

УДК 577.3.57.084:599.3.616.5

НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КОЖИ КРЫС ПРИ НОРМОТЕРМИИ И ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Мяделец О. Д.¹, Мяделец Н. Я.²

¹ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь;

² Учреждение образования «Витебский государственный медицинский колледж имени академика И. П. Антонова», г. Витебск, Республика Беларусь

Реферат. В статье излагаются сведения по изучению нейтрофильных лейкоцитов и нейтрофильных внеклеточных ловушек кожи крыс при нормотермии и общей глубокой пролонгированной гипотермии (18–20 °С в прямой кишке) с последующей пролонгацией охлажденного состояния в течение 6 ч. Нетоз выявляли путем окрашивания полнослойных срезов кожи на щелочную фосфатазу по методу М. Берстона. В норме в коже наблюдался градиент увеличения количества нейтрофилов и нейтрофилов, подвергшихся дегрануляции и нетозу, от сосочкового слоя к гиподерме. На глубине охлаждения после согревания и в течение 6 ч после него изученные показатели достоверно не отличались от контрольных значений. Далее отмечалось существенное увеличение по сравнению с контролем общего количества нейтрофилов в состоянии нетоза на протяжении 10 суток постгипотермического периода, а затем показатели постепенно снижались до уровня контроля.

Ключевые слова: крысы, кожа, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нормотермия, пролонгированная гипотермия.

Введение. Нейтрофилы — наиболее распространенный вид лейкоцитов. Они являются важной составляющей врожденного иммунитета и представляют собой первую линию защиты организма от инфицирования бактериями, грибами и простейшими. Каждые сутки в организме человека образуется около 10^{11} новых нейтрофилов. Число сегментоядерных нейтрофилов в крови составляет от 47 до 67 %. Однако это лишь 1–2 % зрелых нейтрофилов от всех образующихся нейтрофилов костного мозга. Все остальные эти клетки локализованы в тканях (тканевые нейтрофилы). Они являются важной составляющей частью врожденного иммунитета и представляют собой одну из первых линий защиты организма от инфицирования бактериями, грибами и простейшими. В коже тканевые нейтрофильные гранулоциты обнаруживаются в большом количестве, особенно в рыхлой соединительной ткани гиподермы. При активации этих клеток происходит так называемый респираторный взрыв, т. е. усиленное образование активных форм кислорода — гипероксида анио-

на, синглетного кислорода и др. Они повреждают клеточные стенки микроорганизмов и вызывают их осмотическую гибель. Фагоцитоз, респираторный взрыв и секреция антимикробных белков из гранул — не единственные функции нейтрофилов. В 2004 г. ученым V. Brinkmann и соавт. был открыт еще один механизм борьбы с микробной инвазией: формирование *нейтрофильных внеклеточных ловушек*, *neutrophil extracellular traps* (общепринятая аббревиатура соответственно НВЛ и NETs) [1]. Нейтрофильные внеклеточные ловушки позволяют нейтрофилам уничтожать экстрацеллюлярные патогены при минимальном повреждении клеток хозяина, что препятствует развитию гнойных инфекций. Вместе с тем другие факторы (например, факторы респираторного взрыва нейтрофильных лейкоцитов) обладают цитотоксичностью по отношению не только к микроорганизмам, но и в отношении клеток. При этом не только чужеродных, например, раковых или клеток чужеродных трансплантатов, но и собственных клеток организма при гнойном воспалении и при других патологиче-

