. Влияние стромальных клеток костного мозга обеспечивает направление дифференцировки в ранние предшественники Т-клеток, В-клеток и естественных киллеров. Созревание В-лимфоцитов происходит в красном костном мозге. Ежедневный выход зрелых В-лимфоцитов из костного мозга в кровь обеспечивает полное обновление популяции периферических В-лимфоцитов за 4–5 суток. Созревание Т-лимфоцитов связано с тимусом. После формирования пула Т-клеток в периферической крови значение тимуса снижается. С одной стороны, это обусловлено тем, что количество Т-лимфоцитов поддерживается за счет долгоживущих клеток, для которых нет необходимости в постоянном обновлении, а с другой стороны, за счет избирательной пролиферации в ответ на встречу с антигеном.

Таким образом, **целью** научного исследования являлось изучение соотношения содержания лимфоцитов костного мозга и крови в зависимости от их морфологической дифференцировки при ремоделировании внеклеточного матрикса дермы после острого локального отморожения.

Материалы и методы исследований

Объектами экспериментальных исследований были выбраны 100 беспородных практически здоровых крыс в возрасте 4–5 месяцев, с массой тела 180–200 г. Все лабораторные крысы, у которых моделировали острое отморожение, были разделены условно на 5 экспериментальных групп по 20 особей в каждой. В качестве контрольной группы (n=20) были отобраны интактные крысы, содержащиеся на стандартном пищевом рационе. Все этапы исследования проводились с использованием хлороформного наркоза по закрытому контуру.

Моделирование острого отморожения

Экспериментальное моделирование острого отморожения проводили на беспородных самцах и самках крыс, находящихся в одинаковых условиях на стандартном пищевом рационе. После наступления наркотического сна проводили контактное отморожение с помощью металлической гирьки диаметром 2,5 см, которую предварительно охлаждали в жидком азоте, а потом прикладывали к полностью депилированной коже спины крысы на 3 минуты, согласно методу [4]. В результате такого холодового воздействия у экспериментальных животных развивалось контактное отморожение

3-й степени. В последующем обработка раневой поверхности включала ежедневную обработку 0,01 % водным раствором хлоргексидина. Вывод из эксперимента лабораторных животных проводили путем передозировки средства для наркоза на 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки.

Площадь поражения вычисляли по формуле $S=d^2\pi/4$, где d – диаметр, а π – константа, равная 3,14.

Методика панч-биопсии кожи в зоне поражения

Панч-биопсия – это методика забора патологического материала, преимущественно кожи, с помощью специального трубчатого скальпеля-панча. Эта методика позволяет получить цилиндрический образец кожи заданного диаметра (в настоящей работе использовали панч-скальпель $\varnothing=5$ мм).

При заборе материала панч наводили перпендикулярно поверхности кожи, растягивая ее по сторонам. При этом необходимо было слегка надавить на панч сверху вниз и вращать его по и против часовой стрелки, после чего биоптат дермы извлекали из полости панч-скальпеля с помощью иглы.

Далее препарат кожи фиксировали в 10% формалине и после стандартной гистологической проводки полученные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином.

Методика определения содержания коллагена дермы

Содержание коллагена дермы определяли в соответствии с разработанным и предложенным нами методом [5]. На первом этапе кусочек пораженной дермы, полученный при помощи панч-скальпеля №5, высушивали. Для этого предварительно взвешенный и замороженный при -80°C в 1 мл 0,9% изотонического раствора хлорида натрия кусочек ткани высушивали в лиофильной сушилке при температуре -46°C и давлении 0,040 мБар, измельчали путем нарезания микротомным лезвием на фрагменты толщиной не более 3 мм. На втором этапе кусочек кожи подготавливали к ферментативному гидролизу. Полученные фрагменты помещали в градуированную пробирку типа Eppendorf вместимостью 1,5 мл, заливали 1 мл 15% водного раствора гидроксида натрия на 24 часа при температуре $18-20^\circ\text{C}$, после чего неоднократно промывали дистиллированной водой при температуре $18-20^\circ\text{C}$ в объеме 1 мл. После достижения целевого уровня pH надосадочной жидкости 7,0 супернатант аспирировали дозатором таким образом, чтобы количество осадка в пробирке не превышало 0,3 мл. Полученный материал замораживали при -80°C , высушивали в лиофильной сушилке и взвешивали на аналитических весах, определяя массу материала m_1 . На третьем этапе проводили ферментативный гидролиз коллагена. Полученный безводный осадок разводили в 900 мкл фосфатного буферного раствора (pH=7,0) и добавляли 100 мкл раствора коллагеназы (Россия), который заранее приготавливали путем растворения лиофильно высушенного препарата коллагеназы в 10 мл фосфатного буферного раствора (pH=7,0). Затем пробирку с содержимым устанавливали в шейкер инкубатор ES 20 (BioSan, Латвия) при температуре 37°C и интенсивно перемешивали в течение 2 ч. После этого пробирку центрифугировали при 13 400 об/мин в течение 5 мин, аспирировали дозатором надосадочную жидкость, добавляли дистиллированную воду до объема 1 мл, гомогенизировали полученный материал. Процедуру, включающую гомогенизацию путем ресуспендирования дозатором, центрифугирование, аспирацию надосадочной жидкости и добавление воды до объема 1 мл, повторяли 5 раз. После этого материал замораживали при -80°C , лиофильно высушивали и взвешивали, определяя массу материала m_2 . По разнице масс m_1 и m_2 определяли массу коллагена, содержавшегося в исследуемой ткани. Процентное содержание коллагена в ткани определяли как отношение определенной массы коллагена к массе образца ткани. Таким образом, содержание коллагена вычисляли по формуле:

$m_{\text{коллагена}} = m_1 - m_2$, где m_1 – масса кожи до ферментативного гидролиза, г;
 m_2 – масса кожи после ферментативного гидролиза, г.

