

Субпопуляции лимфоцитов периферической крови как маркер тяжёлой механической травмы мягких тканей бедра у крыс: иммуноцитохимическое исследование и ROC-анализ

А.Х. Ланичева¹, В.В. Семченко²

¹Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия;

²Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Травмы и ожоги сопровождаются изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов, что отражает системную реакцию иммунной системы. ROC-анализ — это анализ классификаций, применяемых с помощью ROC-кривых. ROC-кривая (от англ. receiver operating characteristic) представляет собой график, позволяющий оценить качество бинарной классификации; он отображает соотношение между долей объектов от общего количества носителей признака, верно классифицированных как положительные по данному признаку (чувствительностью алгоритма классификации), и долей от общего количества объектов, не несущих признака, но ошибочно классифицированных как положительные. Используя ROC-кривую можно выявить основные диагностические критерии, характеризующие тяжесть травмы, и определить стадии посттравматического периода, основываясь на данных об общем числе лимфоцитов и процентном соотношении различных субпопуляций (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD56⁺). Такой подход позволяет прогнозировать основные патогенетические механизмы раневого процесса.

Цель исследования — с использованием иммуноцитохимических методов изучить реакции различных типов лимфоцитов периферической крови (Т-клеток, В-клеток и NK-клеток) в ответ на механическую травму мягких тканей бедра у крыс.

Методы. Исследование выполнено на белых беспородных самцах крыс массой 180–200 г. С помощью специальной установки у животных (под эфирным наркозом) индуцировали механическое повреждение бедра, соизмеримое по кинетической энергии с повреждением от пули калибра 5,6 мм. Животных выводили из эксперимента через 3 и 14 суток после травмы в утренние часы путём декапитации; предварительно осуществляли забор крови из хвостовой вены. Количественную оценку субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови выполняли с помощью панели моноклональных антител; определяли относительное и абсолютное количество клеток, относящихся к следующим субпопуляциям: CD3⁺ — все Т-лимфоциты; CD4⁺, CD8⁺ и CD19⁺ — В-лимфоциты; CD56⁺ — NK-клетки. Статистическая обработка данных (ROC-анализ) проведена с помощью прикладных программ STATISTICA v.7.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты. ROC-анализ позволяет точно оценить качество бинарной классификации — влияние какого-либо фактора на состояние компонентов, составляющих систему изучения. В данной работе с помощью ROC-анализа показано влияние (да/нет) фактора наличия высококинетической травмы мягких тканей бедра и фактора времени (3 и 14 суток после повреждения) на относительное содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови крыс.

Заключение. Установлено, что на 3-е сутки посттравматического периода под действием повреждения у животных изменилось относительное содержание всех субпопуляций лимфоцитов. Через 14 суток изменения ROC-кривых выявлены только для В-лимфоцитов и NK-клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что присоединение фактора времени влияет в основном на В-лимфоциты и NK-клетки, но не затрагивает Т-лимфоциты.

Ключевые слова: механическая травма; субпопуляции лимфоцитов; ROC-анализ.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Ланичева А.Х., Семченко В.В. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови как маркер тяжёлой механической травмы мягких тканей бедра у крыс: иммуноцитохимическое исследование и ROC-анализ // Морфология. 2026. Т. 164, № 3. С. XX–XX. DOI: 10.17816/morph.685115 EDN: AYUDGN

© Эко-Вектор, 2026

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

Морфология / Morphology

Оригинальные исследования / Original Study Articles

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.685115>

Рукопись получена: 19.06.2025

Рукопись одобрена: 22.09.2025

Опубликована online: 16.02.2026

Peripheral blood lymphocyte subpopulations as a marker of severe mechanical soft tissue injury in rats: immunocytochemical study and ROC analysis

Albina Kh. Lanicheva¹, Valery V. Semchenko²
¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;
²Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: In trauma and burns, changes in various lymphocytes subpopulations occur, which reflects the immune system's response. In this regard, using ROC analysis, it is possible to identify the main diagnostic criteria for the severity of trauma and the stage of the post-traumatic period, including determining the total number of lymphocytes and the percentage of various subpopulations (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD56+), which allows us to predict the main pathogenetic mechanisms of the wound process.

AIM: Study of the reaction of different types of peripheral blood lymphocytes (T cells, B cells, NK cells) in response to mechanical trauma of soft tissues of the thigh in rats using immunocytochemical methods.

METHODS: The study was performed on white mongrel male rats weighing 180-200 g, which were subjected to mechanical damage to the thigh using a special device, comparable in kinetic energy to a 5.6 mm bullet. All manipulations were performed under ether anesthesia. Animals were withdrawn from the experiment by decapitation 3 and 14 days after the injury, blood was collected from the tail vein in the morning. A quantitative assessment of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes was carried out using a panel of monoclonal antibodies; the relative and absolute content of the following lymphocyte subpopulations was identified: CD3+ (all T-lymphocytes), CD4+ (T-helpers), CD8+ (T-cytotoxic lymphocytes), CD19+ (B-lymphocytes), CD56+ (NK-cells). Statistical data processing was performed using the STATISTICA V.7.0 application programs ("StatsoftInc", USA) (ROC analysis).

RESULTS: ROC analysis allows us to accurately assess the quality of binary classification – the influence of any factor on the state of the components of the study system. In the present case, it makes it possible to prove the influence (yes or no) of the factor of the presence of highly kinetic trauma to the soft tissues of the thigh on the relative content of individual subpopulations of lymphocytes in the peripheral blood of a white rat 3 and 14 days after exposure, as well as the time factor.

CONCLUSION: ROC analysis showed that after 3 days, the animals in the post-traumatic period had such an impact on the body that changed the relative content of all lymphocyte subpopulations. After 14 days, the ROC curves changed, but only for B lymphocytes and NK cells. This indicated that the addition of the time factor affected mainly B lymphocytes and NK cells, but did not affect T lymphocytes.

Keywords: mechanical trauma; lymphocyte subpopulations; ROC analysis.

TO CITE THIS ARTICLE:

Lanicheva AKh, Semchenko VV. Subpopulations of different types of peripheral blood lymphocytes as a marker of the presence of severe mechanical trauma to soft tissues of the thigh in rats (according to immunocytochemical research and ROC analysis). *Morphology*. 2026;164(3):XX-XX. DOI: 10.17816/morph.685115 EDN: AYUDGN

© Eco-Vector, 2026

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

Received: 19.06.2025

Accepted: 22.09.2025

Published online: 16.02.2026

ОБОСНОВАНИЕ

Механическая травма мягких тканей различной локализации сопровождается сложными патофизиологическими изменениями, затрагивающими не только локальную область повреждения, но и вызывающими системные реакции организма, включая активацию иммунной системы [1]. Лимфоциты периферической крови играют одну из ключевых ролей в регуляции воспалительного ответа и репаративных процессов, а также в поддержании иммунного гомеостаза [2]. Однако реакция лимфоцитов на тяжёлую механическую травму, особенно в контексте дифференцированного ответа различных субпопуляций (Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток), остаётся недостаточно изученной [3].

Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью углублённого понимания иммунных процессов, активирующихся при обширном повреждении мягких тканей. Известно, что тяжёлая травма может приводить к гипервоспалительному ответу и последующему иммунодефицитному состоянию, что повышает риск инфекционных осложнений и замедляет процессы регенерации [4]. В последние годы активно изучается роль различных субпопуляций лимфоцитов в посттравматическом воспалении, однако большинство работ посвящено клиническим аспектам, тогда как экспериментальные исследования, особенно с применением иммуноцитохимических методов, остаются немногочисленными [5].

В литературе имеются данные о том, что травма мягких тканей приводит к изменению соотношения $CD4^+/CD8^+$ Т-лимфоцитов, активации НК-клеток и модуляции В-клеточного ответа [6]. Однако результаты исследований часто противоречивы, что может быть связано с различиями в способах моделирования травмы, сроках анализа и методах оценки иммунного статуса [7]. Кроме того, недостаточно изучена динамика субпопуляционного состава лимфоцитов в разные сроки после тяжёлой механической травмы, хотя она имеет важное значение для разработки методов иммунокоррекции [8].

Для изучения диагностической ценности различных субпопуляций лимфоцитов (Т-, В- и НК-клеток) в качестве маркеров тяжёлой механической травмы мягких тканей используют ROC-анализ и логистическую регрессию. Такой подход позволяет количественно оценить изменения лимфоцитарного профиля и выявить наиболее информативные параметры, основываясь на определении абсолютного и относительного содержания $CD3^+$ и $CD19^+$ клеток, а также соотношений $CD16^+/CD56^+$ и $CD4^+/CD8^+$ лимфоцитов [9]. ROC-анализ обеспечивает расчёт площади под кривой (Area Under the Curve, AUC), определение пороговых значений, а также оценку чувствительности и специфичности каждого параметра, что позволяет выявлять наиболее перспективные маркеры, ассоциированные с тяжестью травмы.

Особое внимание в литературе уделяется комбинациям нескольких иммунологических параметров, например одновременному анализу уровня НК-клеток и соотношения $CD4^+/CD8^+$ лимфоцитов, что повышает диагностическую точность [10]. Для такого анализа используются методы многомерной статистики, включая логистическую регрессию, позволяющую построить интегральные диагностические модели, а также провести сравнение с традиционными маркерами травматического повреждения [11].

Считается, что наибольший диагностический потенциал имеют показатели, отражающие раннюю иммунную дисфункцию: уменьшение числа $CD4^+$ лимфоцитов, увеличение количества НК-клеток и изменение $CD4^+/CD8^+$ соотношения. Подобные данные могут стать основой для разработки новых критериев оценки тяжести травмы, прогнозирования осложнений и мониторинга эффективности терапии. Включение нескольких временных точек и контрольной группы обеспечивает надёжность результатов исследования [12].

По данным литературы, изучение показателей крови, отражающих иммунную дисфункцию, вносит вклад в понимание патогенетических механизмов посттравматической иммунной дисрегуляции и служит основой для разработки новых стратегий иммуномодулирующей терапии при тяжёлых повреждениях мягких тканей [13].

Цель исследования — с использованием иммуноцитохимических методов изучить реакции различных типов лимфоцитов периферической крови (Т-клеток, В-клеток и НК-клеток) в ответ на механическую травму мягких тканей бедра у крыс.

МЕТОДЫ**ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ**

Проведено экспериментальное проспективное контролируемое нерандомизированное исследование. Экспериментальные группы формировали в зависимости от длительности посттравматического периода (3 и 14 суток после механической травмы). Экспериментальная работа выполнена на лабораторных животных (крысах) в условиях экспериментальной модели тяжёлой механической травмы мягких тканей бедра.

КРИТЕРИИ ОТБОРА

Критерии включения: белые беспородные крысы обоего пола; масса тела 180–200 г; удовлетворительное общее состояние перед началом эксперимента.

Критерии исключения: гибель животного до завершения всех запланированных этапов наблюдения; выявленные патологии или инфекционные процессы, не связанные с моделью травмы.

Критерии невключения: масса тела вне заданного диапазона; наличие признаков хронических заболеваний или выраженной слабости.

СОДЕРЖАНИЕ ЖИВОТНЫХ

Животных содержали в виварии, входящем в состав комплекса «чистых помещений». Условия содержания: температура воздуха 20–26 °С, относительная влажность 50–60%, освещение — искусственное, с 12-часовым световым периодом. Крыс содержали в металлических клетках размером 60×40×50 см, по 2 особи в клетке. В качестве подстилки использовали древесную стружку. Основа рациона — гранулированный корм (Дельта Фидс ЛБК 120 С-19, «БиоПро», Россия), иногда для стачивания зубов выдавали твёрдый корм — морковь. Постоянный доступ к питьевой воде через автоматические поилки, которые ежедневно дезинфицируются.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Условия проведения эксперимента

Все экспериментальные процедуры выполнены в соответствии с требованиями к содержанию и работе экспериментально-биологических клиник (вивариев). Эксперименты проведены в условиях вивария ФГБОУ ВО БГМУ в весенний период. Моделирование травмы и забор биологического материала осуществляли в утренние часы. Внешняя обобщаемость результатов ограничена использованием только одного вида лабораторных животных (крыс) и одноцентровым характером исследования.

Распределение в группы

Период включения животных в исследование составил 2 недели. Период наблюдения включал следующие контрольные точки: интактные животные (без механической травмы), крысы через 3 и 14 суток после травмы. Все временные интервалы были соблюдены согласно протоколу исследования.

Животных ($n=18$) разделили на две группы: контрольная группа — интактные крысы ($n=6$); опытная группа — крысы после тяжёлой механической травмы мягких тканей бедра ($n=12$). Внутри опытной группы выделили две подгруппы в зависимости от времени, прошедшего после травмы мягких тканей бедра: 3 суток ($n=6$) и 14 суток ($n=6$). Исходные группы животных формировали путём случайной рандомизации животных с использованием таблицы случайных чисел.