ских состояниях. Учение о нетозе имеет большое значение для различных медицинских дисциплин и, несомненно, для дерматологии. Кожа как самый периферический орган организма подвержен воздействию разнообразнейших неблагоприятных факторов внешней среды [2]. В связи с этим в ней находится большое количество нейтрофилов. Эти клетки участвуют в поддержании тканевого гомеостаза в коже в условиях нормы. Вместе с тем нейтрофилы задействованы во всех патологических процессах, возникающих в ней [2]. Большое значение процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек имеет для заживления кожных ран, поскольку позволяет быстро уничтожать тканевой дебрис [3, 4]. М. Sabbatini с соавт. дает следующую характеристику нетоза и нейтрофильных внеклеточных ловушек: «...Нейтрофильные внеклеточные ловушки... представляют собой ячеистую сеть ДНК, гистоновых белков, а также микробицидных агентов, которая распространяется за пределы клетки в результате серии событий, затрагивающих ядро и цитоплазму. ...Нетоз, первоначально считавшийся защитным апоптотическим механизмом, теперь рассматривается как способ защиты в экстремальных ситуациях, который в отдельных случаях оказывает сильные неблагоприятные эффекты на физиологию тканей, усугубляя патологию...» [4]. Вместе с тем И. И. Долгушин и соавт. [3] считают, что нейтрофилы играют важную иммунорегуляторную роль как в условиях гомеостаза, являясь факторами врожденного иммунитета, так и при различных видах патологии. Авторы подчеркивают амбивалентную, т. е. двойную роль в тканях тканевых и циркулирующих нейтрофилов. Различают суицидальный и витальный нетоз. При суицидальном нетозе происходит гибель нейтрофила, в то время как при витальном нетозе нейтрофилы сохраняют способность повторно разрушать бактерии. Как долго могут существовать такие безъядерные нейтрофилы, пока в научной литературе сведения отсутствуют. Активация нетоза при его суицидальной форме может быть вызвана различными индукторами: микроорганизмами, бактериальными компонентами, активированными тромбоцитами, компонентами комплемента, аутоантителами, IL-8, перекисью водорода, кристаллами урата, сигаретным дымом и другими вредными факторами внешней и внутренней среды [3–5]. В результате действия этих факторов происходит активация внутриклеточной НАДФН-оксидазы. Она начинает вырабатывать актив-

ные формы кислорода, что вызывает в свою очередь деконденсацию хроматина, разрушение кариолеммы и проникновение в ядро нейтрофила ферментов азурофильных гранул. Это ведет к выходу ДНК и гистонов в цитоплазму нейтрофила. В результате внутриклеточного разрушения мембран гранул нейтрофилов и митохондрий их содержимое оседает на хроматине, и в результате формируются внутриклеточные нити хроматина, содержащие ферменты и бактерицидные вещества (нейтрофильная эластаза, миелопероксидаза, катепсин G, лактоферрин, желатиназа, лизоцим C, кальпротектин и другие, всего 24 белка). Эти бактерицидные вещества, ДНК и гистоны в комплексе Гольджи упаковываются в секреторные гранулы. Наряду с этим продолжается уменьшение конденсации хроматина. Ядро набухает и теряет свою специфическую конфигурацию в виде сегментов, округляясь (делобуляция ядра). Кариолема распадается на везикулы. Выделившиеся из нейтрофила отрицательно заряженные деконденсированные фибриллы хроматина служат скелетом для ловушки. Они распространяются и уплотняются с образованием внеклеточных нитей, сливающихся в сеть, или «ловушки» [1]. В последующем после формирования сети остатки плазмолеммы нейтрофила подвергается разрушению макрофагами и факторами внешней среды, в том числе и факторами, вызвавшими травматическое повреждение ткани. В дерматологии существует большая группа заболеваний, которая называется «нейтрофильные дерматозы» [2]. При них нейтрофилы становятся одними из главных клеток патогенеза. Работ, посвященных распределению нейтрофилов в соединительной ткани кожи в норме, мало [6]. При неблагоприятных воздействиях внешней среды в кожном покрове возникают повреждения и раневые процессы, сопровождающиеся воспалением. При них нейтрофилы опять-таки становятся одними из главных клеток. Поэтому изучение нетоза при указанных нозологиях является весьма актуальным. Одним из постоянных неблагоприятных факторов внешней среды, с которым постоянно сталкивается человек, является холод. Вместе с тем он используется в медицине как физиотерапевтический фактор, например, в виде местной гипотермии для уменьшения воспалительных процессов в тканях и снижения их гиперемии. Общее же охлаждение организма используется в хирургии, в частности в кардиохирургии и трансплантологии. Однако морфологические исследования суицидального

нетоза нейтрофильных лейкоцитов кожи в норме и при общей глубокой пролонгированной гипотермии на современном уровне изучены недостаточно.

Цель работы — изучение суицидального нетоза нейтрофилов кожи в условиях нормы и при воздействии на организм крыс общей глубокой пролонгированной гипотермии.

