

УДК 616-092

## Реактивные сдвиги клеток нейтрофильного ряда костного мозга и периферической крови после локального острого отморожения

Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Шапчиц Н.Л., Мизгирёв Д.В., Феленко Н.С.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
163000, Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

Известно, что нейтрофилы в ходе воспалительного процесса играют роль как в регуляции поведения клеток, участвующих в воспалении, так и в разрушении и удалении факторов, вызвавших воспаление, и поврежденных тканей. Однако сведения об участии нейтрофилов в разрушении внеклеточного матрикса дермы в количественном измерении отсутствуют.

**Цель.** Изучить механизм реактивного сдвига клеток нейтрофильного ряда красного костного мозга и периферической крови при remodelировании внеклеточного матрикса дермы на модели острого отморожения.

**Материалы и методы.** Объектами экспериментальных исследований были выбраны 100 практически здоровых крыс с массой тела 180–200 г в возрасте 4–5 месяцев. Лабораторные животные, у которых моделировали острое отморожение, сформировали 5 групп (4 экспериментальные и 1 контрольная), каждая из которых включала по 20 особей. Всех крыс содержали в специальном помещении, свободном от патогенов, и поддерживали в условиях постоянной температуры (23–25°C), влажности (40–50%) и 12-часового цикла «свет/темнота». Контактное отморожение воспроизводили металлической гирькой, охлажденной до температуры жидкого азота. Все этапы исследования проводились с использованием хлороформного наркоза по закрытому контуру. Вывод животных из эксперимента проводили на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки с последующим гистологическим исследованием поврежденной кожи, периферической крови и красного костного мозга.

**Результаты.** На 3-и сутки после острого локального отморожения в дерме формируется лейкоцитарный вал, состоящий преимущественно из нейтрофилов, на фоне снижения процентного содержания коллагена дермы и толщины его волокон. Процессы деградации внеклеточного матрикса дермы отрицательно коррелируют с повышением содержания в крови нейтрофилов с 3 и 4 сегментами в ядре. Увеличение содержания коллагена дермы и толщины его волокон на 7-е сутки и к концу эксперимента сопровождалось снижением уровня корреляционных связей.

**Заключение.** С учетом полученных данных можно предполагать, что нейтрофилы, особенно содержащие 3 и 4 сегмента в ядре, задействованы лишь в деградации внеклеточного матрикса дермы, но не задействованы в непосредственном синтезе коллагеновых волокон.

**Ключевые слова:** экспериментальное острое отморожение; внеклеточный матрикс дермы; нейтрофилы; костный мозг; периферическая кровь.

**Для цитирования:** Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Шапчиц Н.Л., Мизгирев Д.В., Феленко Н.С. Реактивные сдвиги клеток нейтрофильного ряда костного мозга и периферической крови после локального острого отморожения. *Патогенез*. 2024; 22(4): 22-31.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2024.04.22-31

**Для корреспонденции:** Шутский Никита Алексеевич, e-mail: nikitashutskijj@rambler.ru

**Финансирование.** Исследование профинансировано в рамках государственного задания № 124022800143-5.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 11.07.2024.

## Reactive shifts in neutrophil cells of the bone marrow and peripheral blood after local acute frostbite

Shutskiy N.A., Kashutin S.L., Shapchits N.L., Mizgiriyov D.V., Felenko N.S.

Northern State Medical University  
Troitskiy av. 51, Arkhangelsk 163000, Russian Federation

It is known that neutrophils during the inflammatory process play a role both in regulating the behavior of cells involved in inflammation and in the destruction and removal of factors that cause inflammation and damaged tissue. However, there is no quantitative information on the participation of neutrophils in the destruction of the extracellular matrix of the dermis.

**Aim.** To study the mechanism of reactive shift of neutrophil cells of the red bone marrow and peripheral blood during remodeling of the extracellular matrix of the dermis on a model of acute frostbite.

**Materials and methods.** The 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, formed five groups, each of which included 20 individuals. The comparison group included 20 intact mongrel rats. All rats were kept in a special room free of pathogens and maintained at a constant temperature (23–25°C), humidity (40–50%) and a 12-hour light/dark cycle. Contact frostbite was reproduced with a metal weight cooled to the temperature of liquid nitrogen. All stages of the study were performed using closed-circuit chloroform anesthesia. The animals were removed from the experiment on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days, followed by histological examination of damaged skin, peripheral blood and red bone marrow.

**Results.** On the 3<sup>rd</sup> 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. The processes of degradation of the extracellular matrix of the dermis negatively correlate with an increase in the blood content of neutrophils with segments 3 and 4 in the nucleus. An increase in the collagen content of the dermis and the thickness of its fibers on the 7<sup>th</sup> day and by the end of the experiment was accompanied by a decrease in the level of correlations.

**Conclusion.** Based on the data obtained, it can be assumed that neutrophils, especially those containing segments 3 and 4 in the nucleus, are involved only in the degradation of the extracellular matrix of the dermis, but are not involved in the direct synthesis of collagen fibers.

**Keywords:** experimental acute frostbite; extracellular matrix of the dermis; neutrophils; bone marrow; peripheral blood.

**For citation:** Shutskiy N.A., Kashutin S.L., Shapchits N.L., Mizgiriyov D.V., Felenu N.S. [Reactive shifts in neutrophil cells of the bone marrow and peripheral blood after local acute frostbite]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2024; 22(4): 22-31. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2024.04.22-31

**For correspondence:** Shutskiy Nikita Alekseevich, e-mail: nikitashutskij@rambler.ru

**Funding.** The study was funded under the government assignment #124022800143-5.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 11.07.2024.

## Введение

Сведений об участии полиморфноядерных лейкоцитов в воспалительном процессе, исход которого во многом определяется реактивностью тех же нейтрофилов, накоплено достаточно много [1-4]. В свою очередь, реактивность нейтрофилов тесно связана с процессами пролиферации, дифференцировки и созревания самих нейтрофилов, причем все эти процессы динамичны и относительно скоротечны. Так, время их нахождения в костном мозге колеблется в пределах 13–15 суток, в крови — 6–7 часов, в тканях — в среднем 1–2 суток [5]. Различие в соотношении этих процессов определяет наличие фенотипической и функциональной гетерогенности клеток нейтрофильного ряда как в костном мозге, так и в крови [6]. В связи с этим представляет интерес интегральная оценка соотношения процессов пролиферации, дифференцировки и созревания нейтрофилов в костном мозге и в крови в ходе воспаления и ремоделирования тканей.