Экспериментальное воздействие

Животным опытной группы моделировали тяжёлую механическую травму мягких тканей правой задней конечности с помощью специальной установки, основанной на принципе падающего груза и позволяющей имитировать высококинетическое повреждение [14]. Процедуру проводили под эфирным наркозом. Обезболивающие средства в ходе эксперимента не применяли в соответствии с протоколом исследования. Контролем служили интактные крысы. После моделирования травмы всех животных содержали в одинаковых условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде.

Моделирование травмы в опытных подгруппах проводили в разные дни таким образом, чтобы забор крови соответствовал срокам после травмы 3 и 14 суток. Кровь у животных обеих групп (опытной и контрольной) забирали одновременно, из хвостовой вены в утренние часы в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Лимфоциты выделяли методом центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-P (ООО «Экотек», Россия). Полученную суспензию лимфоцитов промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS).

ЦЕЛЕВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ**Основной показатель исследования**

Основным исходом исследования является определение относительного и абсолютного содержания нескольких субпопуляций лимфоцитов в периферической крови — CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD56⁺ клеток, характеризующих системный иммунный ответ организма крысы на тяжёлую механическую травму мягких тканей бедра.

Дополнительные показатели исследования

Дополнительными исходами исследования служат: определение временной динамики числа Т-лимфоцитов (CD3⁺); анализ изменений соотношения CD4⁺/CD8⁺ клеток; определение колебаний количества В-лимфоцитов (CD19⁺) и NK-клеток (CD56⁺) в различные периоды посттравматического воспаления.

Методы регистрации исходов

Для количественной оценки различных субпопуляций лимфоцитов в образцах периферической крови использовали ручной иммуноцитохимический метод с применением моноклональных антител: к маркеру всех Т-лимфоцитов — CD3 (клон F7.2.38; M725429-2, Agilent Technologies, США), CD4 (клон 4B12; M731001-2, Agilent Technologies, США), CD8 (клон C8/144B; M710301-2, Agilent Technologies, США), маркеру В-лимфоцитов — CD19 (клон LT20; C706601-2, Agilent Technologies, США), маркеру NK-клетки — CD56 (клон 8E11-E6-F7; 8930279, Agilent Technologies, США) [15].

На предметные стёкла с лунками, предварительно обработанные 0,1% поли-L-лизинном (Serva, Германия), наносили суспензию лимфоцитов — по 20 мкл клеточной взвеси с концентрацией 5×10^6 /мл в каждую лунку — и инкубировали во влажной камере при температуре 37 °С в течение 5–10 минут. Затем клетки фиксировали в 70% этиловом спирте (1–2 мин при комнатной температуре) и промывали в PBS 3 раза по 5 мин. На подготовленные таким образом клетки наносили специфические моноклональные антитела (по 20 мкл, в разведении 1/100) или PBS в качестве контроля. Образцы инкубировали во влажной камере 30 мин при комнатной температуре (18–25 °С). Стёкла трижды промывали в PBS и наносили по 20 мкл вторичных антител (ab214882, Abscam, Великобритания), инкубировали 10 мин при комнатной температуре. На последнем этапе стёкла снова промывали в PBS, наносили стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой (по 20 мкл в разведении 1:1000; ООО «Имтек», Россия), инкубировали 10 мин при комнатной температуре, после чего промывали в PBS. В каждую лунку вносили по 30 мкл приготовленного *ex tempore* 3,3'-диаминобензидин тетрахлорида, инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре, промывали в дистиллированной воде и подсушивали.

Для визуализации и подсчёта иммунопозитивных клеток использовали бинокулярный световой микроскоп Axioscop (Carl Zeiss, Германия); CD-позитивные клетки имели отчётливое коричневое окрашивание. Определяли относительное содержание (%) клеток, экспрессирующих исследуемые CD-маркеры, которое рассчитывали как отношение числа CD-позитивных клеток к общему числу клеток в каждом образце; подсчёт проводили в 20 непересекающихся полях зрения фиксированной площади.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы STATISTICA v.7.0 (StatSoft Inc., США). Характер распределения вариационных рядов определяли с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка ($p < 0,05$); он не соответствовал требованиям к применению параметрических критериев, поэтому проверку статистических гипотез при сравнении независимых групп проводили с помощью непараметрических методов — критерия Манна–Уитни для парного сравнения и критерия χ^2 . Количественные данные представлены в виде относительных значений (доля от 1,0). Построение гистограмм распределения относительного содержания разных типов лимфоцитов выполнено в среде R с использованием пакета R Commander (Rcmdr) [16]. Использована ядерная оценка плотности — непараметрический способ оценки плотности случайной величины. Ядерная оценка плотности является задачей сглаживания данных. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Построение ROC-кривых, а также определение AUC, порогов отсечения, чувствительности и специфичности проводили с помощью программы MedCalc (1993–2022, MedCalc Software Ltd., Бельгия). Эти переменные являются важными статистическими показателями, демонстрирующими вероятность правильного прогноза и силу модели при наблюдении тестовой переменной. ROC-анализ позволяет оценивать площадь под кривой для отдельных показателей, а также сравнивать две ROC-кривые между

собой. ROC-анализ был дополнен логистической регрессией, которая позволяет построить модели связей и широко используется в гистологии [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение относительного содержания Т- и В-лимфоцитов в периферической крови контрольных крыс близко к нормальному ($p > 0,20$) и отличается от такового для НК-клеток ($p = 0,02$; **рис. 1, 2**). Через 3-е суток после травмы распределение $CD4^+$ клеток также отличается от нормального ($p = 0,02$); распределение клеток, иммунопозитивных на остальные исследованные маркеры, не изменилось. Через 14 суток после травмы отличается от нормального распределение $CD8^+$ клеток ($p = 0,001$), В-лимфоцитов ($p = 0,02$) и НК-клеток ($p = 0,001$; **см. рис. 1, 2**). Эти результаты свидетельствуют о статистически значимом изменении распределения показателей после травмы. Кроме характера распределения изменилась и относительная плотность субпопуляций лимфоцитов ($p = 0,01$), что продемонстрировано на гистограммах (**см. рис. 1, 2**). Через 3-е суток после травмы плотность субпопуляций уменьшилась, а через 14 суток — частично восстанавливалась.