Материалы и методы. В работе использованы архивные материалы сотрудников кафедры УО «ВГМУ»: протоколы экспериментов, обзорные гистопрепараты и микрофотографии с них и гистоэнзимологических препаратов [6], изготовленные для научных целей. В то время когда выполнялись эксперименты (80–90-е гг. прошлого столетия), представления о нетозе отсутствовали. Указанные материалы сохранились и послужили в качестве объектов данного исследования. Эксперименты были выполнены на 120 белых беспородных крысах. Для моделирования общей глубокой пролонгированной гипотермии была использована оригинальная методика [7]. Животных после наркотизации эфиром на полиэтиленовой пленке помещали в ванночку на смесь воды и льда. Скорость охлаждения составляла $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 5 мин. После достижения ректальной температуры тела животных $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ состояние гипотермии пролонгировали в течение 6 ч. Поскольку при такой температуре тела у большинства животных прекращалось собственное дыхание, использовали искусственное дыхание с помощью специального портативного дыхательного аппарата. По истечении времени пролонгации животных согревали с помощью лампы-рефлектора со скоростью аналогичной скорости охлаждения. Весь эксперимент от начала охлаждения до конца согревания занял около 10 ч. Животных декапитировали под эфирным наркозом на глубине охлаждения, сразу после его завершения, после завершения согревания и при возвращении двигательной активности, спустя 6 ч, 1 суток, а также через 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 суток эксперимента. Кожу межлопаточной области получали с помощью пробойника диаметром 1 см. Парафиновые срезы окрашивали традиционным методом (гематоксилином и эозином) для обзорных целей. Замороженные в жидком азоте срезы толщиной 10 микрометров фиксировали 10 мин в ацетоне и выявляли в них щелочную фосфатазу по методу М. Берстона. Как указывают С. Н. Плескова и соавт. [5], этот метод позволяет успешно идентифицировать как неизмененные, так и подвергнутые нетозу нейтрофилы и позволяет описать кри-

терии нетоза. В качестве контроля служили интактные животные, материал от которых для объективности сравнения получали в одно и то же время с получением его от опытных животных каждого срока наблюдения в связи с большой продолжительностью эксперимента. Подсчет общего количества нейтрофилов и нейтрофилов в состоянии нетоза осуществляли с использованием программы обработки изображений ImageJ. Для морфометрической оценки в каждом препарате анализировали 30 непересекающихся полей зрения при увеличении 1000. Производили подсчет количества клеток с перерасчетом на 1 мм^2 площади микрофотографии. Производили 20 измерений по каждой микрофотографии. Полученные цифровые данные подвергали статистической обработке с использованием методов непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft inc., STA999K347156-W). Проверку статистических гипотез равенства средних генеральной совокупности проводили с помощью критерия U (Манна — Уитни) при принятом уровне значимости $\alpha = 0,05$. Результаты представлены в тексте (только достоверные) в виде средней (M) и доверительного интервала.

Результаты и их обсуждение. При исследовании кожи интактных животных установлено, что в сосочковом слое дермы обнаруживались единичные нейтрофильные лейкоциты, расположенные в основном вблизи сосочковых капилляров (рисунок 1, а). Их число составляло $6,00\text{ клеток/мм}^2$ ($4,76\text{--}7,24$). Некоторые клетки находились в состоянии умеренного нетоза. Количество таких клеток было минимальным и составляло $1,04\text{ клеток/мм}^2$ ($0,24\text{--}1,84$). В отдельных участках эпидермиса в базальном слое обнаруживались группы кератиноцитов с низкой активностью щелочной фосфатазы. Активность фермента в неизмененных нейтрофилах была максимальной. В сетчатом слое дермы по сравнению с сосочковым слоем количество нейтрофилов было значительно и достоверно увеличено — $24,00\text{ клеток/мм}^2$ ($22,24\text{--}25,76$). Часть из них находилась вблизи гемокapилляров и формировала агрегаты, в которых значительная доля клеток была в состоянии нетоза. Количество нейтрофилов в состоянии нетоза составляло $4,40\text{ клеток/мм}^2$ ($2,98\text{--}5,82$), что было достоверно выше аналогичного показателя в сосочковом слое дермы. Помимо периваскулярных, обнаруживалось умеренное количество удаленных от микроциркуляторного русла клеток. Среди них также встречались клетки в состоянии нетоза (рисунок 1, б).

