

DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-1-92-96



УДК 616.05-003.92:618.5-089.888.61

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2021

## Кариометрические показатели фибробластов кожи в ранние сроки заживления ран

А. А. Андреев<sup>1\*</sup>, И. А. Ульянов<sup>1</sup>, П. М. Торгун<sup>2</sup>, А. А. Глухов<sup>1</sup>, Н. Т. Алексеева<sup>1</sup><sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Воронеж, Россия<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж, Россия

**Целью** исследования явилось сравнительное изучение кариометрических показателей фибробластов при использовании различных кислотомодифицированных растворов в ранние сроки заживления кожных ран у крыс.

**Материал и методы.** Эксперимент проводили на 75 крыс линии Wistar. Для лечения ран применяли 0.9% р-р NaCl при pH – 5.0; 7.0; и 7.5. Материал фиксировали в жидкости Штиве, 10% растворе формалина. Тонкие парафиновые срезы (4–5 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином, азаном по Гейденгайну. Площадь ядер фибробластов определяли планиметрически.

**Результаты.** У интактных крыс в коже выявили три типа фибробластов. В сосочковом слое располагались папиллярные фибробласты; в ретикулярном слое – ретикулярные фибробласты. Третий тип фибробластов располагался между волосными фолликулами. У крыс всех опытных групп в 1-е сутки после нанесения раны выявлялись обширные воспалительные процессы, кровоизлияния, некротические изменения структурных компонентов кожи. На 3-и сутки после нанесения раны у крыс 1-й и 4-й групп площадь ядер папиллярных фибробластов в периферических участках раны статистически значимо увеличивалась на 24.4% и 22.4% соответственно по сравнению с контролем. У животных 3-й группы площадь ядер фибробластов оставалась без изменений. На 5-е сутки у крыс всех опытных групп наблюдалось увеличение численности фибробластов по всей поверхности раны. Площадь ядер фибробластов у крыс 4-й группы статистически значимо увеличивалась на 26.5% ( $P < 0.001$ ) по сравнению с контролем. У животных 3-й группы увеличение площади ядер по сравнению с контролем составляло всего 6.5%, при этом статистически значимых изменений по сравнению с контролем не обнаруживалось. Площадь ядер фибробластов, локализованных между волосными фолликулами, достигала максимальной величины, что свидетельствовало о высокой функциональной напряженности фибробластов волосных фолликулов.

**Заключение.** Применение 0.9% раствора NaCl с pH 5.0 в первую фазу заживления раны и 0.9% раствора NaCl с pH 7.5 во вторую фазу заживления раны уменьшает процессы воспаления, при этом повышается секреторная активность фибробластов, ускоряется процесс коллагенизации.

**Ключевые слова:** фибробласты папиллярные, ретикулярные, фибробласты волосных фолликулов, раны, кислотомодифицированные растворы.

### Karyometric Parameters of Skin Fibroblasts in the Early Stages of Wound Healing

© А.А. Андреев<sup>1\*</sup>, И.А. Ульянов<sup>1</sup>, П.М. Торгун<sup>2</sup>, А.А. Глухов<sup>1</sup>, Н.Т. Алексеева<sup>1</sup><sup>1</sup>N. N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia<sup>2</sup>Emperor Peter I Voronezh State Agrarian University, Voronezh, Russia

**The aim** of the study was a comparative study of the karyometric parameters of fibroblasts using various acid-modified solutions in the early stages of healing of skin wounds in rats.

**Material and methods.** The experiment was carried out on 75 Wistar rats. For the treatment of wounds, 0.9% NaCl solution was used at a pH of 5.0; 7.0; and 7.5. The material was fixed in Shtiva liquid, 10% formalin solution. Thin paraffin sections (4–5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin and eosin, azan according to Heidenhain. The area of fibroblast nuclei was determined planimetrically