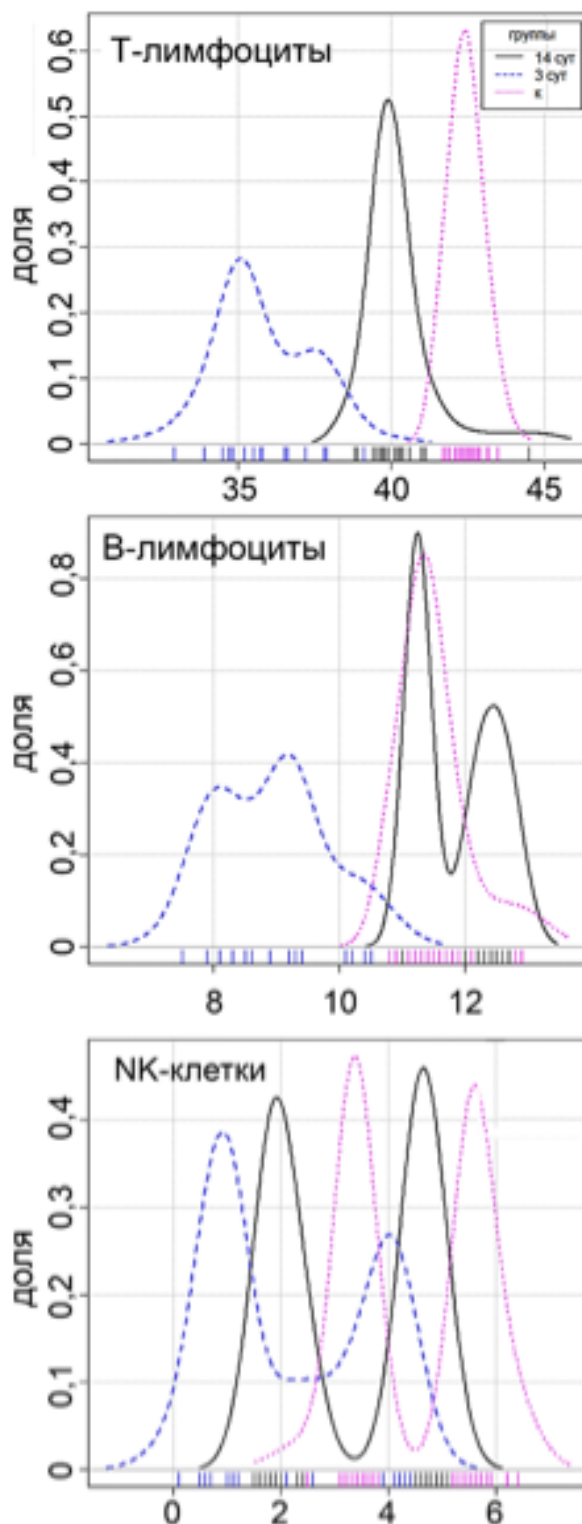


Рис. 1. Гистограммы распределения основных типов лимфоцитов в периферической крови крыс после травмы мягких тканей бедра: по оси X — относительное содержание клеток в поле зрения (%), по оси Y — доля полей зрения с соответствующим содержанием клеток; точечная кривая — контроль, пунктирная кривая — через 3 суток после травмы, сплошная кривая — через 14 суток после травмы.

Fig. 1. The histogram of the content (percentage, rel.unit, ordinate) the mane types of lymphocytes studied in terms of content (% , the abscissa) in peripheral blood of white rats after hip injury. Note (in pic. 1 and 2: the solid curve – after 14 days, dotted line – after 3 days, spot map - control).

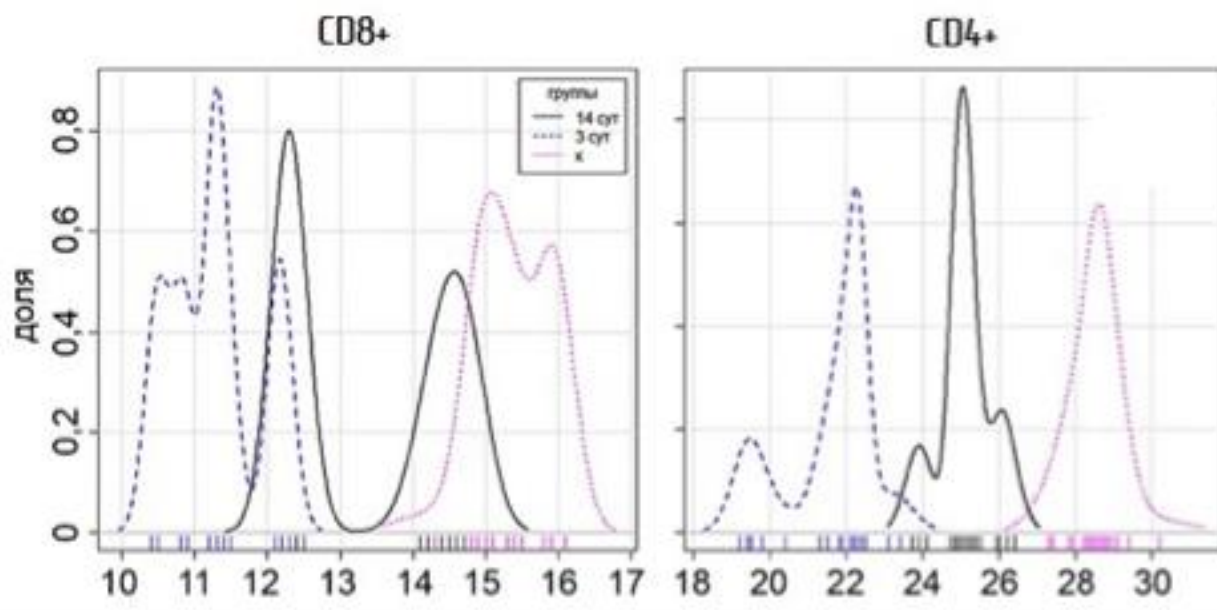


Рис. 2. Гистограммы распределения Т-лимфоцитов в периферической крови белых крыс после травмы мягких тканей бедра: по оси X — относительное содержание клеток в поле зрения (%), по оси Y — доля полей зрения с соответствующим содержанием клеток; точечная кривая — контроль, пунктирная кривая — через 3 суток после травмы, сплошная кривая — через 14 суток после травмы.

Fig. 2. Comparison of histograms showing relative distribution (%) of T-lymphocyte subsets (x-axis) in peripheral blood of rats following femoral trauma.