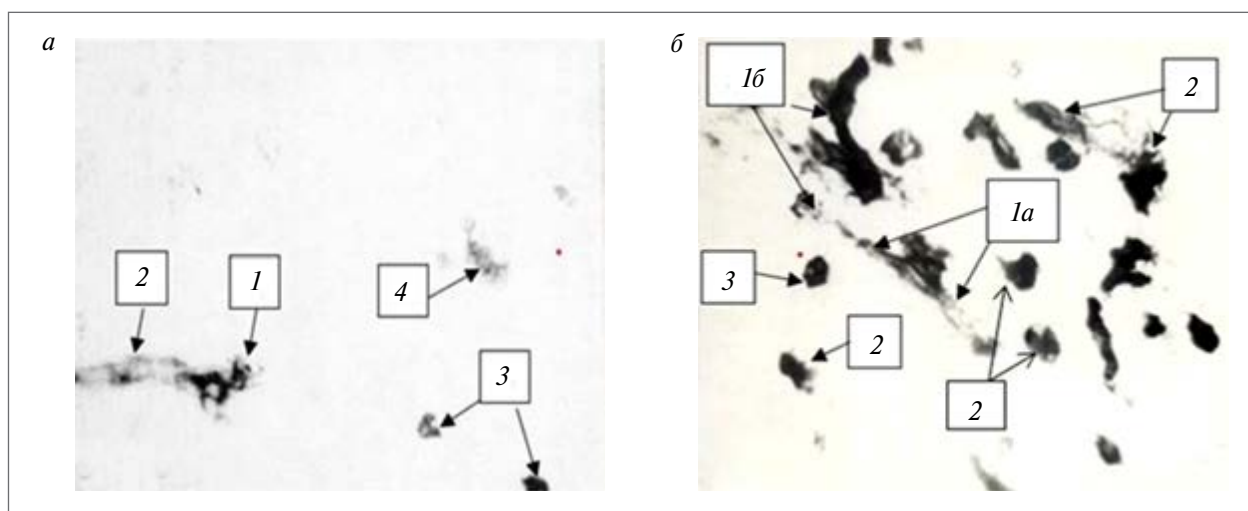


Рисунок 1– Нейтрофильные лейкоциты сосочкового и сетчатого слоя дермы intactных животных:

а – сосочковый слой (*1* – нейтрофил в состоянии нетоза; *2* – гемокапилляр; *3* – intactные нейтрофилы; *4* – участок базального слоя эпидермиса с фосфатазопозитивными кератиноцитами); *б* – сетчатый слой увеличение содержания нейтрофилов, часть из которых находится в состоянии нетоза (*1* – микрососуды: *1а* – гемокапилляр, *1б* – венула с максимальной активностью щелочной фосфатазы; *2* – нейтрофилы в состоянии нетоза: два нейтрофила образуют контакты, слева и вверху нити нейтрофильных внеклеточных ловушек; *3* – intactные нейтрофилы (Щелочная фосфатаза по М. Берстону (1965), $\times 600$.)

В гиподерме количество фосфатазопозитивных нейтрофилов существенно и достоверно увеличивалось по сравнению с этим показателем в сосочковом и сетчатом слоях дермы. Общая численность нейтрофилов на единицу площади составляла 58,80 клеток/мм² (53,73–63,87). Большинство клеток находились в состоянии дегрануляции и нетоза, при этом часть их формировала конгломераты. В этих конгломератах находились многочисленные нейтрофильные внеклеточные ловушки (рисунок 2).

Они представляли собой тонкие переплетающиеся нити, окрашивающиеся тетразолием в темносиний цвет. Эти нити выявлялись вблизи конгломератов нейтрофилов, вокруг разрозненных нейтрофилов в виде групп и лежащих отдельно нейтрофилов. Нити сливались и формировали сеть. Количество нейтрофилов в состоянии нетоза составляло 22,60 клеток/мм² (19,36–25,84). Таким образом, в коже intactных крыс существует градиент распределения нейтрофильных лейкоцитов. Значительная