Нейтрофилы в ходе воспалительного процесса играют роль как в регуляции поведения клеток, участвующих в воспалении, так и в разрушении и удалении факторов, вызвавших воспаление, и поврежденных тканей [7]. Однако сведения о разрушении внеклеточного матрикса дермы в количественном измерении отсутствуют. Кроме того, учитывая фенотипическую и функциональную гетерогенность внутри нейтрофильного звена, представляет интерес определение типа субпопуляций нейтрофилов, участвующих в разрушении внеклеточного матрикса. Если механизмы разрушения и удаления нейтрофилами поврежденных тканей изучены достаточно хорошо, то в доступной литературе отсутствуют четкие представления о влиянии нейтрофильных лейкоцитов на процессы ремоделирования, в частности внеклеточного матрикса дермы. В связи с этим возникает вопрос о непосредственной вовлеченности нейтрофилов в процессы ремоделирования внеклеточного матрикса дермы, если это действительно происходит.

Целью данной работы являлось изучение механизма реактивного сдвига клеток нейтрофильного ряда красного костного мозга и периферической крови при ремоделировании внеклеточного матрикса дермы на модели острого отморожения.

## Материалы и методы исследования

Исследование проведено с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с разрешением Локального этического комитета ФГБОУ ВО СГМУ (город Архангельск) Минздрава России (протокол №05/06-18 от 28.06.2018).

Объектами экспериментальных исследований были выбраны 100 практически здоровых крыс с массой тела 180–200 г в возрасте 4–5 месяцев. Лабораторные животные, у которых моделировали острое отморожение, сформировали 5 групп, каждая из которых включала по 20 особей. В группу сравнения были включены 20 интактных беспородных крыс. Всех крыс содержали в специальном помещении, свободном от патогенов, и поддерживали в условиях постоянной температуры (23–25°C), влажности (40–50%) и 12-часового цикла «свет/темнота». Все этапы исследования проводились с использованием хлороформного наркоза по закрытому контуру.

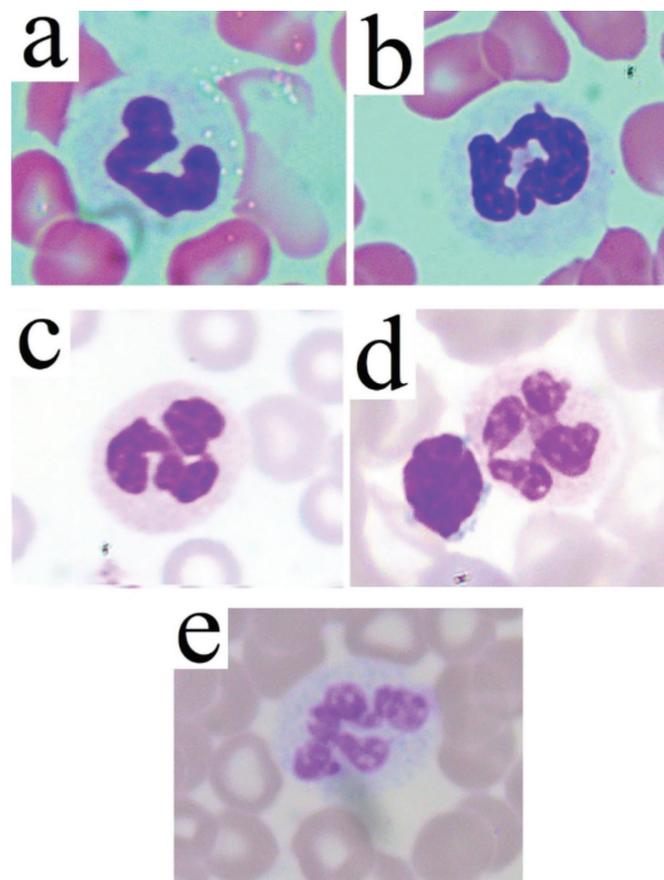
**Моделирование острого отморожения.** Воспроизведение экспериментальной модели острого отморожения проводили после наступления наркотического сна с помощью металлической гирьки диаметром 2,5 см, охлажденной до температуры жидкого азота, которую прикладывали к полностью депилированной коже спины крысы на 3 минуты [8]. Результатом такого воздействия у экспериментальных животных являлось контактное отморожение 3-й степени. В последующем обработка раневой поверхности включала ежедневную обработку 0,01% водным раствором хлоргексидина. Вывод животных из эксперимента проводили на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки (**рис. 1**) с последующим гистологическим исследованием поврежденной кожи, периферической крови и красного костного мозга.

Площадь поражения вычисляли по формуле  $S = d^2\pi/4$ , где  $d$  — диаметр, а  $\pi$  — константа, равная 3,14. Площадь поражения составляла 4,9 см<sup>2</sup>, что составляет приблизительно от 1,5 до 1,6% площади поверхности кожного покрова.

**Панч-биопсия кожи.** Три участка поврежденной кожи извлекали методом панч-биопсии, который позволил извлечь образец заданного диаметра. В настоящем исследовании применяли панч-скальпель с диаметром  $\varnothing = 5$  мм. Два образца погружали в 10% раствор забуференного формалина с целью проведения фиксации.



**Рис. 1.** Модель локального острого отморожения на лабораторных крысах.



**Рис. 2.** Микроснимки нейтрофилов периферической крови крыс: а – палочкоядерный, б – 2-сегментный, с – 3-сегментный, д – 4-сегментный, е – 5-сегментный.

Один из них исследовали с помощью гистологических методов, а второй послужил объектом для выделения изолированных коллагеновых волокон. Третий образец, который погружали в дистиллированную воду и замораживали, анализировали на содержание количества коллагена.