Долю содержания коллагена в ткани вычисляли по формуле:

% содержания коллагена = $m_{\text{коллагена}} / m_{\text{образца}} \text{ ткани} \cdot 100 \%$.

Методика выделения коллагеновых волокон дермы

Нами разработан метод выделения коллагеновых волокон [6]. Фиксированный в гистологическом забуференном 10% нейтральном формалине кусочек кожи, полученный путем панч-биопсии, без

предварительной заморозки нарезали микротомным ножом на мелкие фрагменты толщиной не более 3 мм, помещали полученные фрагменты в центрифужную градуированную пробирку. Заливали фрагменты 1 мл 50 % водного раствора гидроксида калия на 15 часов, после чего удаляли из пробирки раствор щелочи путем аспирации пипеткой Пастера и наливали дистиллированную воду при температуре 18–20°C в объеме 5 мл. Гомогенизировали материал при помощи струи воды из пипетки Пастера объемом 2 мл в течение 2–3 минут, доводили объем воды в пробирке до 10 мл и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. После центрифугирования аспирировали воду из пробирки таким образом, чтобы осадок на дне пробирки находился в объеме жидкости, не превышающем 0,5 мл, измеряли рН при помощи универсальной индикаторной бумаги, добавляли дистиллированную воду до объема 5 мл и повторно гомогенизировали материал способом, описанным выше. Цикл гомогенизации и центрифугирования повторяли до достижения нейтрального уровня рН надосадочной жидкости, но не менее пяти раз. После достижения целевого уровня рН суспендировали полученный материал путем многократного пассажа содержимого пробирки пипеткой Пастера. Полученную суспензию переносили в градуированную пробирку типа Eppendorf, вместимостью 1,5 мл, замораживали при –80°C и лиофильно высушивали. После полного высушивания лиофилизат переносили на двухсторонний скотч для дальнейшего исследования в сканирующем электронном микроскопе.

Методика электронно-сканирующей микроскопии

Изображения образцов получали с использованием SEM Sigma VP Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Для увеличения контрастности и качества изображения образцов на расщепленную поверхность было нанесено золото-палладиевое покрытие толщиной 5 нм в соотношении 80:20. Для этой обработки использовали распылитель Q150T ES (Quorum Technologies Ltd, Великобритания). У образцов измеряли толщину коллагеновых волокон с помощью программного обеспечения SmartTiff (Carl Zeiss, Германия). Толщину коллагеновых волокон определяли с помощью программного обеспечения SmartTiff (Carl Zeiss SMT Ltd, Германия).

Методика оценки морфологической дифференцировки лимфоцитов в крови и костном мозге

Забор крови для гематологического исследования проводили после торакотомии путем пункции полости сердца перед выведением животного из эксперимента. Забор костного мозга осуществляли из проксимального отдела бедренной кости [7].

Мазки крови и костного мозга после фиксации окрашивали по Романовскому – Гимзе и подсчитывали лейкограмму и миелограмму соответственно с учетом морфологических особенностей лимфоцитов: подсчитывали 100 зрелых лимфоцитов, дифференцируя их по величине размера цитоплазмы, подразделяя на малые лимфоциты до 8 мкм (а), средние – от 8 до 12 мкм (б) и большие – более 12 мкм (в) [7, 8].

Методика статистической обработки результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью SPSS 13.0 для Windows. Распределение параметров было ненормальным, в связи с чем описание выборок проводили с помощью подсчета среднего значения медианы (Me) и межквартильного интервала (Q25; Q75). Вероятность различий оценивали по непараметрическим критериям Колмогорова – Смирнова (Z). Корреляционный анализ проводился с определением коэффициента Кендалла (τ). Статистическая достоверность присваивалась при значении $p < 0,05$.

Результаты

На 3-е сутки после холодового воздействия в зоне поражения эпидермальный слой был разрушен, в дерме наблюдались некротические и воспалительные реакции в виде реорганизации волокнистых структур разрушения волосяных фолликулов и сальных желез, скопления клеток преимущественно нейтрофильного ряда (рис. 1). Указанные изменения сопровождались снижением % содержания дермальноколлагена (с 71,43% (59,21; 72,78) до 21,71% (16,37; 22,51); $Z=1,87$; $p=0,020$) и толщины его волокон (с 11,11 мкм (10,08; 13,90) до 3,36 мкм (3,08; 4,42); $Z=2,02$; $p=0,001$).