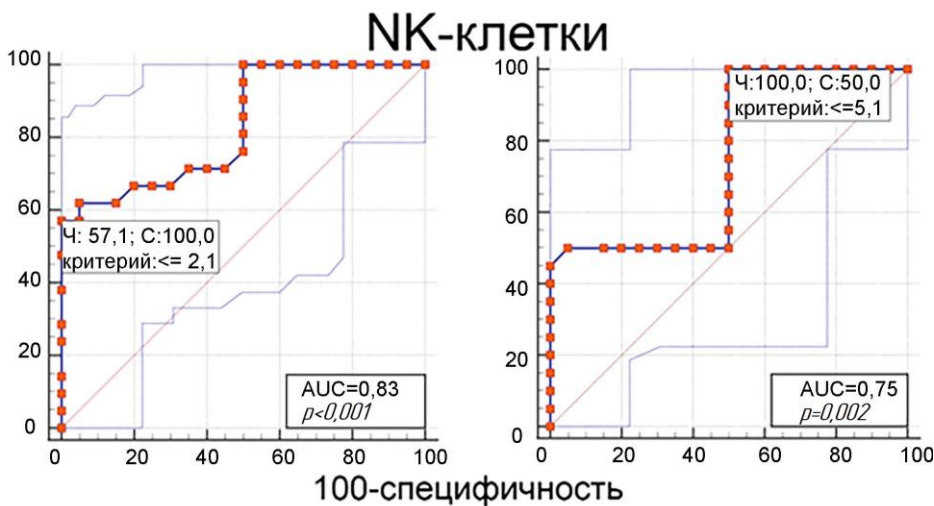
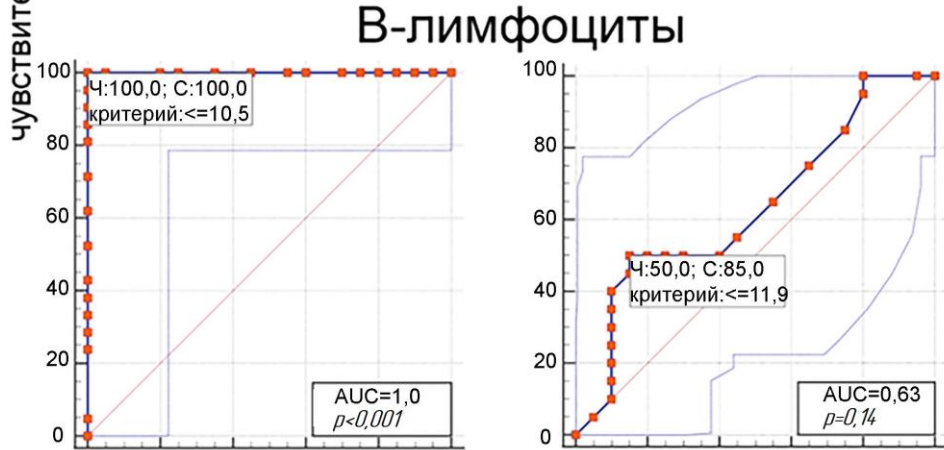
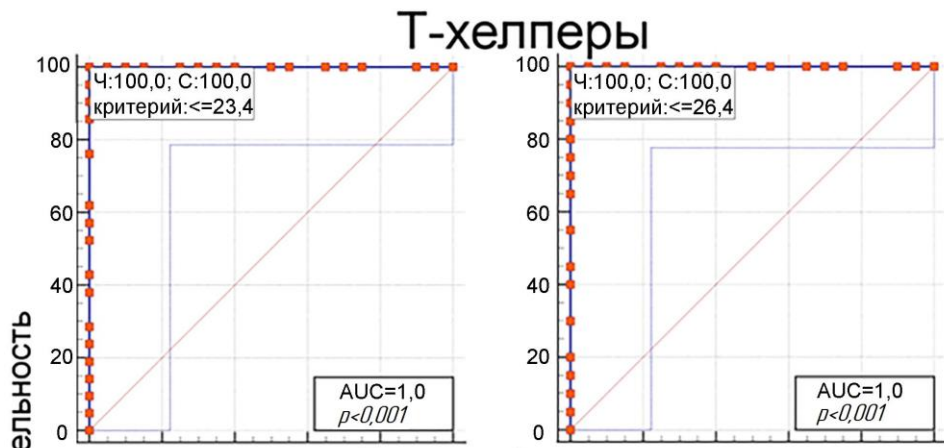
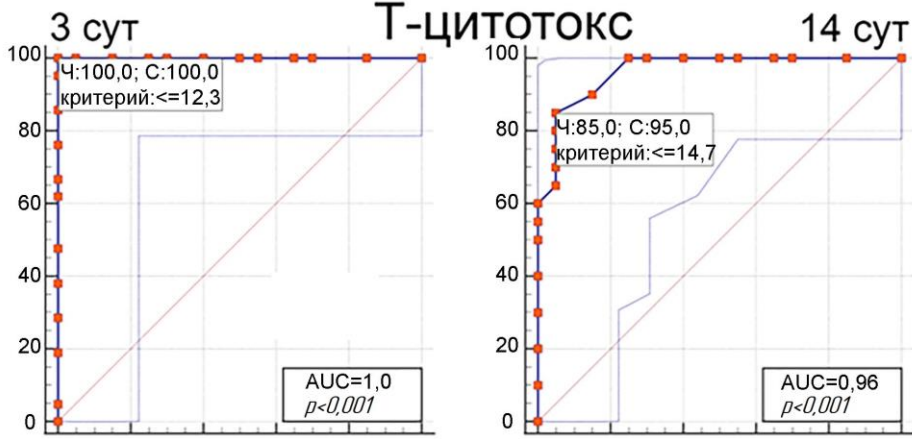
ROC-анализ позволяет точно оценить качество бинарной классификации — влияние какого-либо фактора на состояние составляющих систему изучения компонентов. В настоящей работе мы использовали ROC-анализ для оценки влияния (да/нет) фактора наличия высококинетической травмы мягких тканей бедра и фактора времени (через 3 и 14 суток после воздействия) на относительное содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови крыс.

Сравнили три группы:

- контрольные животные (нет травмы — 0) и через 3-е суток после воздействия (есть травма, острый период — 1);
- контрольные животные (нет травмы — 0) и через 14 суток после воздействия (есть травма, отдалённый период — 1);
- травма через 3-е суток (острый период — 0) и травма через 14 суток (отдалённый период — 1).

На ROC-кривых видно, что через 3-е суток после травмы все переменные свидетельствуют о воздействии посттравматических изменения в организме на относительное содержание всех субпопуляций лимфоцитов (рис. 3). При этом основной показатель связи между фактором травмы и содержанием лимфоцитов — AUC — достигает очень высоких значений (0,82–1,00). Через 14 суток после травмы изменения ROC-кривых отмечены только для В-лимфоцитов и НК-клеток. Это свидетельствует о том, что присоединение фактора времени повлияло в основном на В-лимфоциты и НК-клетки, но не на Т-лимфоциты.

В третьей группе сравнения (посттравматический период через 3 и 14 суток), учитывающей временной фактор, установлено, что все переменные (разные типы лимфоцитов) могут служить предикторами длительности периода, прошедшего с момента травмы (рис. 4).