**Определение содержания коллагена дермы.** Содержание коллагена в коже определяли в соответствии с разработанным способом, подробно описанным в работе [9]. Стоит отметить специфичность анализа количества коллагена, поскольку в методике использовали гидролитический фермент – коллагеназу (очищенный продукт жизнедеятельности *Clostridium histolyticum*, I тип, лиофилизированный, ПанЭко, Россия), которая селективно разрушает определенные участки в аминокислотной последовательности коллагена. Активность фермента составляла 240 ед/мг.

**Выделение коллагеновых волокон дермы.** Выделение коллагеновых волокон осуществляли по разработанному нами методу [10], после фиксации биоматериала в формалине в течение двух недель. После полного высушивания выделенные коллагеновые волокна, переносили на двухсторонний скотч для дальнейшего исследования в сканирующем электронном микроскопе.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Сканирующую электронную микроскопию полученного образца проводили с использованием SEM Sigma VP Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Перед проведением микроскопии, образцы подвергали напылению золото-палладиевым покрытием при помощи Q150T ES (Quorum Technologies Ltd, Великобритания) с целью увеличения контрастности и качества изображения. У образцов измеряли толщину коллагеновых волокон с помощью программного обеспечения SmartTiff (Carl Zeiss, Германия).

**Определение содержания нейтрофильных лейкоцитов в крови и костном мозге.** Забор периферической крови для гематологического исследования проводили после торакотомии путем пункции полости сердца перед выведением животного из эксперимента. Забор красного костного мозга осуществляли в соответствии с методом Е.И. Гольдберга, при котором использовали материал, непосредственно взятый из проксимального отдела бедренной кости [11]. Мазки крови и костного мозга после фиксации окрашивали по Романовскому-Гимзе и подсчитывали лейкограмму и миелограмму соответственно с учетом сегментограммы, дифференцируя нейтрофилы на палочкоядерные, нейтрофилы с 2, 3, 4 и 5 и более фрагментами ядра (**рис. 2**).

**Статистический анализ.** Статистическую обработку результатов проводили с помощью SPSS 13.0 для Windows. Распределение параметров отличалось от нормального, в связи с чем описание выборки проводили с помощью подсчета среднего значения медианы (Me) и межквартильного размаха (Q25; Q75). Вероятность различий оценивали по непараметрическим критериям Колмогорова-Смирнова (Z). Корреляционный анализ

проводился с определением коэффициента Кендалла ( $\tau$ ). Статистическая достоверность присваивалась при значении  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

Патологическое состояние кожи после локального отморожения на 3-и сутки характеризовалось полностью разрушенным эпидермисом, повреждением контактов базального слоя с базальной мембраной и межклеточных контакты (рис. 3).

Изменения в дерме сопровождалась наличием некротических и воспалительных процессов, полной реорганизацией волокнистых структур вместе с разрушением волосяных фолликулов и ассоциированных с ними салльных желез, скоплением клеток преимущественно нейтрофильного ряда, что сопровождалось значительным снижением содержания коллагена дермы с 71,4% до 21,7% и толщины коллагеновых волокон с 11,1 мкм до 3,4 мкм (рис. 4), как и было показано ранее [12].

Реактивные сдвиги в костном мозге на 3-и сутки восстановления после острого отморожения, в сравнении с контрольной группой (рис. 5), заключались в статистически значимом увеличении концентрации нейтрофильных метамиелоцитов (с 9,5% (6,2; 10,0) до 12,4% (10,6; 15,6);  $Z = 2,14$ ;  $p = 0,001$ ), в то время как изменений в содержании миелоцитов не регистрировалось. В пуле зрелых нейтрофилов красного костного мозга регистрировали слабую тенденцию к снижению уровня 2- и 3-сегментированных форм нейтрофилов (с 5,3% (3,7; 6,6) до 3,6% (2,4; 5,8);  $Z = 1,04$ ;  $p = 0,235$ ) и с 9,8% (6,6; 12,8) до 7,0% (5,8; 11,4);  $Z = 0,95$ ;  $p = 0,326$ ) на фоне слабо заметного увеличения содержания нейтрофилов с 5 и более сегментами в ядре (с 2,4% (0,6; 4,7) до 3,4% (2,2; 6,4);  $Z = 0,99$ ;  $p = 0,280$ ).

В крови выявили значительное увеличение общего количества циркулирующих нейтрофилов (с 28,5% (23,0; 34,0) до 35,5% (19,2; 49,2);  $Z = 1,36$ ;  $p = 0,040$ ) за счет статистически значимого увеличения концентрации палочкоядерных (с 0,0% (0,0; 0,0) до 0,5% (0,0; 3,8);  $Z = 1,54$ ;  $p = 0,010$ ), а также 2- (с 0,0% (0,0; 0,0) до 4,0% (0,3; 5,8);  $Z = 2,27$ ;  $p = 0,001$ ), 3- (с 0,5% (0,0; 1,0) до 15,0% (11,3; 24,5);  $Z = 2,77$ ;  $p = 0,001$ ) и 4-сегментных форм нейтрофилов (с 3,0% (0,0; 4,0) до 27,0% (16,3; 32,0);  $Z = 2,27$ ;  $p = 0,001$ ) при снижении уровня нейтрофилов с 5 и более сегментами в ядре (с 96,0% (92,0; 98,3) до 47,5% (39,0; 57,0)  $Z = 2,74$ ;  $p = 0,001$ ).

К 7-м суткам после начала процесса регенерации, в результате миграции клеток в область повреждения, сформировался барьер из лейкоцитов, преимущественно состоящий из полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 6).

Одновременно с этим, со стороны подкожной жировой клетчатки формировалась новая соединительная ткань, состоящая из тонких коллагеновых волокон и клеток фибробластического дифферона. Это подтверждается увеличением содержания коллагена дермы

непосредственно в зоне поражения (с 21,71 % до 31,15 %). Также увеличилась толщина волокон коллагена — с 3,36 мкм до 5,65 мкм, что подтверждено значением  $Z = 1,93$  при уровне значимости  $p = 0,001$ .