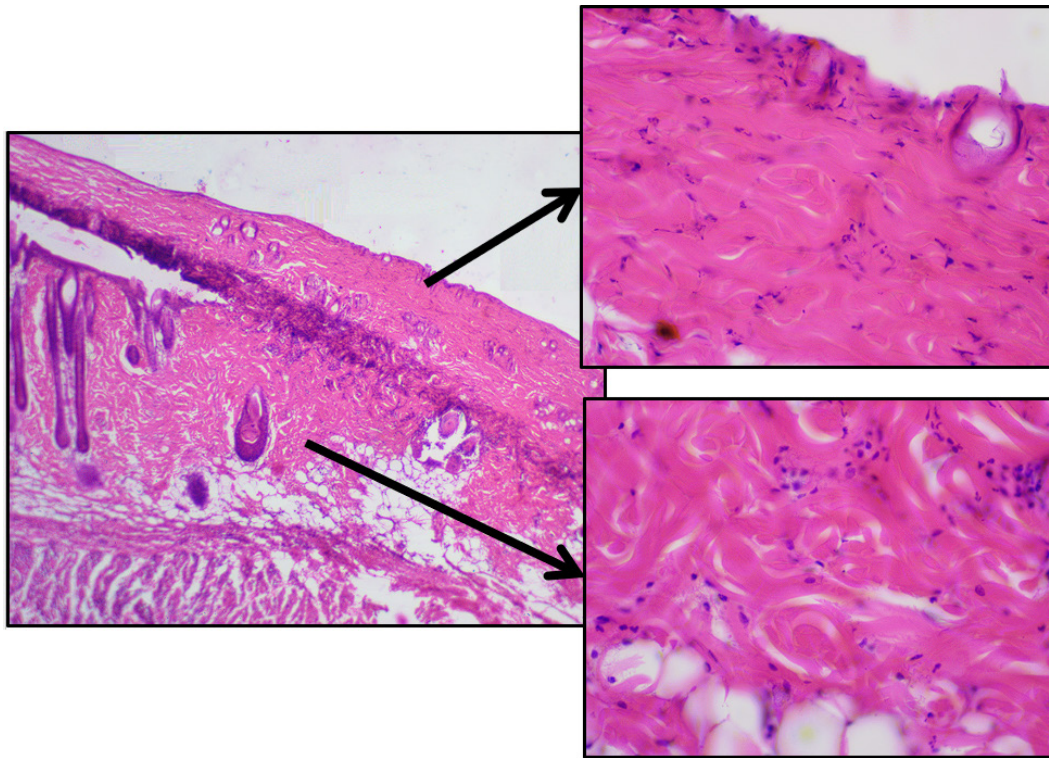


Рисунок 1. Поврежденная кожа на 3-е сутки после острого отморожения (гематокислин-эозин, Об. 5(40), Ок. 10).

Figure 1. Damaged skin on the 3rd day after acute frostbite (hematoxylin-eosin, Lens 5(40), Ocular 10).

Реактивные сдвиги в структуре лимфоцитогаммы костного мозга на 3-и сутки, в сравнении с лимфоцитогаммой контрольной группы (рис. 2), после острого локального отморожения проявились в статистически значимом снижении концентрации малых лимфоцитов (с 4,6 % (3,5; 5,5) до 1,4 % (1,2; 2,8); $Z=2,05$; $p=0,00$) на фоне некоторого снижения уровня средних по размеру лимфоцитов (с 5,3 % (3,7; 8,0) до 3,4 % (2,0; 4,6); $Z=1,01$; $p=0,25$) и увеличения содержания больших лимфоцитов (с 0,8 % (0,3; 1,5) до 1,6 % (0,8; 2,0); $Z=1,03$; $p=0,23$).

На 7-е сутки понижение концентрации малых по размеру лимфоцитов, по сравнению с группой контроля (рис. 2), в костном мозге сопровождалось увеличением их уровня в периферической крови (с 20,0 % (17,0; 27,2) до 38,0 % (30,5; 42,5); $Z=1,93$; $p=0,001$) на фоне снижения содержания больших лимфоцитов (с 16,5 % (9,7; 22,5) до 2,5 % (0,2; 8,5); $Z=2,0$; $p=0,001$). Концентрации среднеплазменных лимфоцитов не изменились (54,0 % (42,2; 59,2) и 56,0 % (48,5; 60,0); $Z=0,42$; $p=0,99$).

На 7-е сутки за счет полиморфноядерных лейкоцитов был сформирован лейкоцитарный вал (рис. 3). В области подкожной жировой клетчатки наблюдались начальные процессы формирования новой соединительной ткани, состоящей из тонких коллагеновых волокон и клеток фибробластического дифферона, что нашло подтверждение в виде увеличения в зоне холодового воздействия % содержания коллагена дермы (с 21,71 % (16,37; 22,51) до 31,15 % (30,02; 33,55); $Z=1,79$; $p=0,003$) и толщины его волокон (с 3,36 мкм (3,08; 4,42) до 5,65 мкм (5,09; 6,08); $Z=1,93$; $p=0,001$).

В костном мозге на 7-е сутки после моделирования локальной острой холодовой травмы на фоне незначительной тенденции к увеличению содержания малых (с 1,4 % (1,2; 2,8) до 3,4 % (1,3; 6,5); $Z=0,84$; $p=0,47$) и больших лимфоцитов (с 1,6 % (0,8; 2,0); $Z=0,95$; $p=0,32$) значительно увеличилась концентрация среднеплазменных лимфоцитов (с 3,4 % (2,0; 4,6) до 11,6 % (9,0; 14,4); $Z=2,02$; $p=0,001$).

В структуре лимфоцитогаммы крови регистрировали тенденцию к снижению числа малых лимфоцитов (с 38,0 % (30,5; 42,5) до 26,0 % (14,5; 38,2); $Z=1,26$; $p=0,08$) на фоне статистически значимого увеличения удельного веса больших лимфоцитов (с 2,5 % (0,2; 8,5) до 15,5 % (10,3; 30,0); $Z=2,37$; $p=0,000$). Уровень средних по размеру лимфоцитов никак не изменился (56,0 % (48,5; 60,0) и 53,0 % (48,5; 59,0); $Z=0,79$; $p=0,56$).

На 14-е сутки в зоне локального холодового воздействия с периферии сформировавшегося струпа

начал восстанавливаться эпидермис. Под струпом появилась грануляционная ткань, состоящая из многочисленных тонких соединительнотканых волокон, с высоким количеством сосудов микроциркуляторного русла и скоплением фибробластических и малодифференцированных клеток, макрофагов, лимфоцитов. Преимущественная область для миграции клеток определена в сетчатой зоне дермы на границе с подкожной жировой клетчаткой (рис. 4).

