

УДК: 615.361:612.689;632.118.7:57.085.2

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА МОРФОЛОГИЮ КОЖИ КРЫСШ.О. КОРЖАВОВ, Э.У. ХУСАНОВ, М.М. ЮСУПОВ, Н.А. МУХАММАДОВ, О.Т. ШОДМОНОВ
Самаркандский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Самарканд**КАЛАМУШ ТЕРИСИ МОРФОЛОГИЯСИГА КИНДИК ҚОНИ ҲУЖАЙРАЛАРИ ПРЕПАРАТЛАРИНИНГ ТАЪСИРИ**Ш.О. КОРЖАВОВ, Э.У. ХУСАНОВ, М.М. ЮСУПОВ, Н.А. МУХАММАДОВ, О.Т. ШОДМОНОВ
Самарканд давлат медицина институти, Ўзбекистон Республикаси, Самарканд**INFLUENCE OF CELLULAR PREPARATIONS OF CORD BLOOD ON MORPHOLOGY OF SKIN OF RATS**SH.O. KORZHAVOV, E.U. KHUSANOV, M.M. YUSUPOV, N.A. MUKHAMMADOV,
O.T. SHODMONOV

Samarkand State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Samarkand

Бизнинг илмий ишимизда ҳар хил босқичларда in vitro шароитида тери морфологиясига киндик қони таркибидаги эмбрионал ҳужайраларнинг таъсир характери ҳамда ушбу қон таркибидаги устунли ҳужайраларнинг in vivo шароитидаги экспериментал гипотиреоздаги терининг морфофункционал ҳолатига таъсири ҳам ўрганилган. Киндик қони таркибидаги устун ҳужайраларининг териға, дермага терапевтик мақсадларда қўлланилиши бу ҳозирги кунда – ижобий натижа берувчи усул сифатида тушунтирилади.

Калит сўзлар: киндик қони, тери, каламуш, эпидермис.

In work studied character of the influence of the cryopreserved nucleated cells of cord blood on the skin morphology was investigated on the different stages of skin cultivation in vitro and character of the influence stem cells of cord blood on morphofunctional condition of a derma in conditions of an experimental hypothyroidism in vivo. The application of cord blood stem cells is perspectives as therapeutic treatment of derma.

Key words: cord blood, skin, rats, epidermis.

Актуальность. Кожа, как самый крупный орган в организме человека и животных, является не только «ареной борьбы» с различными микроорганизмами и вредными воздействиями, но и зеркалом, отражающим общее состояние здоровья организма. Эндокринная система играет ведущую роль в регуляции функционирования кожи, обеспечивая обмен веществ в этом органе, его репарацию и восстановление утрачиваемых элементов, функционирование желез и рост волос. Наиболее важным влиянием на функционирование кожи обладают гормоны щитовидной железы [2, 3].

Тиреоидные гормоны играют главную роль в обеспечении метаболизма и необходимы для нормального роста и развития кожи. Основным механизмом действия тиреоидных гормонов является стимуляция синтеза белков в цитоплазме клеток и повышение уровня потребления тканями кислорода. Развивающиеся при хроническом гипотиреозе нарушения структуры дермы проявляются изменениями волосяного покрова, функциональными изменениями потовых и сальных желез, сухостью кожи, повышенным слущиванием эпидермиса, нарушениями основных способностей кожных покровов в осуществлении физиологических, иммунных и биохимических функций [3, 5].

Известно, что для стимуляции процессов репарации, поврежденной или регенерации стареющей, утратившей тургор и эластичность кожи в последнее время все чаще используют биологически активные препараты – плаценту, ее экстракты, клеточные суспензии [7,10]. Однако механизм действия этих препаратов изучен недостаточно. Клетки пуповинной крови (КК) изначально использовали для лечения заболеваний системы крови, однако в последнее время в связи с открытием в пуповинной крови плюрипотентных стволовых клеток (СК) и стволовых мезенхимальных клеток, кордовая кровь рассматривается как потенциальный источник для клеточной терапии при широком спектре заболеваний [9]. В этой связи возникают теоретические предпосылки для использования препаратов КК в процессах регенерации кожи крыс как в системе in vitro, так и при дерматопатологии, вызванной экспериментальным гипотиреозом (ЭГт).

Целью работы было изучение влияния криоконсервированных ядерных клеток пуповинной крови человека на морфологию кожи крыс in vitro и in vivo.