Изменения клеточного состава в костном мозге затронули содержание нейтрофильных миелоцитов: их уровень резко снизился (с 11,0% (7,4; 14,0) до 3,9 (3,6; 4,3);  $Z = 2,02$ ;  $p = 0,001$ ), тогда как уровень метамиелоцитов не претерпел изменений (12,4% (10,6; 15,6) против 10,0% (7,0; 13,0);  $Z = 0,99$ ;  $p = 0,320$ ). Среди зрелых нейтрофилов красного костного мозга регистрировали увеличение концентрации 2- (с 3,6% (2,4; 5,8) до 7,4% (5,4; 8,3);  $Z = 1,33$ ;  $p = 0,050$ ) и 3-сегментных форм нейтрофилов (с 7,0% (5,8; 11,4) до 13,5% (11,7; 15,2);  $Z = 1,45$ ;  $p = 0,020$ ) на фоне снижения количества нейтрофилов с 5 сегментами в ядре (с 3,4% (2,2; 6,4) до 0,7% (0,0; 1,3);  $Z = 1,78$ ;  $p = 0,004$ ). Уровень палочкоядерных и 4-сегментных форм изменений не демонстрировал.

В крови на 7-е сутки эксперимента изменений в содержании циркулирующих нейтрофилов не регистрировалось (35,5% (19,2; 49,2) и 40,0% (31,2; 50,0);  $Z = 0,94$ ;  $p = 0,320$ ). Зато в структуре сегментограммы наблюдали статистически значимое снижение концентрации нейтрофилов с двумя (с 4,0% (0,3; 5,8) до 0,0% (0,0; 2,0);  $Z = 1,58$ ;  $p = 0,010$ ), тремя- (с 15,0% (11,3; 24,5) до 6,0% (4,0; 10,0);  $Z = 2,05$ ;  $p = 0,001$ ) и четырьмя (с 27,0% (16,3; 32,0) до 14,0% (8,3; 21,5);  $Z = 1,42$ ;  $p = 0,030$ ) сегментами в ядре, что сопровождалось увеличением содержания нейтрофилов, имеющих 5 и более сегментов (с 47,5% (39,0; 57,0) до 75,0% (64,5; 85,8);  $Z = 2,05$ ;  $p = 0,001$ ).

На 14-й день в области повреждения сформировалась корка (струп), и с её краёв начал расти новый эпителий. Под этой коркой развивалась грануляци-

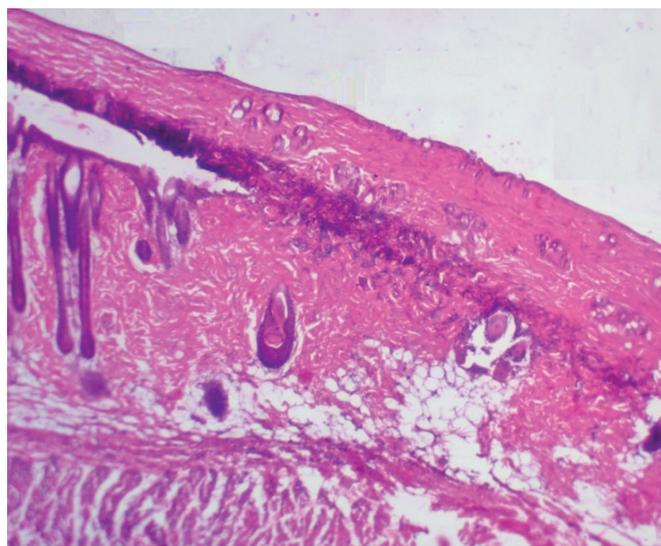
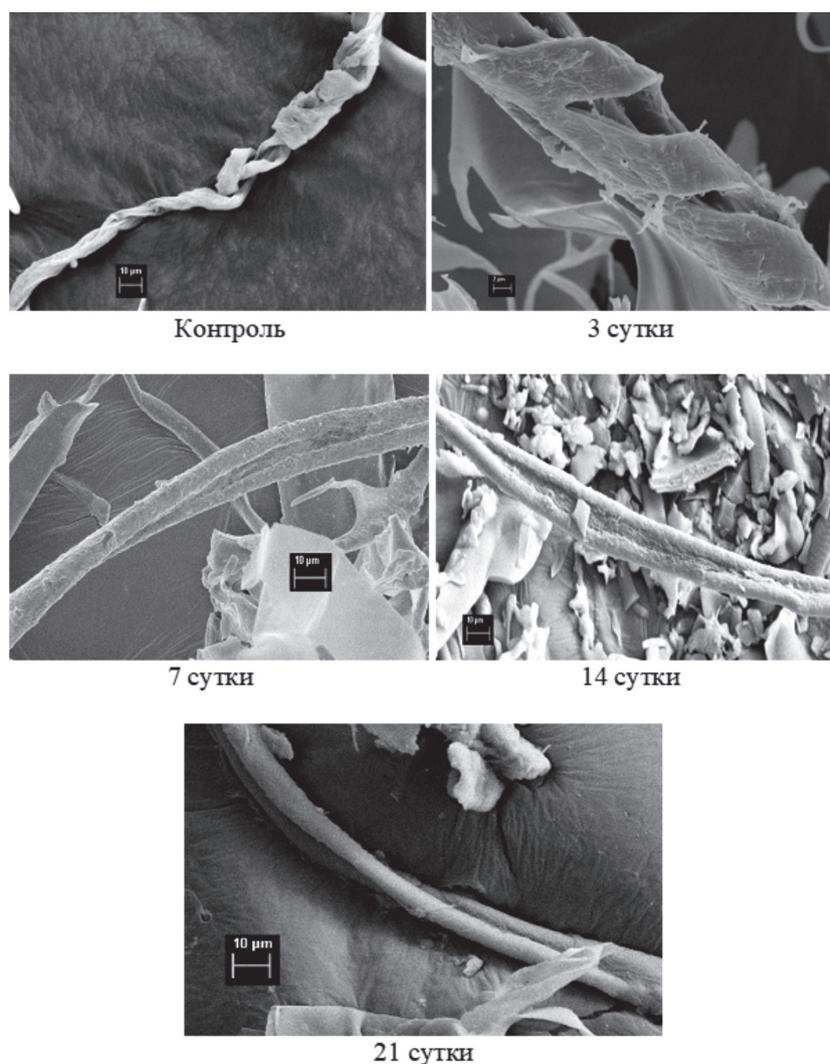


Рис. 3. Пораженная кожа на 3-и сутки после острого отморожения. Об.  $\times 5$ , ок.  $\times 10$ .