Морфология / Morphology

Оригинальные исследования / Original Study Articles

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.685115>

- Рис. 3.** ROC-кривые основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови крыс через 3 и 14 суток после травмы мягких тканей бедра — влияние фактора наличия травмы: по оси X — 100-специфичность (доля ложноположительных результатов в %), по оси Y — чувствительность (%); Т-цитотокс — цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺); AUC — площадь под кривой; Ч — чувствительность; С — специфичность.
- Fig. 3.** Graphs of ROC-curves the mane types of lymphocytes in peripheral blood after 3 and 14 days after hip injury: results of sensitivity and specificity determination, AUC (the area under the curve) and criteria for clipping (with injury, without injury) variables. The factor is the presence of injury. Sensitivity – the proportion of positive, 100-specificity – the proportion of false positive results (%).

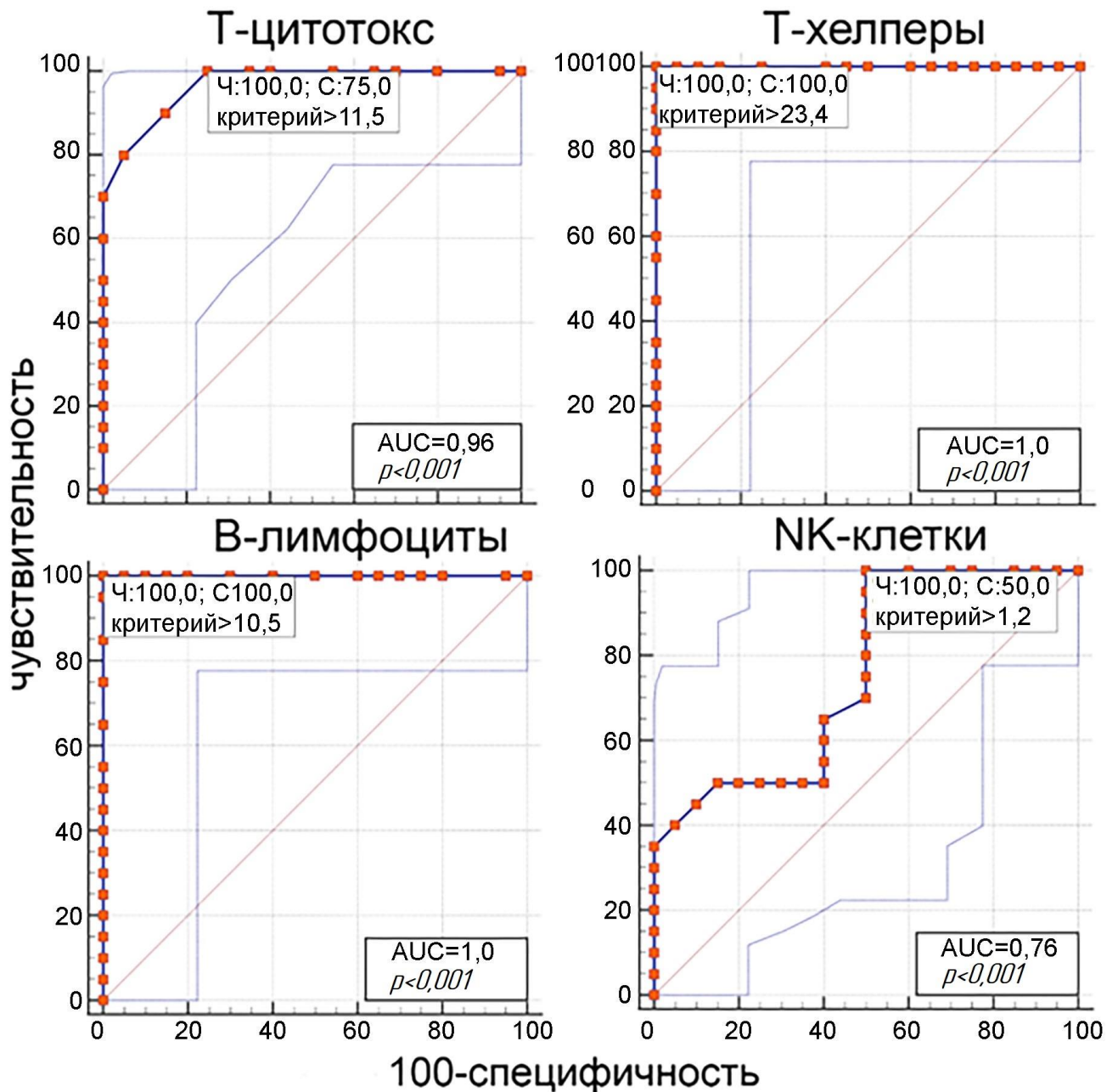


Рис. 4. ROC-кривые основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови крыс после травмы мягких тканей бедра — влияние фактора длительности периода после травмы: по оси X — 100-специфичность (доля ложноположительных результатов в %), по оси Y — чувствительность (%); Т-цитотокс — цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺); AUC — площадь под кривой; Ч — чувствительность; С — специфичность.

Fig. 4. Graphs of ROC-curves the mane types of lymphocytes in peripheral blood after hip injury: results of sensitivity and specificity determination, AUC (the area under the curve) and criteria for clipping (with injury, without injury) variables. The factor -long time after of injury. Sensitivity – the proportion of positive, 100-specificity – the proportion of false positive results (%).

Результаты проведённого нами ROC-анализа свидетельствуют о том, что относительное содержание лимфоцитов в периферической крови можно рассматривать как маркер механической травмы мягких тканей бедра. Однако наличие ROC-кривых с высокими AUC, процентом чувствительности и специфичности, а также низким уровнем p не всегда гарантирует построение классификационной модели.

По данным логистической регрессии, в контрольной точке через 3-е суток после травмы не удалось построить модель, описывающую связь переменной «относительное содержание В- и Т-лимфоцитов» с фактором наличия травмы (да/нет). Для НК-клеток модель корректно классифицировала распределение случаев между контролем и травмой в 68,3% (95% доверительный интервал (ДИ) AUC = 0,68–0,93%; 95% ДИ отношения шансов (ОШ) = 0,16–0,65; $\chi^2 = 20,6$, $p < 0,0001$).