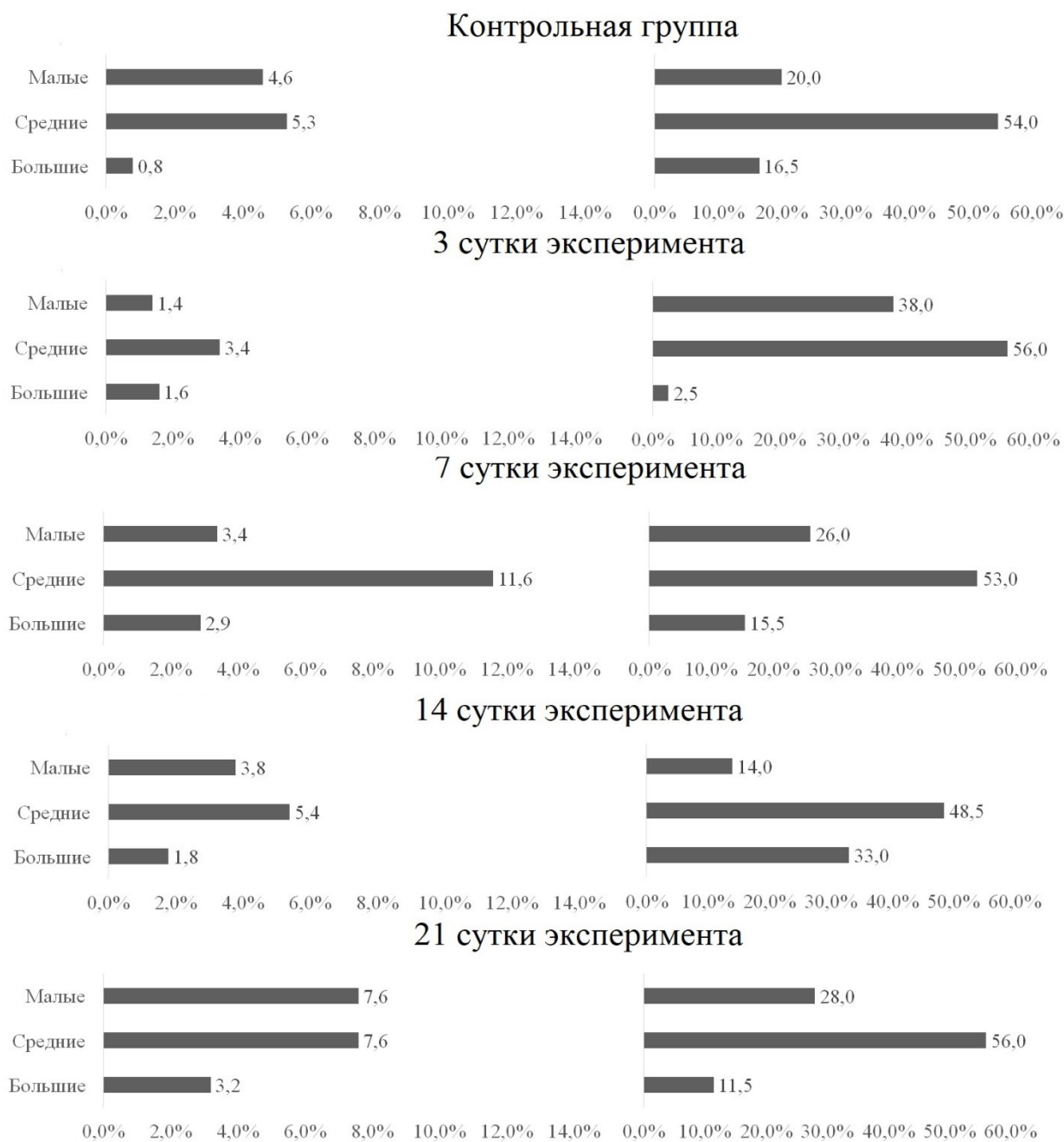


Рисунок 2. Соотношение содержания лимфоцитов костного мозга (слева) и периферической крови (справа) в зависимости от их морфологии.

Figure 2. The ratio of the content of bone marrow lymphocytes (left) and peripheral blood (right), depending on their morphology.

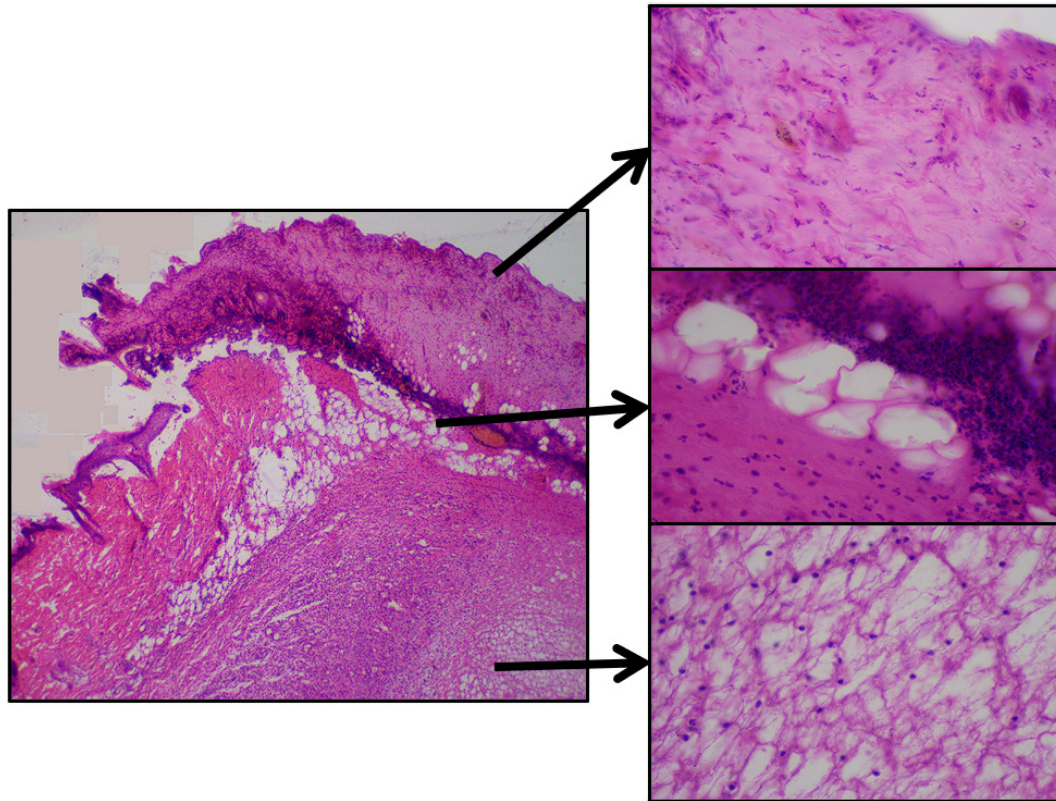


Рисунок 3. Поврежденная кожа на 7-е сутки после острого отморожения (гематокислин-эозин Об. 5(40), ок. 10).