**Рис. 4.** Микроснимки выделенных коллагеновых волокон поврежденной кожи крыс после локального острого отморожения.

онная ткань, состоящая из множества тонких соединительнотканых волокон, большого количества мелких сосудов и скопления различных клеток, к которым можно отнести иммунокомпетентные клетки (макрофаги, лимфоциты), клетки фибробластического ряда, а также малодифференцированные клетки. Преимущественная зона для миграции клеток наблюдалась в сетчатом слое дермы на границе с гиподермой (**рис. 7**). Указанные изменения сопровождались увеличением процентного содержания коллагена (с 31,15% до 35,91%;  $Z = 1,24$ ;  $p = 0,090$ ) и толщины его волокон (с 5,65 мкм до 6,99 мкм;  $Z = 1,75$ ;  $p = 0,004$ ).

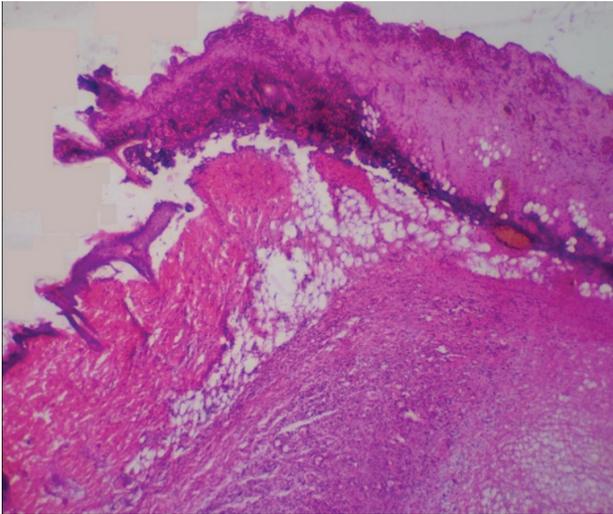
На 14-е сутки после острого отморожения содержание нейтрофильных миелоцитов приобрело явную тенденцию к увеличению (с 3,9% (3,6; 4,3) до 7,0% (5,6; 9,4);  $Z = 1,79$ ;  $p = 0,003$ ), что отличалось от динамики концентрации нейтрофильных метамиелоцитов: их уровень остался прежним (10,0% (7,0; 13,0) против 12,2% (11,4; 2,8);  $Z = 0,81$ ;  $p = 0,530$ ). Из всех зрелых полиморфноядерных нейтрофилов только 2-сегментные фор-

мы имели тенденцию к увеличению (с 7,4% (5,4; 8,3) до 10,8% (9,2; 11,2);  $Z = 1,28$ ;  $p = 0,070$ ). Остальные исследуемые субпопуляции нейтрофильных лейкоцитов динамики не показывали.

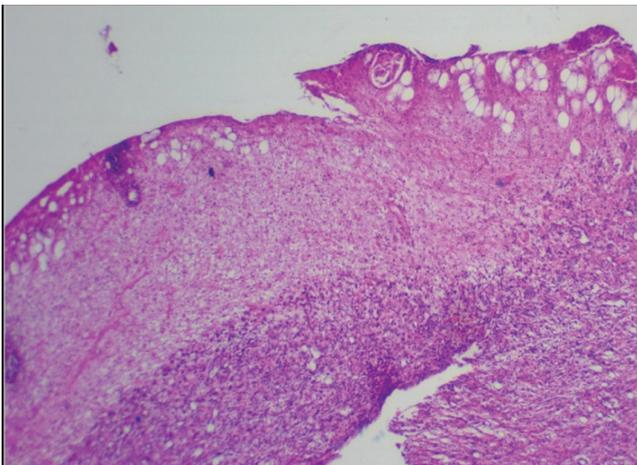
В крови на 14-е сутки эксперимента статистически значимых изменений в общем содержании изучаемых нейтрофилов, а также в структуре сегментограммы не зафиксировано.

Рана после холодового воздействия полностью покрывалась эпителиальным слоем только через 21 день. В грануляционной ткани продолжались воспалительные процессы, и волокнистые структуры преобладали над клеточными элементами. Под эпителиальным слоем в основном находилась плотная рубцовая ткань. Иногда также наблюдались небольшие сальные железы. Волосяные фолликулы, являющиеся придатками кожи, практически не восстанавливались в сформировавшемся регенерате. Гистологическое исследование показало, что количество клеток вернулось к значениям, которые были до контактного холодового воздействия (**рис. 8**). Процентное содержание коллагена и толщина его воло-