**Results.** Three types of fibroblasts were found in the skin of intact rats. The papillary layer contained papillary fibroblasts; the reticular layer – reticular fibroblasts. The third type of fibroblasts was located between the hair follicles. In rats of all experimental groups, on the 1<sup>st</sup> day after the wound was inflicted, extensive inflammatory processes, hemorrhages, and necrotic changes in the structural components of the skin were revealed. On the 3<sup>rd</sup> day after the wound was inflicted in rats of the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> groups, the area of the nuclei of papillary fibroblasts in the peripheral areas of the wound statistically significantly increased by 24.4% and 22.4%, respectively, compared with the control. In animals of the 3<sup>rd</sup> group, the area of fibroblast nuclei remained unchanged. On the 5<sup>th</sup> day, an increase in the number of fibroblasts over the entire surface of the wound was observed in rats of all experimental groups. The area of fibroblast nuclei in rats of the 4<sup>th</sup> group increased statistically significantly by 26.5% ( $P < 0.001$ ) as compared to the control. In animals of the 3<sup>rd</sup> group, the increase in the area of the nuclei in comparison with the control was only 6.5%, while no statistically significant changes were found in comparison with the control. The area of the fibroblast nuclei located between the hair follicles reached a maximum value, which indicated a high functional tension of the hair follicle fibroblasts.

**Conclusion.** The use of 0.9% NaCl solution with pH 5.0 in the first phase of wound healing and 0.9% NaCl solution with pH 7.5 in the second phase of wound healing reduces inflammation processes, while the secretory activity of fibroblasts increases, and collagenization is accelerated.

**Key words:** papillary fibroblasts, reticular fibroblasts, hair follicle fibroblasts, wounds, acid-modified solutions.

\*Автор для переписки:

Андреев Александр Алексеевич  
Воронежский государственный медицинский университет  
им. Н.Н. Бурденко, ул. Студенческая, 10, Воронеж,  
394036, Российская Федерация

\*Corresponding author:

Aleksandr Andreev  
Voronezh State Medical University, ul. Studencheskaya, 10,  
Voronezh, 394036, Russian Federation  
E-mail: sugery@mail.ru

## Введение

Фибробласты кожи принимают активное участие в формировании и восстановлении соединительнотканной стромы дермы и подкожной жировой клетчатки, обеспечивают нормальное функционирование клеток многослойного плоского эпителия эпидермиса [1, 4, 6, 7]. Они секретируют целый комплекс биологически активных веществ – факторы роста, иммуностимуляторы, белки внеклеточного матрикса (различные типы коллагенов, эластин, протеогликаны и др.), факторы клеточного роста эпителиоцитов, интерлейкины (IL-6, IL-8), регулирующие иммунные процессы в организме [3, 10, 11].

Благодаря секреции факторов роста фибробласты играют важную роль в регенерации всех слоев кожи: эпидермиса, сосочкового и ретикулярного слоя дермы, а так же подкожной жировой клетчатки [1, 6, 7, 11].

Особое значение фибробласты имеют в сохранении и функционировании стволовых соединительнотканых и эпителиальных клеток кожи. Ключевая роль фибробластам принадлежит в восстановительных процессах при повреждении целостности кожного покрова.

Процесс регенерации характеризуется высокой метаболической активностью и основывается на биохимических реакциях, для которых величина pH имеет ощутимое значение. По современным данным значение кислотности мягких тканей зависит от внеклеточных pH-градиентов, в определенной мере препятствующих быстрому закрытию дефекта за счет угнетения процессов миграции и пролиферации клеток [2, 12, 13, 14, 15, 16, 17]

Целью настоящего сообщения является сравнительное изучение секреторной активности фибробластов при использовании различных кислотомодифицированных растворов в ранние сроки заживления кожных ран у крыс.

## Материал и методы исследования

Исследование проведено на 75 половозрелых крысах-самцах линии Wistar в трех опытных группах. Животным каждой группы

в области спины наносили раны в форме эллипса размером 1×1.5 см. В первой опытной группе крыс раны обрабатывали 0.9% раствором NaCl с pH 5.0 на протяжении всего эксперимента. Во второй – 0.9% раствором NaCl с pH 7.0; в третьей – 0.9% раствором NaCl с pH 7.5. В четвертой опытной группе применялось двухэтапное лечение: на первом этапе использовали 0.9% раствор NaCl с pH 5.0 в I фазу раневого процесса (1-е, 3-и сутки после нанесения раны); на втором этапе применяли 0.9% раствора NaCl с pH 7.5 во II фазу репаративной регенерации (5-е сутки после нанесения ран). Контрольную группу составляли интактные крысы в количестве 15 особей.