В контрольной точке через 14 суток после травмы не удалось построить модель, описывающую связь между переменной «относительное содержание В-лимфоцитов» и фактором наличия травмы (да/нет). Однако подобную модель возможно построить для общего количества CD4⁺ и CD8⁺ клеток, а также для НК-клеток. При использовании маркеров CD4⁺ и CD8⁺ количество случаев корректной классификации между контролем и травмой составило 95,0% (95% ДИ AUC = 0,82–0,99%; 95% ДИ ОШ = 0,05–0,42; $\chi^2 = 30,2$, $p < 0,0001$). Для НК-клеток связь была менее очевидной; количество случаев корректной классификации составило всего 50,0% (95% ДИ AUC = 0,59–0,87%; 95% ДИ ОШ = 0,31–0,87; $\chi^2 = 7,3$, $p = 0,007$). Стоит отметить, что сформировать более сложные модели из двух переменных не удалось.

Классифицировать животных по времени, прошедшему после травмы, оказалось возможным только по содержанию НК-клеток: количество случаев корректной классификации между 3 и 14 сутками после травмы составило всего 56,1% (95% ДИ AUC = 0,58–0,87%; 95% ДИ ОШ = 1,07–2,61; $\chi^2 = 5,6$, $p = 0,018$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённое исследование выявило комплексные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови крыс после тяжёлой механической травмы бедра, отражающие динамику посттравматического иммунного ответа. Новые данные согласуются с современными представлениями о динамике посттравматического иммунного ответа [18] и представляют значительный интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения.

Анализ распределения субпопуляций лимфоцитов показал выраженную временную динамику. Наиболее ранние изменения наблюдались в популяции CD4⁺ клеток, где уже через 3-е суток после травмы отмечено статистически значимое отклонение от нормального распределения ($p = 0,02$). Этот факт согласуется с представлениями о ключевой роли CD4⁺ клеток в инициации иммунного ответа при травматическом повреждении [19]. Через 14 суток после травмы нарушения нормального распределения зарегистрированы для всех основных лимфоцитарных субпопуляций, включая CD8⁺ клетки, В-лимфоциты и НК-клетки, что свидетельствует о развитии системного иммунного ответа [20].

Особого внимания заслуживают НК-клетки, которые в контрольной группе демонстрировали распределение, отличающееся от нормального ($p = 0,02$), что может объясняться их важной ролью как эффекторов врождённого иммунитета и высокой чувствительностью к различным стрессовым воздействиям [21]. По нашим данным, к 14-м суткам после травмы изменения в распределении НК-клеток стали ещё более выраженными ($p = 0,001$), что, вероятно, отражает их участие в регуляции поздних фаз воспалительного ответа и в процессах тканевой репарации [22, 23].

Результаты проведённого ROC-анализа подтвердили высокую диагностическую ценность оценки лимфоцитарного профиля для выявления последствий травматического воздействия, что не противоречит современным подходам к подобного рода исследованиям [24, 25]. Особенно впечатляющими оказались показатели Т-лимфоцитов в остром периоде после травмы, что делает их перспективными кандидатами для разработки новых диагностических подходов. Следует отметить, что диагностическая значимость различных субпопуляций лимфоцитов изменяется в зависимости от временного интервала после травмы, что, согласно литературным данным, необходимо учитывать при разработке потенциальных диагностических алгоритмов [26].

Использованный метод логистической регрессии выявил ряд важных закономерностей. Построение адекватных классификационных моделей возможно для НК-клеток в остром периоде и для Т-лимфоцитов в отдалённом периоде после травмы. Однако попытки создания комплексных моделей, учитывающих несколько типов лимфоцитов одновременно, не увенчались успехом, что, вероятно, связано с наличием сложных взаимодействий между иммунными клетками [27, 28], нелинейным характером их динамики после травмы и небольшим размером выборки.

Полученные результаты имеют как теоретическое, так и практическое значение. С фундаментальной точки зрения они углубляют понимание многообразия механизмов, лежащих в основе иммунного ответа на механическую травму, демонстрируя сложную временную динамику

различных субпопуляций лимфоцитов. В практическом аспекте выявленные закономерности открывают перспективы для разработки новых подходов к диагностике тяжести травматического повреждения и мониторингу эффективности проводимой терапии.

Перспективными направлениями дальнейших исследований могли бы стать: изучение корреляции между изменениями лимфоцитарного профиля и динамикой клинических показателей; анализ взаимосвязи с изменениями цитокинового профиля; исследование эффективности различных методов иммунокоррекции.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ограничениями настоящего исследования следует считать относительно небольшой размер выборки (18 животных), а также использование только одной модели травматического повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование демонстрирует, что тяжёлая механическая травма мягких тканей вызывает значительные изменения в распределении и относительном содержании основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, имеющие чёткую временную динамику. Наибольшей диагностической ценностью в остром периоде обладают Т-лимфоциты, тогда как в отдалённом периоде наиболее информативными являются В-лимфоциты и НК-клетки. Полученные данные создают основу для разработки новых иммунологических критериев для оценки тяжести травматического повреждения и могут быть использованы для оптимизации сроков терапевтических вмешательств. Оригинальные данные о временной динамике распределения субпопуляций лимфоцитов позволяют обсуждать новые диагностические возможности ROC-анализа и перспективы создания классификационных моделей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. А.Х. Ланичева — проведение исследования, анализ данных, написание черновика рукописи; В.В. Семченко — пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Все манипуляции с экспериментальными животными при моделировании механической травмы мягких тканей бедра выполнены под эфирным наркозом, в соответствии с приказом МЗ России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Башкирский Государственный Медицинский Университет» МЗ РФ (протокол № 3 от 18.03.2021).

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При проведении исследования и создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, представлены в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, члены редакционной коллегии и научные редакторы издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: A. K.H. Lanicheva — literature review, collection and analysis of literary sources, writing the text and statistic analysis; V.V. Semchenko — editing the article. All authors confirm that their

authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

Ethics approval:

Funding sources: This study was not supported by any external sources of funding.

Disclosure of interests: The authors declare that they have no competing interests.