Материал и методы исследования. Объектом исследования в экспериментах in vitro являлись образцы кожи крыс. Фрагменты кожи размером 0,3 x 0,3 см помещали на твердый агар,

затем покрывали стандартной культуральной ростовой средой в объеме 0,5 мл. При постановке эксперимента материал распределяли на следующие группы: 1-я группа – интактная кожа; 2-я – (контрольная) – образцы кожи, помещенные на поверхность агара с культуральной средой; 3-я – (опыт) – образцы кожи, помещенные на поверхность агара с культуральной средой, в которую добавляли 10% препарата пуповинной крови. Препарат пуповинной крови «Стемкорд» представлял собой криоконсервированную взвесь стволовых клеток (СК) в концентрации $(1-3)10^5$ в 1 мл плазмы КК, богатой биологически активными веществами, факторами роста, гормонами, цитокинами, микроэлементами [1]. Исследования ядродержащих клеток (CD45+) пуповинной крови, в том числе и гемопоэтических (CD34+), проведены до и после криоконсервирования методом проточной цитометрии по международному ISHAGE протоколу [1]. Культивирование кожи выполняли *in vitro* в условиях термостата при температуре 37 °C и pH среды 7,2. Фрагменты кожи исследовали на 5, 15 и 25 сутки культивирования. Материалом исследования в экспериментах *in vivo* служили самки беспородных белых крыс 4-месячного возраста массой тела 110-120 г. Работа с животными осуществлялась с соблюдением положения Европейской конвенции по охране позвоночных животных и национального законодательства по гуманному обращению с животными. Субтотальную тиреоидэктомию (100%-ное удаление щитовидной железы) выполняли по методу Легач [5]. В эксперименте были задействованы животные, подвергшиеся тиреоидэктомии и последующему введению препарата КК в хвостовую вену [8]. Все эксперименты проводились в течение первых 40 дней с момента тиреоидэктомии, учитывая динамику восстановления тиреоидных гормонов в крови подопытных животных [3,8].

Животные составили следующие экспериментальные группы:

группа 1-ЭГт – тиреоидэктомированные животные;

группа 2-ЭГт - тиреоидэктомированные животные, которым вводили препарат КК.

Каждая группа состояла из 10 животных. Контролем служили интактные животные. Для изготовления гистологических препаратов иссеченные на всю толщину участки кожи из области спины и культивируемые фрагменты кожи фиксировали в 10%-ном формалине, промывали проточной водой, подвергали обезвоживанию в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин-целлоидин. Полученные из парафин-целлоидиновых блоков микротомные срезы толщиной 5-7 микрон окра-

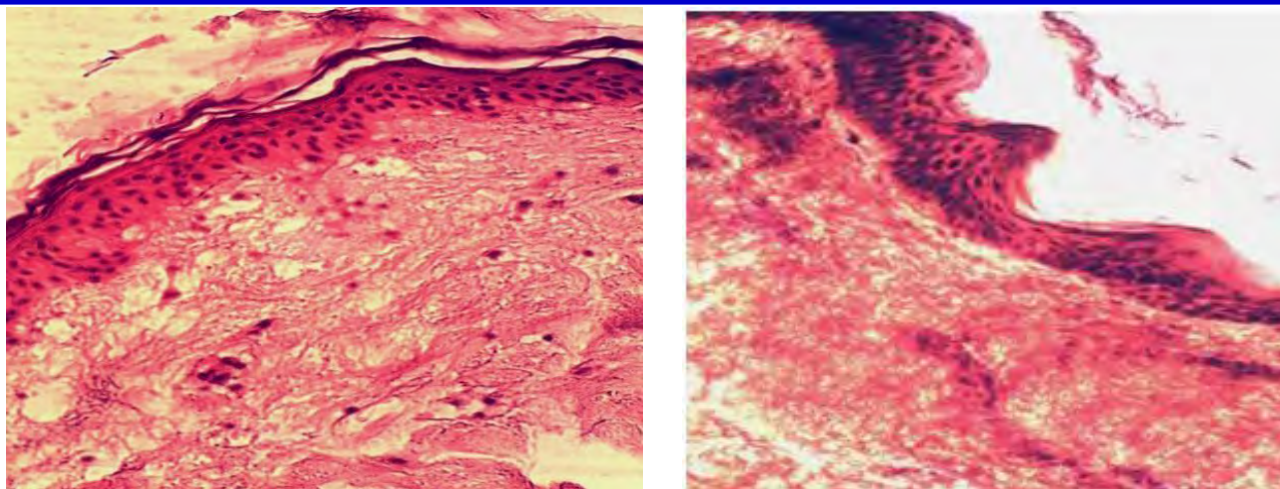
шивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов, а также - пикрофуксином по методу Ван Гизон для изучения соединительной ткани [6]. Дифференцировку препаратов проводили под световым микроскопом «Биолам» при увеличении $\times 400$. Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера [4].