Взятие материала для гистологических исследований проводилось в ранние сроки после нанесения раны: 1-е, 3-и, 5-е сутки. Работа с лабораторными животными выполнялась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР №775 от 12.08.77). Для гистологических исследований брали кусочки кожи размером 1×1.5 см из области раны с участком прилегающей неповрежденной кожи. Материал фиксировали в жидкости Штыве, 10% растворе нейтрального формалина, обезжовивали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, азаном по Гейденгайну.

Проводили кариометрическое исследование фибробластов: с помощью планиметра определяли площадь ядер фибробластов (по 100 измерений для каждого животного) [5].

Статистический анализ результатов проводили при помощи параметрического t-критерия Стьюдента, так как выборки имели нормальное распределение и одинаковые дисперсии в сравниваемых группах. Для определения нормальности распределения выборок использовали тест Колмогорова–Смирнова. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.001$  [8].

## Результаты и их обсуждение

В коже крыс нами выявлены три типа фибробластов: фибробласты, расположенные в сосочковом слое дермы; фибробласты, залегающие в ретикулярном слое дермы и фибробласты волосяных фолликулов.

Фибробласты в сосочковом слое дермы (рис. 1) встречаются в наибольшем количестве и являются функционально активными клетками, синтезирующими межклеточное вещество соединительнотканного компонента

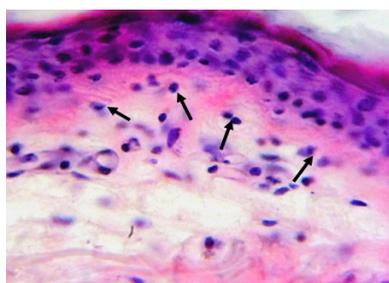


Рис. 1. Кожа интактной крысы. Фибробласты отмечены стрелками. Фиксация: жидкость Штыве. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 600.

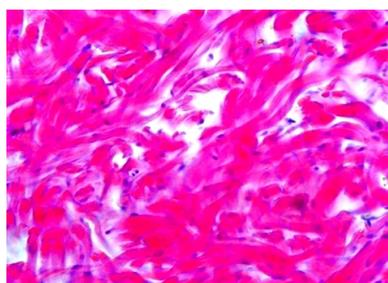


Рис. 2. Кожа интактной крысы. Между волокнами в сетчатом слое дермы располагаются фибробласты. Фиксация: жидкость Штыве. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув. 600.

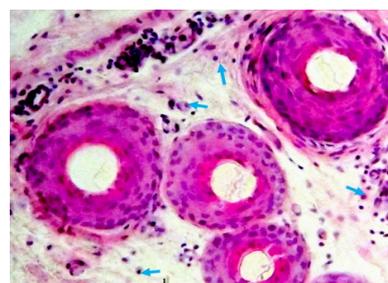


Рис. 3. Кожа интактной крысы. Нижняя часть ретикулярного слоя. Между волосяными фолликулами в ретикулярном слое дермы располагаются фибробласты (обозначены голубыми стрелками). Фиксация: жидкость Штыве. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув. 600.

Таблица 1

**Кариометрические показатели фибробластов сосочкового слоя дермы в ранние сроки заживления ран ( $M \pm m$ ,  $\mu\text{m}^2$ )**

№ п/п	Группы животных	Площадь ядер фибробластов
1-е сут после нанесения раны		
	Контроль	44.14±0.35
1	0.9% p-p NaCl (pH – 5.0)	48.18±0.38*
2	0.9% p-p NaCl (pH – 7.0)	49.10±0.37*
3	0.9% p-p NaCl (pH – 7.5)	45.15±0.37
4	0.9% p-p NaCl (pH – 5.0); (pH – 7.5)	48.24±0.34*
3-е сут после нанесения раны		
	Контроль	45.13±0.37
1	0.9% p-p NaCl (pH – 5.0)	56.18±0.39*
2	0.9% p-p NaCl (pH – 7.0)	52.15±0.38*
3	0.9% p-p NaCl (pH – 7.5)	46.13±0.37
4	0.9% p-p NaCl (pH – 5.0); (pH – 7.5)	55.24±0.35*
5-е сут после нанесения раны		
	Контроль	46.11±0.35
1	0.9% p-p NaCl (pH – 5.0)	57.28±0.35*
2	0.9% p-p NaCl (pH – 7.0)	52.10±0.36*
3	0.9% p-p NaCl (pH – 7.5)	49.10±0.37
4	0.9% p-p NaCl (pH – 5.0); (pH – 7.5)	58.34±0.38*

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем при  $P < 0.001$ .