Figure 3. Damaged skin on the 7th day after acute frostbite (hematoxylin-eosin, Lens 5(40), Ocular 10).

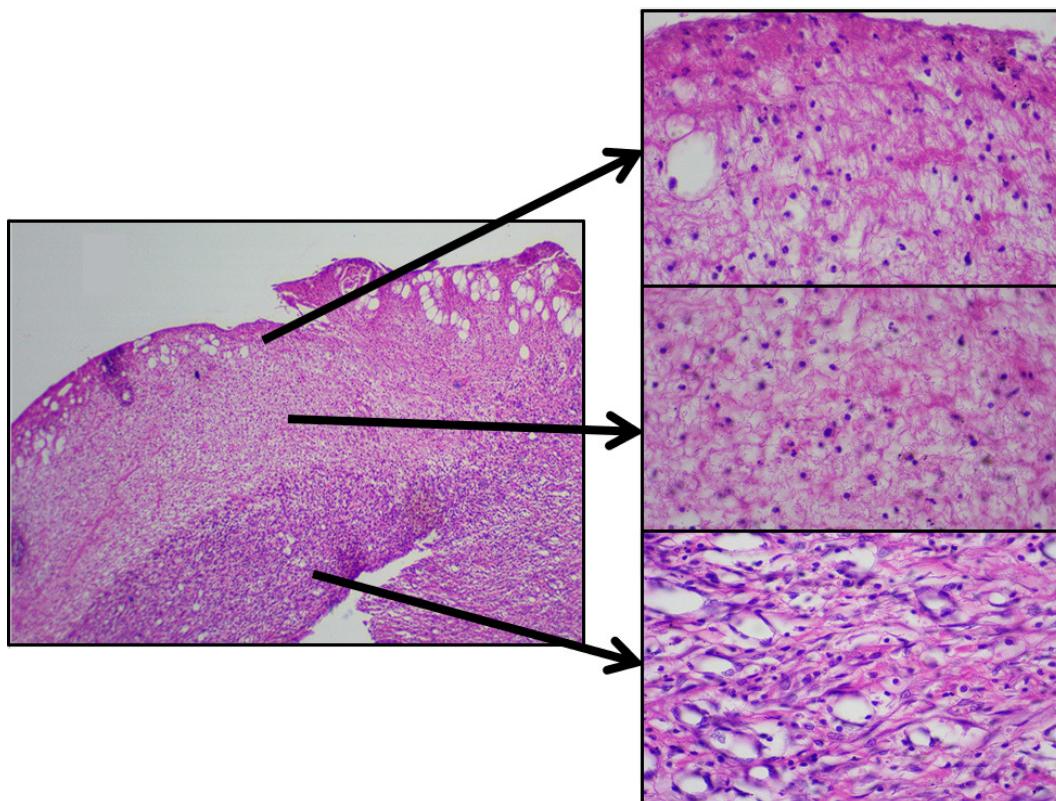


Рисунок 4. Поврежденная кожа на 14-е сутки после острого отморожения (гематокислин-эозин Об. 5(40), ок. 10).

Figure 4. Damaged skin on the 14th day after acute frostbite (hematoxylin-eosin, Lens 5(40), Ocular 10).

В костном мозге на 14-е сутки после моделирования локального отморожения наблюдали резкий спад в содержании среднеплазменных лимфоцитов (с 11,6 % (9,0; 14,4) до 5,4 % (4,6; 6,6); $Z=1,79$;

$p=0,003$) на фоне несущественных изменений в уровне больших (с 2,9 % (1,2; 4,9) до 1,8 % (1,4; 2,4); $Z=0,98$; $p=0,28$) и малых лимфоцитов (3,4 % (1,3; 6,5) и 3,8 % (2,8; 5,0); $Z=0,81$; $p=0,53$).

В крови на 14-е сутки на фоне тенденции к снижению концентрации малых лимфоцитов (с 26,0 % (14,5; 38,2) до 14,0 % (10,0; 22,0); $Z=1,26$; $p=0,08$) произошло увеличение содержания больших лимфоцитов в 2 раза (с 15,5 % (10,3; 30,0) до 33,0 % (26,0; 42,3); $Z=1,73$; $p=0,005$). Удельный вес среднеплазменных лимфоцитов не изменился (53,0 % (48,5; 59,0) и 48,5 % (44,0; 53,5); $Z=0,94$; $p=0,32$).

На 21-е сутки в зоне локального холодового воздействия сформировался эпидермис, под которым выявлена рубцовая ткань (рис. 5).