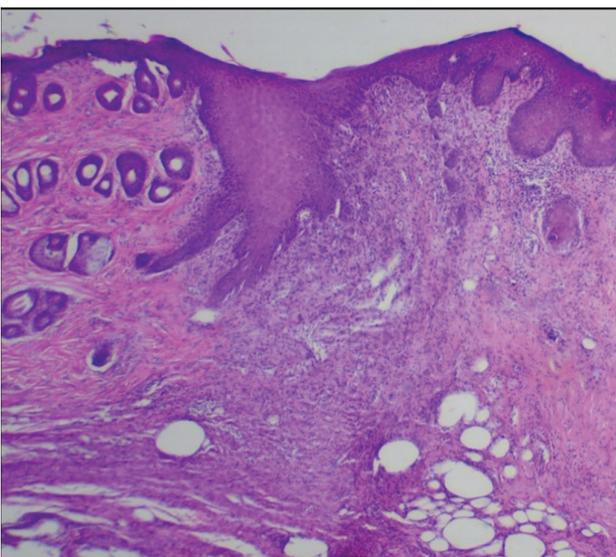




**Рис. 6.** Пораженная кожа на 7-е сутки после острого отморожения. Об.  $\times 5$ , ок.  $\times 10$ .



**Рис. 7.** Пораженная кожа на 14 сутки после острого отморожения. Об.  $\times 5$ , ок.  $\times 10$ .



**Рис. 8.** Пораженная кожа на 21 сутки после острого отморожения. Об. 5, ок. 10.

(3,7; 7,4);  $Z = 0,84$ ;  $p = 0,470$ . Изменения в содержании зрелых нейтрофилов проявились снижением: если в отношении палочкоядерных регистрировали слабую тенденцию (с 0,8% (0,4; 1,4) до 0,4% (0,2; 0,5);  $Z = 1,01$ ;  $p = 0,250$ ), то 2-сегментные нейтрофилы снизились явно (с 10,8% (9,2; 11,2) до 4,8% (4,4; 5,4);  $Z = 1,85$ ;  $p = 0,002$ ). Противоположное направление наблюдали в отношении нейтрофилов с 4, а также с 5 и более сегментами в ядре: их уровень заметно вырос с 4,8% (3,2; 7,0) до 8,8% (7,2; 10,2);  $Z = 1,35$ ;  $p = 0,050$  и с 1,0% (0,2; 1,4) до 3,8% (2,8; 4,7);  $Z = 1,68$ ;  $p = 0,007$ , соответственно. Следует отметить, что к 21-му дню эксперимента количество зрелых форм полиморфноядерных лейкоцитов не отличалось от контрольных цифр, чего нельзя сказать о миелоцитах и метамиелоцитах: их уровень еще не достиг уровня контрольной группы: 9,9% (7,9; 11,6) против 6,0% (3,7; 7,4);  $Z = 1,41$ ;  $p = 0,030$  и 9,5% (6,2; 10,0) против 6,6% (6,3; 7,8);  $Z = 1,25$ ;  $p = 0,080$ .

В крови на 21-е сутки эксперимента регистрировали существенное снижение уровня циркулирующих нейтрофилов (с 40,5% (31,0; 43,0) до 28,5% (23,5; 32,7);  $Z = 1,89$ ;  $p = 0,001$ ), сопоставимое с контрольными значениями ( $Z = 0,51$ ;  $p = 0,950$ ). В структуре сегментограммы отмечалось статистически значимое снижение содержания 2-х (с 2,0 (0,3; 4,0) до 0,0 (0,0; 0,0);  $Z = 2,05$ ;  $p = 0,001$ ), 3-х (с 10,0% (6,0; 14,0) до 2,0% (1,0; 4,0);  $Z = 2,05$ ;  $p = 0,001$ ) и 4-х сегментированных форм нейтрофилов (с 17,0% (8,5; 24,8) до 7,5% (6,3; 11,0);  $Z = 1,74$ ;  $p = 0,005$ ) на фоне увеличения концентрации нейтрофилов с 5 и более сегментами в ядре (с 68,0% (54,5; 80,0) до 89,5% (84,3; 92,0)). Следует отметить, что к 21-му дню эксперимента содержание только палочкоядерных (0,0% (0,0; 0,0) и 0,0% (0,0; 0,0);  $Z = 0,0$ ;  $p = 1,0$ ) и 2-сегментоядерных нейтрофилов (0,0% (0,0; 0,0) и 0,0% (0,0; 0,0);  $Z = 0,3$ ;  $p = 1,0$ ) достигло значений контроля. Уровни нейтрофилов с 3, 4, 5 и более сегментами в ядре статистически значимо отличались от уровней в опытной группе.

## Обсуждение

На 3-е сутки после острого отморожения участка кожи на фоне разрушения эпителиального слоя кожи, повреждения контактов с базальной мембраной, изменений в дерме, в том числе связанных со скоплением клеток нейтрофильного ряда на площади 4,9 см<sup>2</sup>, происходят изменения в содержании нейтрофильных лейкоцитов как в крови, так и в костном мозге. Статистически значимые увеличения концентрации палочкоядерных, 2-, 3- и 4-сегментоядерных форм нейтрофилов в крови происходят на фоне незначительной тенденции к снижению уровней 2- и 3-сегментоядерных форм нейтрофилов в костном мозге. Вполне вероятно, что эти изменения могут быть следствием выхода 2-, 3- и 4-сегментоядерных полиморфноядерных лейкоцитов из костного мозга в кровь. Учитывая то, что снижение количества нейтрофилов с 2 и 3 сегментами

в костном мозге было только в виде тенденции, а в крови изменения носили статистически значимый характер, можно предполагать, что резервные возможности костного мозга задействованы далеко не в полном объеме, тем более что уровни палочкоядерных форм и нейтрофилов с 4 сегментами в костном мозге от контроля совсем не отличались. Возникает вопрос: за счет чего происходит пополнение резервных возможностей костного мозга? Слабые изменения со стороны содержания зрелых форм нейтрофилов сопровождались значимым снижением содержания нейтрофильных метамиелоцитов, но не миелоцитов. Известно, что нейтрофильные метамиелоциты, в отличие от миелоцитов, вступать в митоз уже не способны [13]. Складывается впечатление, что формирование резерва зрелых нейтрофилов на 3-и сутки после острого локального отморожения связано с активизацией дифференцировки метамиелоцитов без активизации митоза миелоцитов.

Таким образом, в ответ на острое холодовое повреждение происходят реактивные сдвиги, как в крови, так и в костном мозге, заключающиеся в выходе зрелых нейтрофилов с 1, 2, 3 и 4 сегментами в ядре, но не 5-сегментных форм из костного мозга в периферическую кровь, и пополнении резерва зрелых нейтрофилов за счет активизации дифференцировки метамиелоцитов.

На 7-е сутки после острого отморожения в зоне непосредственного поражения сформировался лейкоцитарный вал преимущественно за счет полиморфноядерных лейкоцитов, фибробласты активно синтезировали коллагеновые волокна. Если в крови наблюдали статистически значимое снижение концентрации нейтрофилов с 2, 3 и 4 сегментами в ядре, то в костном мозге, наоборот, содержания 2- и 3-сегментных форм увеличивались. Концентрация нейтрофилов с 4 сегментами в ядре также увеличивалась, но только в виде очень слабой тенденции. Такая разнонаправленная реакция крови и костного мозга на 7-е сутки после острого локального отморожения, предположительно может указывать, с одной стороны, на активную миграцию нейтрофилов, особенно имеющих 2 и 3 сегмента в ядре, из периферической крови в зону повреждения кожи. С другой стороны, о накоплении в костном мозге резервов из 2- и 3-сегментоядерных нейтрофилов за счёт активной дифференцировки миелоцитов в метамиелоциты, о чём может свидетельствовать статистически значимое снижение нейтрофильных миелоцитов (с 11,0% до 3,9%) при отсутствии изменений в содержании метамиелоцитов (с 10,0% до 12,4%). Что касается нейтрофилов с 5-ю и более сегментами в ядре, то, учитывая существенное снижение их концентрации в костном мозге, сопровождающееся увеличением их количества в крови, может указывать на интенсивный выход их из костного мозга, а миграция их из периферической крови в ткань, наоборот, замедлена. Учитывая, что сегментация нейтрофилов необходима для миграции из крови в ткань: чем выше уровень сегментации, тем миграция проходит лег-

че и быстрее, а также то, что фагоцитарная активность нейтрофилов тоже связана с сегментацией: наиболее активные те нейтрофилы, которые обладают 2 и 3 сегментами в ядре [5], можно предполагать о вовлечении в миграционный процесс функционально активных, способных к фагоцитозу нейтрофилов, а не более сегментированных.