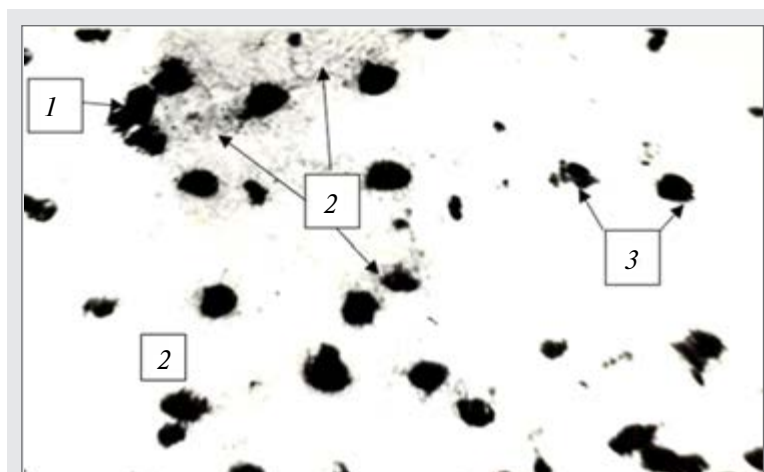


Рисунок 2 – Значительное увеличение фосфатазопозитивных нейтрофильных лейкоцитов в гиподерме при нормотермии: *1* – нейтрофилы в состоянии нетоза, формирующие конгломераты; правее от них располагаются одиночные нейтрофилы в состоянии нетоза; *2* – нейтрофильные внеклеточные «ловушки»; *3* – нейтрофилы в состоянии дегрануляции (Щелочная фосфатаза по М. Берстону (1965), $\times 1000$.)

часть нейтрофилов располагается периваскулярно, причем такие клетки часто находятся в состоянии нетоза. Наибольшее их количество

и активность обнаружены в гиподерме. При воздействии на организм животных общей глубокой гипотермии наблюдались как количественные, так и качественные изменения в популяции нейтрофилов кожи. На глубине охлаждения и в течение 6 ч после завершения согревания эти изменения были незначительными и достоверно не отличались от таковых при нормотермии. Однако уже через 1 и 3 суток после эксперимента происходило значительное увеличение количества нейтрофилов во всех слоях кожи, причем распространение их по слоям кожи было похоже на таковое при нормотермическом состоянии животных, т. е. градиентным, с минимумом в сосочковом слое дермы и максимумом в гиподерме, но на достоверно более высоком уровне. На глубине охлаждения сразу после согревания и через 6 ч после него изменения затрагивали в основном

эпидермис и сосудистое русло. Так, в эпидермисе, в котором в условиях нормотермии в кератиноцитах активность щелочной фосфатазы отсутствовала или выявлялись ее следы, через 1 сутки после согревания обнаруживалась достаточно высокая активность фермента. В стенках кровеносных микрососудов она была максимальной. Содержание нейтрофильных лейкоцитов в сосочковом слое практически не отличалось от такового в интактном контроле. В сетчатом слое дермы и гиподерме достоверные изменения также отсутствовали. На 3-и сутки постгипотермического периода наблюдалось выраженное достоверное увеличение количества нейтрофилов: в сосочковом слое 15,7 клеток/мм² (9,3–22,1), сетчатом слое дермы — 31,40 клеток/мм² (25,70–37,10), и в гиподерме — 71,81 клеток/мм² (65,92–77,69) (рисунок 3).

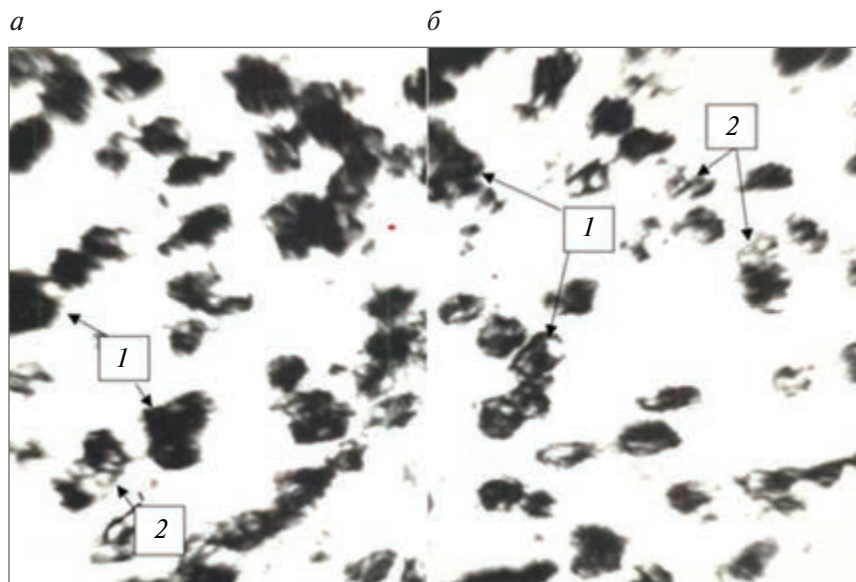


Рисунок 3 — Увеличение содержания нейтрофильных лейкоцитов в гиподерме кожи крыс на 3-и (а) и 7-е сутки (б) постгипотермического периода:

1 — нейтрофилы в состоянии нетоза, формирующие конгломераты; 2 — нейтрофильные внеклеточные ловушки (Щелочная фосфатаза по М. Берстону (1965), ×1000.)

При этом возрастало и содержание нейтрофилов в состоянии нетоза. Многие нейтрофилы формировали агрегаты, в которых выявлялись нейтрофильные внеклеточные ловушки в виде сети. При этом погибающие нейтрофилы подвергались резкой деформации. Они формировали отростки, с помощью которых соседние нейтрофилы сливались друг с другом. В них наблюдались неокрашенные полости и просветления, формировались «тени» нейтрофилов. Похожее изменения наблюдались через 10 суток после охлаждения. Отличия от контрольных величин были достоверны. В

последующие сроки наблюдения (15–30-е сутки постгипотермического периода) происходило постепенное снижение количества нейтрофильных лейкоцитов и их физиологической активности до контрольных величин. Так, на 20-е сутки общее количество нейтрофилов в сосочковом слое составляло 7,75 клеток/мм² (4,53–10,97). Количество нейтрофилов в состоянии нетоза составляло 1,76 клеток/мм² (1,57–1,95). Возрастало количество неизмененных нейтрофилов. Следует также отметить, что на 3–10-е сутки постгипотермического периода в эпидермисе наблюдались значительные

участки, в которых в базальных и в нижних рядах шиповатых кератиноцитов регистрировалась достаточно высокая активность щелочной фосфатазы (рисунок 4). Как известно, этот фермент активируется в клетках, которые активно синтезируют ДНК и делятся митозом. К 30 суткам постгипотермического периода показатели достоверно от контрольных величин не отличались.

Таким образом, во всех соединительно-тканых слоях кожи находятся нейтрофильные лейкоциты, количество и функциональная активность которых в условиях нормы и при гипотермическом воздействии нарастают в направлении от сосочкового слоя к гиподерме. Это увеличение можно объяснить тем, что аналогичным образом в коже распределены кровеносные микрососуды, которые обеспечивают транслокацию нейтрофилов из крови в рыхлую соединительную ткань кожи. Объем микрососудов и рыхлой соединительной ткани в гиподерме максимальный. В ней нейтрофилы участвуют в обеспечении тканевого гомеостаза и гомеокинеза [2–5,7]. Несмотря на то что многие научные работы посвящены роли нетоза в патологических процессах, необходимо согласиться с утверждением авторов, которые рассматривают нетоз как физиологический процесс, прежде всего обеспечивающий участие его в формировании важнейшей функции внешнего покрова — барьерно-защитной [3–5]. Так, указывается, что при своей амбипотентности нейтрофилы могут проявлять как хелперное, так и супрессорное действие на клетки врожденного и адаптивного иммунитета. Поэтому подчеркивается их большая роль как в условиях гомеостаза, так и при различных видах патологии [3–5,7]. Нарастающий к глубоким слоям характер расположения нейтрофилов в коже, очевидно, следует рассматривать как «реализацию экономического использования механизмов ее барьерно-защитной функции». Так, с одной стороны, эпидермис обладает собственными мощными защитными свойствами, и в условиях нормы в расположенном под ним сосочковом слое дермы не требуется большое количество нейтрофилов. С другой стороны, наличие там хоть и небольшого количества этих клеток все же необходимо для участия в определенной степени в реализации тканевого гомеостаза, механизмы которого чрезвычайно разнообразны. Поэтому можно считать, что соединительная ткань гиподермы в связи с большим количеством в ней рыхлой соединительной ткани и микрососудов, через стенки которых в соединительную ткань из крови осуществляется пассаж нейтрофилов,