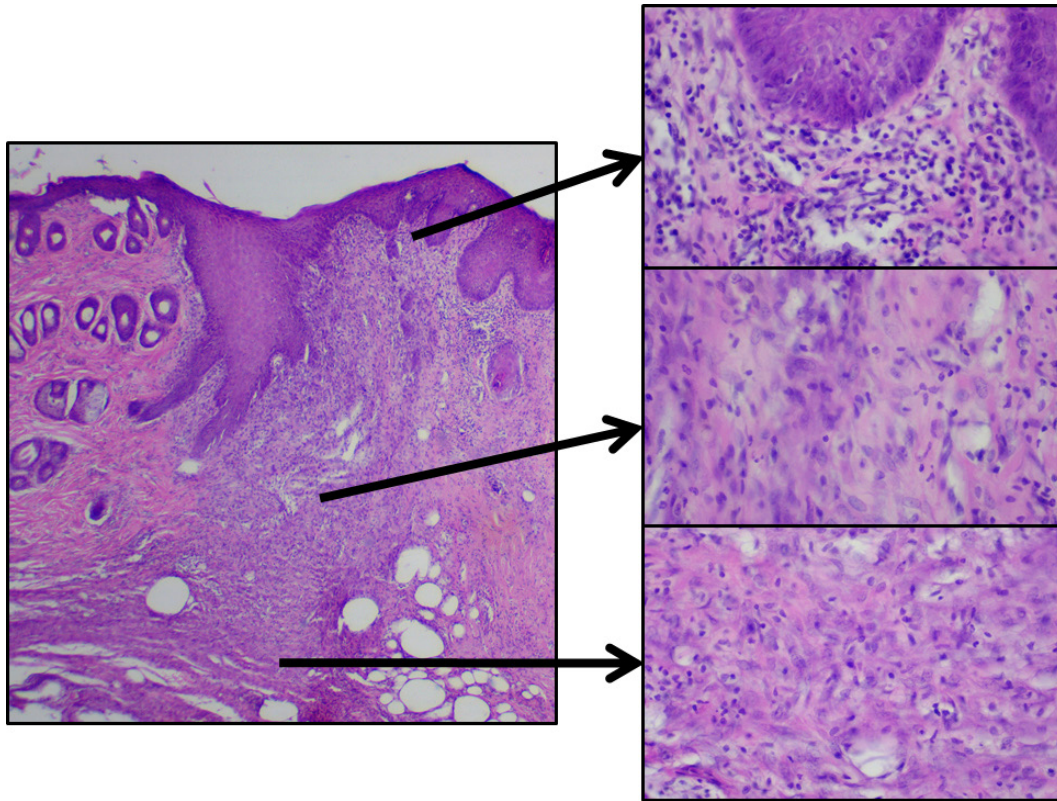


Рисунок 5. Поврежденная кожа на 21 сутки после острого отморожения (гематокислин-эозин Об. 5(40), ок. 10).

Figure 5. Damaged skin on the 21st day after acute frostbite (hematoxylin-eosin, Lens 5(40), Ocular 10).

В структуре лимфоцитограммы костного мозга регистрировали увеличение удельного веса только больших лимфоцитов (с 1,8% (1,4; 2,4) до 3,2% (1,9; 7,1); $Z=2,68$; $p=0,00$). Если в содержании малых лимфоцитов и наблюдалась тенденция к увеличению (с 3,8% (2,8; 5,0) до 7,6% (3,3; 10,0); $Z=1,31$; $p=0,06$), то реакции со стороны среднеплазменных форм практически не было (5,4% (4,6; 6,6) и 7,6% (4,9; 11,3); $Z=0,94$; $p=0,33$). Таким образом, различия в содержании малых и средних лимфоцитов к 21-м суткам с контрольными значениями отсутствовали ($Z=1,19$; $p=0,11$ и $Z=0,78$; $p=0,57$), тогда как уровень больших лимфоцитов значительно превышал исходные цифры (3,2% (1,9; 7,1) против 0,8% (0,3; 1,5); $Z=1,5$; $p=0,02$).

В структуре лимфоцитограммы крови на 21-е сутки содержание малых лимфоцитов увеличилось (с 14,0% (10,0; 22,0) до 28,0% (22,5; 46,5); $Z=1,89$; $p=0,001$), а концентрация больших лимфоцитов уменьшилась (с 33,0% (26,0; 42,5) до 11,5% (8,0; 18,0); $Z=2,68$; $p=0,00$). Динамики изменений в отношении среднеплазменных лимфоцитов не регистрировали (48,5% (44,0; 53,5) и 56,0% (46,0; 62,0); $Z=1,1$; $p=0,17$). Таким образом, различия в содержании средних и больших лимфоцитов к 21-м суткам с контрольными значениями отсутствовали ($Z=0,54$; $p=0,92$ и $Z=0,87$; $p=0,43$), тогда как уровень малых лимфоцитов значительно превышал исходные цифры (28,0% (22,5; 46,5) против 20,0% (17,0; 27,2); $Z=1,62$; $p=0,01$).

Обсуждение

На 3-е сутки после экспериментального моделирования острого локального отморожения в ответ на разрушение эпидермиса и дермы происходят изменения в структуре лимфоцитограмм, затраги-

вающие не только кровь, но и костный мозг. Факты понижения концентрации малых лимфоцитов в костном мозге и повышения их содержания в крови позволили предположить о поступлении малых лимфоцитов из костного мозга в кровь. Возможно, эта миграция клеток является проявлением компенсаторной реакции в ответ на резкое снижение содержания в крови больших лимфоцитов (практически в 6 раз), что могло быть вызвано выходом активированных форм лимфоцитов из крови в зону повреждения. Необходимо также отметить, что увеличение содержания больших лимфоцитов в костном мозге проявилось в виде слабой тенденции. Иными словами, на 3-е сутки после локального холодового отморожения малые лимфоциты мигрируют из костного мозга в кровь, а большие (активированные формы) – из крови в зону повреждения. При этом морфологических свидетельств активации лимфоцитов ни в костном мозге, ни в крови на 3-е сутки после холодовой травмы нет.

На 7-е сутки после острого отморожения в зоне непосредственного поражения сформировался лейкоцитарный вал преимущественно за счет полиморфноядерных лейкоцитов, фибробласты активно синтезировали коллагеновые волокна. Наряду с этим начала проявляться активация лимфоцитов как в костном мозге, так и в крови. Это подтвердилось статистически значимым увеличением содержания среднеплазменных лимфоцитов в костном мозге и больших форм в периферической крови. Таким образом, чем больше по размеру площадь клетки, тем интенсивнее в них протекают метаболические процессы, следовательно, можно предположить, что в периферической крови процессы активации лимфоцитов идут более интенсивно, чем в костном мозге.