Таким образом, на 7-е сутки при формировании клеточного вала в зоне поражения и активного синтеза фибробластами коллагеновых волокон активно происходит миграция, особенно нейтрофилов с 2 и 3 сегментами в ядре в ткань, что сопровождается накоплением резервов этих субпопуляций нейтрофилов в костном мозге за счет активной дифференцировки миелоцитов в метамиелоциты.

На 14-е сутки в зоне поражения клеточный состав изменился: стали преобладать макрофаги, лимфоциты, фибробластические и малодифференцированные клетки. В крови и в костном мозге каких-либо значимых изменений не фиксировали, кроме одного: увеличения концентрации нейтрофильных миелоцитов (с 3,9% до 7,0%), что, вероятно, может указывать на замедление процессов дифференцировки нейтрофильных миелоцитов в метамиелоциты.

Таким образом, на 14-е сутки происходит замена полиморфноядерных лейкоцитов на лимфогистиоцитарные элементы без существенных изменений в крови, а также накопление в костном мозге миелоцитов, вполне вероятно, связанное с замедлением дифференцировки из миелоцитов в метамиелоциты, уровень которых остался сравнимым с уровнем, регистрируемым на 7-е сутки.

На 21-е сутки, когда раневая зона покрылась эпителиальным слоем, под которым стала определяться плотная рубцовая ткань, в крови произошла вторая волна снижения концентрации не только 2, 3 и 4-сегментных форм нейтрофилов, но также палочкоядерных нейтрофилов на фоне увеличения числа циркулирующих 5-сегментоядерных полиморфноядерных лейкоцитов. Изменения в костном мозге, заключающиеся в снижении количества нейтрофилов с 2 сегментами в ядре и увеличении концентрации клеток с 4 и 5 сегментами, в итоге привели к тому, что в контрольной и опытной группах различий в содержании зрелых нейтрофилов уже не было. В то же время, в крови различия между контрольной и опытной группами ещё сохранялись, особенно в отношении нейтрофилов с 3, 4 и 5 сегментами в ядре. Восстановление резерва зрелых полиморфноядерных лейкоцитов костного мозга на 21-е сутки, по всей вероятности, произошло за счет усиленной дифференцировки метамиелоцитов в зрелые клетки, о чем могут свидетельствовать их более низкие концентрации (6,6% против 12,2%), которые так и не достигли значений опытной группы (против 9,5%). Кроме того, к 21-му дню содержание нейтрофильных миелоцитов также не достигло значений опытной группы (6,0% против 9,9%).

Таким образом, на 21-е сутки в костном мозге восстановление резерва зрелых нейтрофилов произошло, тогда как в крови реактивные сдвиги ещё продолжают за счёт усиленной дифференцировки незрелых форм – метамиелоцитов и миелоцитов, содержание которых еще не восстановилось.

### Заключение

На 3-е сутки после острого локального отморожения в дерме формируется лейкоцитарный вал, состоящий преимущественно из нейтрофилов, на фоне снижения процентного содержания коллагена дермы (с 71,43% до 21,71%) и толщины его волокон (с 11,11 мкм до 3,36 мкм). Снижение процентного содержания коллагена в зоне поражения отрицательно коррелирует с повышением содержания в крови нейтрофилов с 3 и 4 сегментами в ядре:  $\tau = -0,88$ ;  $p = 0,03$  и  $\tau = -0,91$ ;  $p = 0,04$ . С увеличением процентного содержания коллагена дермы и толщины коллагеновых волокон на 7-е сутки корреляционные связи становились слабыми и статистически недостоверными, а, в дальнейшем, на протяжении всего эксперимента они уже никак не проявлялись. С учетом полученных данных можно предполагать, что нейтрофилы, особенно содержащие 3 и 4 сегмента в ядре, задействованы лишь в деградации внеклеточного матрикса дермы, но не задействованы в непосредственном синтезе коллагеновых волокон, именно, в синтезе, поскольку о влиянии нейтрофилов на миграционную активность фибробластов сведения имеются [14].

### Авторский вклад

Шутский Н.А. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных, написание текста, подготовка, создание и визуализация результатов, написание текста. Кашутин С.Л. – разработка концепции, формирование идеи, формулировка или развитие ключевых целей и задач, утверждение окончательного варианта публикации. Шапчиц Н.Л. – проведение экспериментов и статистического анализа. Мизгирёв Д.В. – редактирование текста, утверждение окончательного варианта публикации. Феленко Н.С. – проведение экспериментов, визуализация результатов.