Statement of originality:

Data availability statement:

Generative AI use statement:

Provenance and peer-review:

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Suhoparova EP, Zinoviev EV, Khrustaleva IE, Kniaazeva ES. Prediction of the complicated wound process in overweight patients depending on the composition of the intestinal microbiota. *Journal of Experimental and Clinical Surgery*. 2023;16(1(58)):10–17. doi:10.18499/2070-478X-2023-16-1-10-17 EDN: [AFGZGJ](#)
2. Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet*. 2014;384(9952):1455–1465. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60687-5
3. Anderson EN, Gochenaur L, Singh A, et al. Traumatic injury induces stress granule formation and enhances motor dysfunctions in ALS/FTD models. *Hum Mol Genet*. 2018;27(8):1366–1381. doi: 10.1093/hmg/ddy047
4. Hotchkiss RS, Colston E, Yende S, et al. Immune checkpoint inhibition in sepsis: a phase 1b randomized, placebo-controlled, single ascending dose study of Antiprogrammed Cell Death-Ligand 1 antibody (BMS-936559). *Crit Care Med*. 2019;47(5):632–642. doi: 10.1097/CCM.0000000000003685
5. Huber-Lang MS, Ignatius A, Köhl J, et al. Complement in trauma-Traumatised complement? *Br J Pharmacol*. 2021;178(14):2863–2879. doi: 10.1111/bph.15245 EDN: [GXAKPC](#)
6. Cheadle WG, Pemberton RM, Robinson D, et al. Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis. *J Trauma*. 1993;35(6):844–849. doi: 10.1097/00005373-199312000-00007
7. Saxena A, Dagur PK, Biancotto A. Multiparametric flow cytometry analysis of naïve, memory, and effector T cells. *Methods Mol Biol*. 2019;2032:129–140. doi: 10.1007/978-1-4939-9650-6_8
8. Binkowska AM, Michalak G, Słotwiński R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(2):206–216. doi: 10.5114/ceji.2015.52835
9. Portale F, Di Mitri D. NK cells in cancer: mechanisms of dysfunction and therapeutic potential. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11):9521. doi: 10.3390/ijms24119521 EDN: [BGVQPC](#)
10. Deng Z, Zhang M, Zhu T, et al. Dynamic changes in peripheral blood lymphocyte subsets in adult patients with COVID-19. *Int J Infect Dis*. 2020;98:353–358. doi: 10.1016/j.ijid.2020.07.003 EDN: [GLXTBV](#)
11. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(3):321–327. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283528c9b
12. Burbach L, Brémault-Phillips S, Nijdam MJ, et al. Treatment of posttraumatic stress disorder: a state-of-the-art review. *Curr Neuropharmacol*. 2024;22(4):557–635. doi: 10.2174/1570159X21666230428091433 EDN: [TUSMMA](#)
13. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. *Crit Care*. 2019;23(1):98. doi: 10.1186/s13054-019-2347-3 EDN: [OEXUUU](#)
14. 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 Russ.)
15. Sanchez AM, Yang Y. The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunol Res*. 2011;49(1–3):124–134. doi: 10.1007/s12026-010-8176-8 EDN: [TPORPW](#)
16. Grigoryev SG, Lobzin YuV, Skripchenko NV. The role and place of logistic regression and ROC analysis in solving medical diagnostic task. *Journal Infectology*. 2016;8(4):36–45. doi: 10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45 EDN: [XFWBJT](#)
17. Hanczar B, Hua J, Sima C, et al. Small-sample precision of ROC-related estimates. *Bioinformatics*. 2010;26(6):822–830. doi: 10.1093/bioinformatics/btq037 EDN: [NZZTSEP](#)
18. Zhao J, Zhang S, Liu Y, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the heterogeneity of liver-resident immune cells in human. *Cell Discov*. 2020;6:22. doi: 10.1038/s41421-020-0157-z EDN: [MNEHEQ](#)
19. Maheshwari S, Dwyer LJ, Sirbulescu RF. Inflammation and immunomodulation in central nervous system injury - B cells as a novel therapeutic opportunity. *Neurobiol Dis*. 2023;180:106077. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106077 EDN: [QVETBJ](#)
20. Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B. Immunophenotypic analysis of peripheral blood lymphocytes. *Curr Protoc Cytom*. 2001;Chapter 6. doi: 10.1002/0471142956.cy0605s11
21. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, et al. Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry. *Cytometry A*. 2019;95(6):647–654. doi: 10.1002/cyto.a.23724
22. Wendel P, Reindl LM, Bexte T, et al. Arming immune cells for battle: a brief journey through the advancements of T and

- NK cell immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1481. doi: 10.3390/cancers13061481 EDN: [HZKCAQ](#)
23. Herman P, Stein A, Gibbs K, et al. Persons with chronic spinal cord injury have decreased natural killer cell and increased Toll-like receptor/inflammatory gene expression. *J Neurotrauma*. 2018;35(15):1819–1829. doi: [10.1089/neu.2017.5519](#)
24. Maestre L, García-García JF, Jiménez S, et al. High-mobility group box (TOX) antibody a useful tool for the identification of B and T cell subpopulations. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229743. doi: 10.1371/journal.pone.0229743 EDN: [GUCRSR](#)
25. Telegin GB, Chernov AS, Konovalov NA, et al. Cytokine profile as a marker cellu damage and immune disfunction after spinal cord injuriy. *Acta Naturae*. 2020;12(3(46)):92–101. doi: [10.32607/actanaturae.11096](#) EDN: [MXUULW](#)
26. Oelsner S, Wagner J, Friede ME, et al. Chimeric antigen receptor-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and enhance survival. *Int J Cancer*. 2016;139(8):1799–1809. doi: 10.1002/ijc.30217 EDN: [WSAXTR](#)
27. Rodríguez-Perea AL, Arcia ED, Rueda CM, Velilla PA. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin Exp Immunol*. 2016;185(3):281–291. doi: 10.1111/cei.12804
28. Boiko AA, Malanchuk VA, Myroshnychenko MS, et al. Expression features of T-lymphocytes, B-lymphocytes and macrophages in the post-traumatic regenerate of the mandible rats under conditions of filling a bone defect with hydroxyapatite-containing osteotropic material and thymalin injecting the surrounding soft tissues. *Pol Merkur Lekarski*. 2024;52(2):171–177. doi: 10.36740/Merkur202402105 EDN: [WBAHNJ](#)

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

AUTHORS' INFO

| | |
|--|---|
| *Автор, ответственный за переписку: | |
| * Ланичева Альбина Хамитовна , канд. мед. наук, доцент; адрес: Россия, 435008, Уфа, ул. Ленина, д. 3; ORCID: 0009-0004-0550-2760 ; eLibrary SPIN: 9390-2689; e-mail: lanichevaa@mail.ru | * Albina Kh. Lanicheva , MD, Cand. Sci. (Medicine), Assistant Professor; address: 3 Lenina st, Ufa, Russia, 435008; ORCID: 0009-0004-0550-2760; eLibrary SPIN: 9390-2689; e-mail: lanichevaa@mail.ru |
| Соавтор: | |
| Семченко Валерий Васильевич , д-р мед. наук, профессор; ORCID: 0009-0006-8933-9618; eLibrary SPIN: 8269-3077; e-mail: ivm_omgau_gistology@mail.ru | Valery V. Semchenko , MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor; ORCID: 0009-0006-8933-9618; eLibrary SPIN: 8269-3077; e-mail: ivm_omgau_gistology@mail.ru |