На 14-е сутки в зоне холодового поражения клеточный состав изменился: стали преобладать фибробластические и малодифференцированные клетки, макрофаги, лимфоциты. Наряду с этим концентрация среднеплазменных лимфоцитов в костном мозге значительно снизилась ($Z=1,79$; $p=0,003$). Однако в крови в 2 раза увеличилось содержание больших лимфоцитов ($Z=1,73$; $p=0,005$), что еще раз доказывает предположение о том, что в крови процессы активации лимфоцитов более интенсивны, чем в костном мозге. Также в костном мозге происходит активация до среднеплазменных лимфоцитов, а формирование пула больших лимфоцитов происходит уже в крови.

На 21-е сутки, когда раневая зона покрылась эпидермисом, под которым стала определяться плотная рубцовая ткань, в костном мозге произошла активация лимфоцитов, о чем указывало увеличение содержания больших форм клеток, превышающее цифры в контрольной группе. В крови концентрация больших лимфоцитов снизилась и уже не отличалась от контрольной группы, а уровень малых лимфоцитов увеличился в 2 раза ($Z=2,68$; $p=0,00$), превысив соответствующий показатель контрольной группы. Увеличение содержания коллагена в зоне повреждения на 21-е сутки после острого локального отморожения отрицательно коррелировало со снижением концентрации больших лимфоцитов крови: $r=-0,88$; $p=0,03$. В более ранние сроки ремоделирования внеклеточного матрикса дермы статистически значимых корреляционных связей не регистрировали.

Заключение

На 3-е сутки после моделирования острого локального отморожения в дерме формируется лейкоцитарный вал, состоящий преимущественно из нейтрофилов, на фоне снижения % содержания коллагена дермы (с 71,43% (59,21; 72,78) до 21,71% (16,37; 22,51); $Z=1,87$; $p=0,020$) и толщины его волокон (с 11,11 мкм (10,08; 13,90) до 3,36 мкм (3,08; 4,42); $Z=2,02$; $p=0,001$). Реактивные изменения со стороны различных морфологических форм лимфоцитов заключаются в преобладании процессов миграции: малых лимфоцитов из костного мозга в кровь, из крови в ткань – больших лимфоцитов. С повышением % содержания дермального коллагена и толщины коллагеновых волокон на 7-е сутки начала проявляться активация клеток, наблюдаемая преимущественно в крови. На 21-е сутки, когда сформировался эпидермис, а под ним – рубцовая ткань, в костном мозге проявилась активация лимфоцитов, результатом которой являлось накопление больших лимфоцитов, в то же время в крови увеличилась концентрация неактивных (малых) форм лимфоцитов, а также снизилось содержание больших форм. Появление статистически значимой сильной корреляции между увеличением содержания коллагена дермы и снижением концентрации больших лимфоцитов крови, по всей видимости, можно считать проявлением реципрокных взаимоотношений, не проявившихся в более раннем периоде ремоделирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юшков Б.Г., Тюменцева Н.В., Ходаков В.В. Сосуды костного мозга и гемопоэз. С., Германия: La pLambert Academic Publishing, 2013; 264.

2. Храмова Ю.С. Роль иммунной системы в регуляции регенерации тканей с разной восстановительной способностью: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Екатеринбург, 2004; 184
3. Новодержкина Ю.К., Караштин В.В., Моруков Б.В. и др. Морфометрические показатели лимфоцитов периферической крови в условиях 120-суточной антиортостатической гипокинезии. Клиническая лабораторная диагностика. 1996; 1: 40-41.
4. Бойко В.В., Миловидова А.Э., Яновская Л.Г., Брусницына М.П., Исаев Ю.И., Логачев В.К., Леонтьева Л.В. Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы // Вестник морфологии. 2010; 16(3): 526-528.
5. Патент РФ 2689337 Способ определения количества коллагена в ткани / Малявская С.И., Кашутин С.Л., Шутский Н.А., Шагров Л.Л., Мизгирёв Д.В., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г.; Заявл. 02.07.2018, Оpubл. 27.05.2019. Бюлл. № 15.
6. Патент РФ 2764514 Способ выделения коллагеновых волокон дермы / Горбатова Л.Н., Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Малявская С.И., Шагров Л.Л., Мизгирёв Д.В., Чухчин Д.Г.; Заявл. 23.12.2020, Оpubл. 18.01.2022. Бюлл. № 2.
7. Федоров Н.А. Регуляция пролиферации кроветворных клеток. М.: Медицина, 1977; 160.
8. Зак К.П., Киндзельский Л.П., Бутенко А.К. Большие гранулосодержащие лимфоциты и патологические процессы. Киев: Наукова думка, 1992; 205.

Авторы

Шутский Никита Алексеевич

Кандидат биологических наук, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии
nikitashutskij@rambler.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0979-1569>

Кашутин Сергей Леонидович

Доктор медицинских наук, заведующий кафедрой кожных и венерических болезней
sergeycash@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-3059>

Шерстенников Николай Владимирович

Ассистент кафедры фармакологии и фармации
shersten96@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1606-3775>

Мизгирёв Денис Владимирович

Доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии
denimsur@rambler.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6804-3790>

Феленко Николай Сергеевич

Ассистент кафедры хирургии
nikolaiifelenko@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3591-8247>

Шерстенникова Александра Константиновна

Доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры нормальной физиологии
a.sherstennikova@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8576-6459>

ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Архангельск, Российская Федерация

*N.A. Shutskiy, S.L. Kashutin, N.V. Sherstennikov, D.V. Mizgiriyov,
N.S. Felenko, A.K. Sherstennikova*