кожи (волокна, гликозаминогликаны, фибронектин). Эти клетки принимают активное участие в заживлении кожных ран.

Фибробласты (рис. 1, 2), располагающиеся в ретикулярном слое, также обеспечивают восстановительные процессы в коже, некоторые из этих клеток являются наиболее дифференцированными клетками и превращаются в фиброциты. В фиброцитах снижаются синтетические процессы, уменьшается площадь гранулярной цитоплазматической сети, ядра этих клеток темные и имеют удлиненную форму.

Фибробласты волосяных фолликулов (рис. 3) располагаются в глубоких слоях ретикулярного слоя между волосяными фолликулами и участвуют в образовании волосяной сумки и волосяного сосочка в области волосяной луковицы. Фибробласты волосяных фолликулов принимают активное участие в процессах заживления ран, в восстановлении во-

лосяного покрова кожи при линьке и при образовании новых волосяных фолликулов.

Одним из объективных критериев секреторной активности фибробластов является величина их ядер. Границы цитоплазмы фибробластов выражены нечетко, поэтому площадь фибробластов определить сложно. Ядра фибробластов имеют овальную форму и всегда имеют хорошо выраженные границы. Результаты проведенных нами кариометрических исследований фибробластов представлены в табл. 1.

У крыс контрольной группы площадь ядер фибробластов отличалась наименьшей величиной по сравнению с аналогичным показателем у животных опытных групп.

У крыс опытных групп в 1-е сутки после нанесения раны выявлены обширные воспалительные процессы и сосудистые изменения: обширные кровоизлияния, некротические изменения эпидермиса, коллагеновых

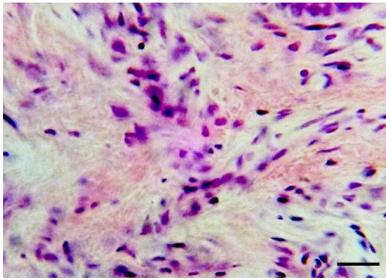


Рис. 4. Кожа крысы на 5-е сутки после нанесения раны. Видны многочисленные овалы ядра фибробластов. Фиксация: 10% раствор формалина. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув. 900.

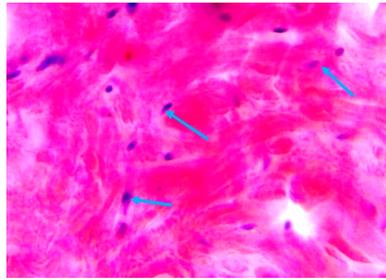


Рис. 5. Ретикулярный слой дермы кожи крысы (группа 4). 5-е сутки после нанесения раны. Видны толстые зрелые пучки коллагеновых волокон, между которыми располагаются фибробласты. Фиксация: 10% раствор формалина. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув. 600.

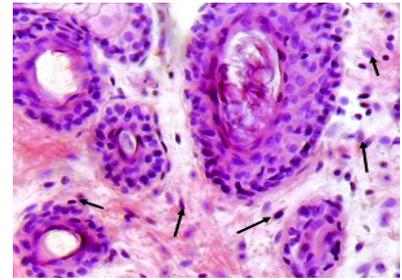


Рис. 6. Кожа крысы на 5-е сутки после нанесения раны. Многочисленные активно функционирующие фибробласты (обозначены черными стрелками) между волосными фолликулами в глубоких слоях ретикулярного слоя дермы. Фиксация: 10% раствор формалина. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув. 900.

волокон дермы кожи. Некрозу подвергались так же фибробласты, коллагеновые и эластические волокна. В 1-е сутки после нанесения раны у животных трех опытных групп (1-, 2-, 4-й) в участках, прилегающих к ране, выявлено статистически значимое увеличение площади ядер фибробластов на 8–9.2% по сравнению с контролем. У животных 3-й группы площадь ядер фибробластов оставалась без изменений. В меньшей степени воспалительные процессы обнаружены у животных 1-й и 4-й групп, у которых раны были обработаны 0.9% раствором поваренной соли при pH 5.0. Обращает на себя внимание появление в значительном количестве митотически делящихся фибробластов.