### Список литературы

1. Валентюкевич А.Л., Меламед В.Д., Прокопчик Н.И. Экспериментальное моделирование отморожений разной степени тяжести у лабораторных животных. Часть 2. Морфологическая оценка эффективности устройства для моделирования контактных отморожений. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2021; 19(1): 46–54. DOI: 10.25298/2221-8785-2021-19-1-46-54
2. Хадарцев А.А., Фудин Н.А., Миненко И.А. Применение гипотермии в сочетании с транскраниальной электростимуляцией в спорте (краткое сообщение). *Вестник новых медицинских технологий*. 2022; 16(1): 147–150. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-1-3-9
3. Шаповалов К.Г., Сизоненко В.А., Бурдинский Е.Н. Изменения компонентов сосудистого тонуса и показателей микроциркуля-

- ции при отморожениях нижних конечностей. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова*. 2008; 167(3): 67–68.
4. Arora R. Mechanism of freeze-thaw injury and recovery: A cool retrospective and warming up to new ideas. *Plant Sci*. 2018; 270: 301–313. DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.03.002
  5. Долгушин И.И., Бухарин О.В. *Нейтрофилы и гомеостаз*. Екатеринбург: Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 2001. 283 с.
  6. Rawat K., Syeda S., Shrivastava A. Neutrophil-derived granule cargoes: paving the way for tumor growth and progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2021; 40(1): 221–244. DOI: 10.1007/s10555-020-09951-1
  7. Андрюков Б.Г., Богданова В.Д., Ляпун И.Н. Фенотипическая гетерогенность нейтрофилов: новые антимикробные характеристики и диагностические технологии. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(2): 211–221. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-2-211-221
  8. 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. *Вісник морфології*. 2010; 16(3): 526–528.
  9. Малявская С.И., Кашутин С.Л., Шутский Н.А., Шагров Л.Л., Мизгирёв Д.В., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г. *Способ определения количества коллагена в ткани*. Патент РФ 2689337; 2018.
  10. Горбатова Л.Н., Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Малявская С.И., Шагров Л.Л., Мизгирёв Д.В., Чухчин Д.Г. *Способ выделения коллагеновых волокон дермы*. Патент РФ 2764514; 2022.
  11. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гуцин Я.А. Особенности патологоанатомического исследования группы экспериментальных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014; 1: 75–80.
  12. Шутский Н.А., Шагров Л.Л., Кашутин С.Л., Малявская С.И. Содержание коллагена дермы и факторов роста сыворотки крови у крыс после локального холодового повреждения. *Цитология*. 2020; 62(8): 601–608. DOI: 10.31857/S0041377120080076
  13. Алешина Г.М. Нейтрофильные гранулоциты — фагоциты, и не только. *Медицинский академический журнал*. 2020; 20(4): 5–16. DOI: 10.17816/MAJ52808.
  14. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(1): 9–38. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38

### References

1. Valentyukevich A.L., Melamed V.D., Prokopchik N.I. [Experimental modeling of frostbites of varying severity in laboratory animals. Part 2. Morphological assessment of the effectiveness of the device for simulating contact frostbite]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Journal of the Grodno State Medical University]*. 2021; 19(1): 46–54. DOI: 10.25298/2221-8785-2021-19-1-46-54 (in Russian)
2. Khadartsev A.A., Fudin N.A., Minenko I.A. [Use of hypothermia in combination with transcranial electrostimulation in sports (short message)]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy [Journal of New Medical Technologies]*. 2022; 16(1): 147–150. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-1-3-9 (in Russian)
3. Shapovalov K.G., Sizonenko V.A., Burdinsky E.N. [Changes in components of the vascular tone and microcirculation indices in frostbites of lower extremities]. *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova [Grekov's Bulletin of Surgery]*. 2008; 167(3): 67–68. (in Russian)
4. Arora R. Mechanism of freeze-thaw injury and recovery: A cool retrospective and warming up to new ideas. *Plant Sci*. 2018; 270: 301–313. DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.03.002
5. Dolgushin I.I., Bukharin O.V. [*Neutrophils and homeostasis*]. Yekaterinburg: Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, 2001. 283 p. (in Russian)
6. Rawat K., Syeda S., Shrivastava A. Neutrophil-derived granule cargoes: paving the way for tumor growth and progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2021; 40(1): 221–244. DOI: 10.1007/s10555-020-09951-1
7. Andryukov B.G., Bogdanova V.D., Lyapun I.N. [Phenotypic heterogeneity of neutrophils: new antimicrobial characteristics and diagnostic technologies]. *Gematologiya i transfuziologiya [Hematology and Transfusiology]*. 2019; 64(2): 211–221. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-2-211-221 (in Russian)
8. Boyko V.V., Milovidova A.E., Yanovskaya L.G., Brusnitsyna M.P., Isaev Yu.I., Logachev V.K., Leontyeva L.V. [Study of morphological

- features in the tissues of experimental animals when modeling cold trauma]. *Vestnik morfologii [Reports of Morphology]*. 2010; 16(3): 526–528. (in Russian)
9. Malyavskaya S.I., Kashutin S.L., Shutsky N.A., Shagrov L.L., Mizgirev D.V., Aksenov A.S., Chukhchin D.G. [Method for determining the amount of collagen in a tissue]. Patent of the Russian Federation 2689 337; 2018. (in Russian)
  10. Gorbatova L.N., Shutsky N.A., Kashutin S.L., Malyavskaya S.I., Shagrov L.L., Mizgirev D.V., Chukhchin D.G. [Method for isolating collagen fibers of the dermis]. Patent of the Russian Federation 2764514; 2022. (in Russian)
  11. Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushin Y.A. [Features autopsy report of the experimental group of animals]. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii [International bulletin of Veterinary Medicine]*. 2014; 1: 75–80. (in Russian)
  12. Shutskiy N.A., Shagrov L.L., Kashutin S.L., Malyavskaya S.I. [The content of dermal collagen and growth factors in blood serum of rats after local cold injury]. *Tsitologiya [Cytology]*. 2020; 62(8): 601–608. DOI: 10.31857/S0041377120080076 (in Russian)
  13. Aleshina G.M. [Neutrophilic granulocytes: phagocytes and more]. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal [Medical Academic Journal]*. 2020; 20(4): 5–16. DOI: 10.17816/MAJ52808 (in Russian)
  14. Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Y., Kuznetsova E.K. [Neutrophil as a multifunctional relay in immune system]. *Infektsiya i immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2019; 9(1): 9–38. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38 (in Russian)

#### **Сведения об авторах:**

*Шутский Никита Алексеевич* — ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0003-0979-1569>

*Кашутин Сергей Леонидович* — доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой кожных и венерических болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-2687-3059>

*Шапчиц Наталья Леонидовна* — ассистент кафедры кожных и венерических болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0009-0003-5411-1064>

*Мизгирёв Денис Владимирович* — доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-6804-3790>

*Феленко Николай Сергеевич* — ассистент кафедры хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-3591-8247>