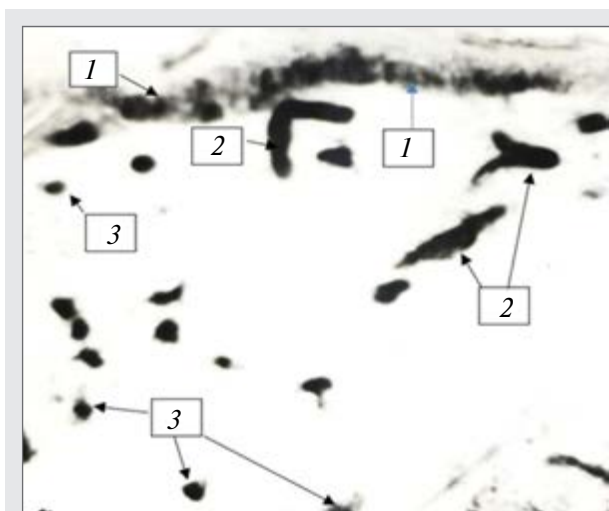


Рисунок 4 — кожа белых крыс на 10-е сутки постгипотермического периода. Существенное уменьшение количества нейтрофилов и их функциональной активности. Выявление в базальных и шиповатых кератиноцитах эпидермиса максимальной активности щелочной фосфатазы: 1 — высокая активность щелочной фосфатазы в кератиноцитах базального и шиповатого слоев эпидермиса; 2 — кровеносные сосуды с максимальной активностью щелочной фосфатазы; 3 — нейтрофилы со слабо выраженным нетозом (метод М. Берстона, ×600)

является своеобразным коллектором для этих клеток, которые, не исключено, в силу своей подвижности затем постоянно мигрируют в более высокие слои кожи. Нарушение структурного обеспечения этой функции в таком случае может лежать в основе не только дерматологических, но и многих общесоматических заболеваний. Таким образом, тканевой гомеостаз в коже обеспечивается мощной сбалансированной совокупностью клеток и структур эпидермиса, дермы и гиподермы. Общая глубокая пролонгированная гипотермия, не изменяя градиентного принципа локализации нейтрофилов в коже, спустя некоторое время после ее завершения приводила к увеличению количества этих клеток во всех слоях кожи с нарастанием их функциональной активности. Это выразилось в возрастании их количества в состоянии нетоза. Особенно резко такие изменения были выражены с 3 по 10-е сутки постгипотермического периода. Незначительную реакцию нейтрофилов на процесс охлаждения, его пролонгацию и согревание животных можно объяснить тем, что в это время под действи-

ем холодого фактора происходил спазм микрососудов, что, естественно, затрудняло пассаж нейтрофилов в расположенную более поверхностно дерму. В более поздние сроки постгипотермического периода существенное нарастание количества нейтрофилов в коже можно объяснить поражающим стрессорным деструктивным эффектом холодого фактора, который вызывает в коже воспалительный процесс и необходимость адаптивных процессов. В этих процессах, наряду с нейтрофилами и другими клетками, участвуют макрофаги кожи [3, 4]. В собственной работе [6] показано, что при общей глубокой гипотермии наряду с изменениями в коже количества нейтрофилов синхронно происходят изменения этих показателей со стороны 5-нуклеотидазопозитивных макрофагов кожи. Поскольку общая глубокая пролонгированная гипотермия является сильнейшим повреждающим фактором, как и другие травмирующие кожу факторы, в ней происходит гибель значительного количества клеток и внеклеточных структур [6]. Это должно привести к образованию дебриса, возникновению воспалительного процесса активации нейтрофилов, избыточному образованию ими нейтрофильных внеклеточных ловушек и к дополнительному повреждению клеток. Далее возможно формирование замкнутого порочного круга. Как уже отмечалось при цитировании авторов работ [3, 4], хотя нетоз и является физиологическим процессом, отвечающим на внедрение из внешней среды в кожу микроорганизмов и регулирующим воспаление и обычно хорошо завершающимся для организма, для достижения соответствующего сбалансированного состояния он может осуществлять устранение дефектных и «лишних» нейтрофилов и созданных ими внеклеточных ловушек. Эту функцию выполняют и клетки второй линии защиты — макрофаги. Поэтому после 10 суток постгипотермического периода наблюдалось постепенное снижение количества нейтрофилов и их нетозов с

возвращением к уровню интактного контроля. При разбалансировке процесса элиминации нейтрофилов и созданных ими нейтрофильных внеклеточных ловушек могут развиваться хроническое воспаление кожи — дерматозы, нарушаться заживление ран, повреждаться ткани органа и в конечном счете наступать его органная недостаточность [3–5].