THE RATIO OF MORPHOLOGICAL VARIANTS OF BONE MARROW AND BLOOD LYMPHOCYTES IN THE MODULATION OF THE INTERCELLULAR MATRIX OF THE DERMIS AFTER ACUTE FROSTBITE

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
"Northern State Medical University", Arkhangelsk, Russian Federation

Abstract. Currently, a large amount of data has been accumulated on the involvement of lymphocytes in the course of reparative regeneration. However, there is no information about the morphological differentiation of these cells during the remodeling of the extracellular matrix of the dermis. **Aim.** To study the ratio of bone marrow and blood lymphocytes depending on their morphological differentiation during remodeling of the intercellular matrix of the dermis after acute local frostbite. **Materials and methods.** 100 practically healthy rats with a body weight of 180–200 g at the age of 4–5 months were selected as objects of experimental research. Laboratory animals in which acute frostbite was simulated were conditionally divided into 5 groups of 20 individuals each. Intact mongrel rats kept on a standard diet were used as a control group (n=20). Contact frostbite was reproduced using a metal weight pre-cooled in liquid nitrogen. All stages of the study were performed using closed-circuit chloroform anesthesia. The withdrawal of animals from the experiment was carried out by overdosing on anesthesia on days 3, 7, 14 and 21, followed by histological examination. **Results.** On the 3rd day after acute local frostbite, a leukocyte shaft is formed in the dermis, consisting mainly of neutrophils, against the background of a decrease in the % content of collagen in the dermis and the thickness of its fibers. Reactive changes on the part of various morphological forms of lymphocytes consist in the predominance of migration processes: small lymphocytes from bone marrow to blood, large ones from blood to tissue. With an increase in the % content of collagen in the dermis and the thickness of collagen fibers on the 7th day, cell activation began to manifest, observed mainly in the blood. On the 21st day, when the epidermis was formed, and scar tissue under it, lymphocyte activation appeared in the bone marrow, which resulted in the accumulation of large lymphocytes, at the same time, the concentration of inactive (small) forms of lymphocytes increased in the blood, and the content of large forms decreased. **Conclusion.** The appearance of a statistically significant strong correlation between an increase in the collagen content of the dermis and a decrease in the concentration of large blood lymphocytes, apparently, can be considered a manifestation of reciprocal relationships that did not manifest themselves in the earlier period of remodeling.

Keywords: acute frostbite, remodeling, extracellular matrix, lymphocytes, bone marrow, blood

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Aleksandra K. Sherstennikova

a.sherstennikova@yandex.ru

Received: 05.08.2024

For citation: Shutskiy N.A., Kashutin S.L., Sherstennikov N.V., Mizgiriyov D.V., Felenko N.S., Sherstennikova A.K. The ratio of morphological variants of bone marrow and blood lymphocytes in the modulation of the intercellular matrix of the dermis after acute frostbite. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki.=Journal of Ural Medical Academic Science. 2024, Vol. 21, no. 5, pp. 574–585. DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-5-574-585 (In Russ)

REFERENCES

1. Yushkov B.G., Tyumentseva N.V., Khodakov V.V. Bone marrow vessels and hematopoiesis. S., Germany: Lap Lambert Academic Publishing, 2013; 264. (in Russ)

2. Khramtsova Yu.S. The role of the immune system in the regulation of tissue regeneration with different regenerative capacity: dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences. Yekaterinburg, 2004; 184. (in Russ)
3. Novoderzhkina Y.K., Karashtin V.V., Morukov B.V. et al. Morphometric parameters of peripheral blood lymphocytes in conditions of 120-day antiorthostatic hypokinesia. Clinical laboratory diagnostics. 1996; 1: 40–41. (in Russ)
4. Bojko V. V., Milovidova A. E., Yanovskaya L. G., Brusnicyna M. P., Isaev Yu. I., Logachev V. K., Leont'eva L. V. Study of morphological features in the tissues of experimental animals when modeling cold injury // Vestnik morfologii. 2010. 16,(3): 526–528. (in Russ)
5. Patent RF 2689337 Method for determining the amount of collagen in tissue /Malyavskaya S.I., Kashutin S.L., Shutskij N.A., Shagrov L.L., Mizgiriyov D.V., Aksenov A.S., Chuhchin D.G.; Zayavl. 02.07.2018, Opubl. 27.05.2019. Byull. № 15.(in Russ)
6. Patent RF 2764514 Method of isolation of collagen fibers of the dermis/ Gorbatova L.N., Shutskij N.A., Kashutin S.L., Malyavskaya S.I., Shagrov L.L., Mizgiriyov D.V., Chuhchin D.G.; Zayavl. 23.12.2020, Opubl. 18.01.2022. Byull. № 2.(in Russ)
7. Fedorov N.A. Regulation of the proliferation of hematopoietic cells. M.: Medicine, 1977; 160. (in Russ)
8. Zak K.P., Kindzelsky L.P., Butenko A.K. Large granule-containing lymphocytes (natural killer cells) in pathology. K.: Naukova dumka, 1992; 162. (in Russ)

Authors

Nikita A. Shutskiy

Candidate of Biological Sciences, Assistant, Department of Histology, Cytology and Embryology
nikitashutskij@rambler.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0979-1569>

Sergej L. Kashutin

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Skin and Venereal Diseases
sergeycash@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-3059>

Nikolaj V. Sherstennikov

Assistant, Department of Pharmacology and Pharmacy
shersten96@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1606-3775>

Denis V. Mizgiriyov Dr. of Sci. (Medicine)

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Surgery
denimsur@rambler.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6804-3790>

Nikolaj S. Felenko

Assistant, Department of Surgery
nikolaifelenko@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3591-8247>

Aleksandra K. Sherstennikova

Doctor of Medical Sciences, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Normal Physiology

a.sherstennikova@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8576-6459>

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Northern State Medical University"
Arkhangelsk, Russian Federation