На 3-и сутки после нанесения раны у крыс 1-й и 4-й групп площадь ядер папиллярных фибробластов в периферических участках раны статистически значимо увеличивалась более чем на 22% по сравнению с контролем. У животных 3-й группы площадь ядер фибробластов оставалась без изменений (табл. 1). У крыс 2-й группы увеличение площади ядер фибробластов по сравнению с контролем составило 15.5% ( $P < 0.001$ ).

На 5-е сутки у крыс всех опытных групп выявлено увеличение численности фибробластов по всей поверхности раны. Площадь ядер фибробластов у крыс 1-й и 4-й групп была статистически значимо ( $P < 0.001$ ) больше по сравнению с контролем на 24–26.5%. У крыс 2-й группы площадь ядер фибробластов по сравнению с контролем ( $P < 0.001$ ) увеличивалась на 13.0%, а у животных 3-й группы (табл. 1) увеличение площади ядер составило всего 6.5%, при этом статистически значимых изменений по сравнению с контролем не выявлено.

Гистологически на 5-е сутки обнаружено интенсивное образование коллагеновых волокон и сосудов в области раны. Наиболее выраженные процессы коллагенизации и

формирования кровеносных и лимфатических сосудов в области раны (вторая фаза регенерации заживления раны) выявлены у животных 1-й и 4-й групп.

У животных 4-й группы (рис. 5) ядра фибробластов больше по сравнению с ядрами фибробластов (рис. 4) третьей опытной группы.

У животных 4-й группы в глубоких слоях сетчатого слоя дермы кожи выявлены толстые пучки зрелых коллагеновых волокон (рис. 5), между которыми располагаются фибробласты. Средняя площадь ядер фибробластов ретикулярного слоя меньше площади фибробластов сосочкового слоя и в среднем составляет  $47.10 \pm 0.37$   $\mu\text{m}^2$ , что свидетельствует о снижении секреторной активности этих клеток в сетчатом слое кожи.

Представляет особый интерес выяснение функционального состояния фолликулярных фибробластов, располагающихся между волосными фолликулами в папиллярном слое дермы кожи (рис. 6).

Проведенные кариометрические исследования фибробластов волосных фолликулов показали, что площадь ядер фибробластов, локализованных между волосными фолликулами достигает максимальной величины ( $62.12 \pm 0.37$   $\mu\text{m}^2$ ). Это свидетельствует о высокой функциональной напряженности фибробластов волосных фолликулов.

## Заключение

Применение 0.9% раствора NaCl с pH 5.0 в первую фазу заживления раны снижает процессы воспаления, при этом повышается секреторная активность фибробластов дермы, ускоряется процесс коллагенизации. Применение 0.9% раствора NaCl с pH 7.0 во вторую фазу заживления раны сопровождается высокой функциональной активностью папиллярных фибробластов. Фибробласты, локализо-

ванные между волосяными фолликулами, характеризуются в эту фазу признаками максимальной функциональной активности, тогда как в фибробластах сетчатого слоя наблюдается снижение уровня секреторных процессов.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