Заключение. В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В условиях нормы в соединительной ткани кожи животных происходит увеличение количества нейтрофильных лейкоцитов по направлению от сосочкового слоя дермы к сетчатому слою и далее к гиподерме. В сосочковом слое обнаруживаются немногочисленные нейтрофилы, тогда как в гиподерме их количество максимально.

2. Несмотря на низкое содержание нейтрофилов в сосочковом слое, некоторые из них находятся в состоянии нетоза, что является проявлением функциональной активности этих клеток по обеспечению тканевого гомеостаза.

3. После продолжительного общего глубокого охлаждения крыс во время проведения эксперимента и в первые часы после него выраженные изменения со стороны количества нейтрофилов и количества их нетозов отсутствовали, что может быть связано с вазоконстрикторным эффектом холодого фактора.

4. В более поздние сроки постгипотермического периода наблюдалось сильно выраженное увеличение количества нейтрофилов и их нетозов. Это может быть связано с воспалительными и репаративно-адаптивными процессами в тканях кожи в ответ на экстремальный экзогенный фактор.

5. Изученная характерная динамика формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек в коже позволяет объяснять закаливающее действие холодого фактора на организм гомойотермных животных.

Список цитированных источников

1. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // *Science*. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
2. Адаскевич, В. П. Дерматозы нейтрофильные и эозинофильные / В. П. Адаскевич, О. Д. Мяделец. — М.: Медицинская книга, 2001. — 278 с.
3. Долгушин, И. И. Нейтрофильные гранулоциты: участие в гомеостатических и репаративных процессах. Часть II / И. И. Долгушин, Е. А. Мезенцева // *Инфекция и иммунитет*. — 2021. — Т. 11, № 1. — С. 25–41. DOI: 10.15789/2220-7619-NGP-1258.
4. Sabbatini, M. Netosis in Wound Healing: When Enough is Enough / M. Sabbatini, V. Magnelli, F. Reno // *Cells*. — 2021. — Vol. 3, № 10. — P. 494–508. DOI: 10.3390/Cells10030494.
5. Плескова, С. Н. Морфологические особенности быстрого и классического нетоза / С. Н. Плескова, Е. Н. Горшкова, Ф. В. Боряков // *Цитология*. — 2019. — Т. 61, № 9. — С. 704–712. DOI: 10.1134/S0041377119090098.

6. Мяделец, О. Д. Воздействие общей глубокой гипотермии на морфофункциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов кожного региона / О. Д. Мяделец, А. Ф. Суханов // Проблемы криобиологии. — 1991. — № 2. — С. 23–27.

7. Борисов, В. А. Методика искусственной гипотермии на мелких лабораторных животных / В. А. Борисов, О. Д. Мяделец, В. Н. Бринкевич // Криобиология. — 1989. — № 4. — С. 49–51.

Neutrophilic extracellular traps in the skin of rats normothermia and general deep prolonged hypothermia

Myadelets, O. D., Myadelets, N. Ya.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus;

Vitebsk State Medical College named after Academician I. P. Antonov, Vitebsk, Republic of Belarus

The article presents the study of neutrophilic leukocytes and neutrophil extracellular traps of rat skin during normothermia and general deep prolonged hypothermia (18–20 °C in the rectum), followed by prolongation of the chilled state for 6 hours. Netosis was detected by staining full-thickness sections of skin for alkaline phosphatase according to the method of M. Burstone. Normally observed in the skin gradient of increase in the number of neutrophils and neutrophils exposed netosis, from the papillary layer to the hypodermis. At the cooling depth, after warming and in within 6 hours after it, the studied parameters did not significantly differ from control values. There was a significant increase compared to control of the total number of neutrophils in the state of netosis during 10 days of the posthypothermic period. Subsequently there was a gradual decrease in indicators of the level of control.

Keywords: rats, skin, neutrophils, neutrophil extracellular traps, normothermia, prolonged hypothermia.