1. Алексеева Н.Т., Глухов А.А., Остроушко А.П. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2012;5(3):1–16 [Alekseeva NT, Glukhov AA, Ostroushko A.P. The role of fibroblastic cells differona in the process of wound healing. Bulletin of Experimental and Clinical Surgery. 2012;5(3):1–16] (in Russian).
2. Андреев А.А., Цветикова Л.Н., Карапутьян А.Р., Чуян А.О. Значение кислотности при регенерации мягкой ткани. Вестник Воронежского института высоких технологий. 2016;17(2):17–22 [Andreev AA, Tsvetikova LN, Karaputyen AR, Chuyan AO. Acidity Values during Regeneration of Soft Tissues. Bulletin of the Voronezh Institute of High Technologies. 2016;17(2):17–22] (in Russian).
3. Галимов О.В., Туйсин С.Р., Закиев Т.З., Закиева И.В., Садькова А.Ф., Богданов И.В., Пономарев В.Н. Биохимические механизмы заживления ран. Башкирский химический журнал. 2008;15:82–3 [Galimov OV, Tuisin SR, Zakiev TZ, Zakieva IV, Sadykova AF, Bogdanov IV, Ponomarev VN. Biochemical mechanisms of wound healing. Bashkir chemistry journal. 2008;15:82–3] (in Russian).
4. Глухов А.А., Семенов С.Н., Алексеева Н.Т., Остроушко А.П. Гистохимический анализ репаративных процессов в асептических экспериментальных ранах при использовании гидроимпульсной санации и тромбо-цитарного концентрата. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2010;3(4):368–72. [Glukhov AA, Semenov SN, Alekseeva NT, Ostroushko AP. Histochemical Analysis of the Reparative Processes in the Aseptic Experimental Wounds Under Hydroimpulse Renovation and the Platelet Concentrate Usage. Bulletin of Experimental and Clinical Surgery. 2010;3(4):368–72] (in Russian).
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.; 1980 [Lakin G.F. Biometriya. Moscow; 1980] (in Russian).
6. Макаrchук А.И. Общие свойства и гетерогенитет субпопуляций фибробластов кожи. Морфология. 2007;1(3):12–20 [Makarchuk AI. The Common Properties and the Heterogeneity of Dermal Fibroblast Subpopulations. Morphologia. 2007;1(3):12–20] (in Russian).

7. Никитюк Д.Б., Клочкова С.В., Алексеева Н.Т. Морфологические особенности репаративной регенерации кожи под влиянием региональных факторов. Морфология. 2018;3(153):200–1 [Nikityuk DB, Klochkova SV, Alekseeva NT. Morphological features of reparative skin regeneration under the influence of regional factors. Morphology. 2018;3(153):200–1] (in Russian).
8. Снедекор Дж.У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М.; 1961 [Snedekor Dzh.U. Statisticheskie metody v primeneni k issledovaniyam v sel'skom khozyaistve i biologii. Moscow; 1961] (in Russian).
9. Ali S, Yosipovitch G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. Acta Dermato Venereologica. 2013;93(3):261–7. doi: 10.2340/00015555-1531
10. Fife CE, Carter MJ, Walker D. Wound Care Outcomes and Associated Cost Among Treated in US Outpatient Wound Centers: Data From the US Wound Registry. Patients Wounds. 2012;24(1):10–17.
11. Gethin G. Understanding the inflammatory process in wound healing. British Journal of Community Nursing. 2012 Mar;17(Sup3):S17–22. doi: 10.12968/bjcn.2012.17.sup3.s17
12. Koeber A. The lowering of pH values in chronic wounds by application of CADESORB. World Congress Clinical Abstracts. Stuttgart. 2005:3–5.
13. Nagoba BS, Selkar SP, Wadher BJ, Gandhi RC. Acetic acid treatment of pseudomonal wound infections – A review. Journal of Infection and Public Health. 2013 Dec;6(6):410–5. doi: 10.1016/j.jiph.2013.05.005
14. Percival SL, McCarty S, Hunt JA, Woods EJ. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. Wound Repair and Regeneration. 2014 Feb 24;22(2):174–86. doi: 10.1111/wrr.12125
15. Schafer FQ, Buettner GR. Acidic pH amplifies iron-mediated lipid peroxidation in cells. Free Radical Biology and Medicine. 2000 Apr;28(8):1175–81. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00319-1
16. Schmid-Wendtner M-H., Korting HC. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. Skin Pharmacology and Physiology. 2006;19(6):296–302. doi: 10.1159/000094670
17. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? Archives of Dermatological Research [Internet]. 2007 Feb 1;298(9):413–20. doi: 10.1007/s00403-006-0713-x

Поступила в редакцию 12.10.2020  
Принята в печать 18.01.2021

Received 12.10.2020  
Accepted 18.01.2021

Для цитирования: Андреев А.А., Ульянов И.А., Торгун П.М., Глухов А.А., Алексеева Н.Т. Кариометрические показатели фибробластов кожи в ранние сроки заживления ран. Журнал анатомии и гистопатологии. 2021; 10(1): 92–96. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-1-92-96

For citation: Andreev A.A., Ulyanov I.A., Torgun P.M., Glukhov A.A., Alexeeva N.T. Karyometric Parameters of Skin Fibroblasts in the Early Stages of Wound Healing. Journal of Anatomy and Histopathology. 2021; 10(1): 92–96. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-1-92-96