Результаты исследования и их обсуждение. В первой серии экспериментов в культуре *in vitro* на гистологических препаратах структура интактной кожи соответствовала норме и была представлена хорошо дифференцируемыми слоями – эпидермисом и дермой. После 5 суток культивирования фрагментов кожи контрольной группы на агаризованной ростовой среде наблюдалось уменьшение толщины эпидермиса за счет снижения количества клеток в его слоях (кератинизация и миграция клеток). Отмечалась сглаженность дермоэпидермальной границы, расширялись эпидермальные выросты. В сосочковом слое дермы наблюдалась пролиферация фибробластов, их количество увеличивалось по сравнению с интактной кожей. В сетчатом слое дермы появлялись молодые коллагеновые волокна, которые интенсивно окрашивались, увеличивалось количество клеток в волосяных фолликулах и железистых структурах (рис. 1, а).

Во фрагментах кожи, выращенных на агаризованной питательной среде, в которую был добавлен препарат «Стемкорд» (группа 3), на 5-е сутки культивирования структура эпидермиса была сравнима с интактной. Базальный слой содержал один ряд клеток. Дермоэпидермальная граница в основном контурировалась хорошо, однако местами наблюдалось отслоение эпидермиса от дермы в области базальной мембраны. Коллагеновые волокна образовывали плотную сеть, количество фибробластов увеличивалось по сравнению с группами 1 и 2 (рис. 1, б).

На 15-е сутки культивирования фрагментов кожи без препарата уменьшалась толщина эпидермиса по сравнению с интактной кожей. Дермоэпидермальная граница контурировалась нечетко. Структура соединительнотканых волокон дермы соответствовала интактной коже. Количество фибробластов увеличивалось.

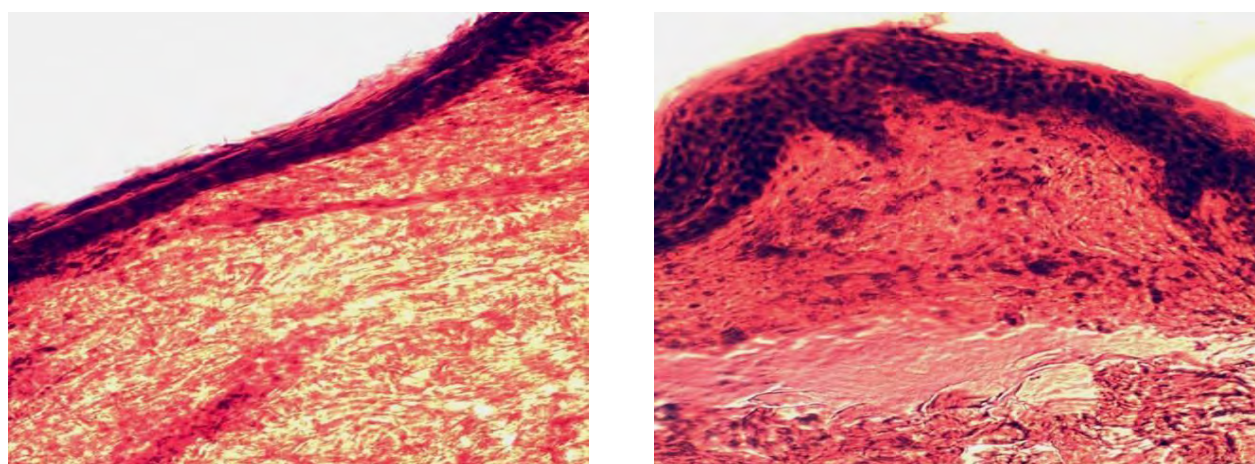
В волосяных фолликулах и сальных железах наблюдалась пролиферация эпителиальных клеток, размеры которых были увеличены (рис. 2, а). В присутствии препарата «Стемкорд» на 15-е сутки культивирования кожи толщина эпидермиса по сравнению с группой 2 увеличивалась, однако дифференциация его клеточных слоев была затруднена, в базальном слое обнаруживались клетки в состоянии митоза.



а.

б.

Рис. 1. Кожа в культуре *in vitro* на 5 сутки. а - на агаризованной питательной среде; б - на агаризованной питательной среде с добавлением препарата «Стемкорд». Окраска г.-э. Ув. $\times 400$



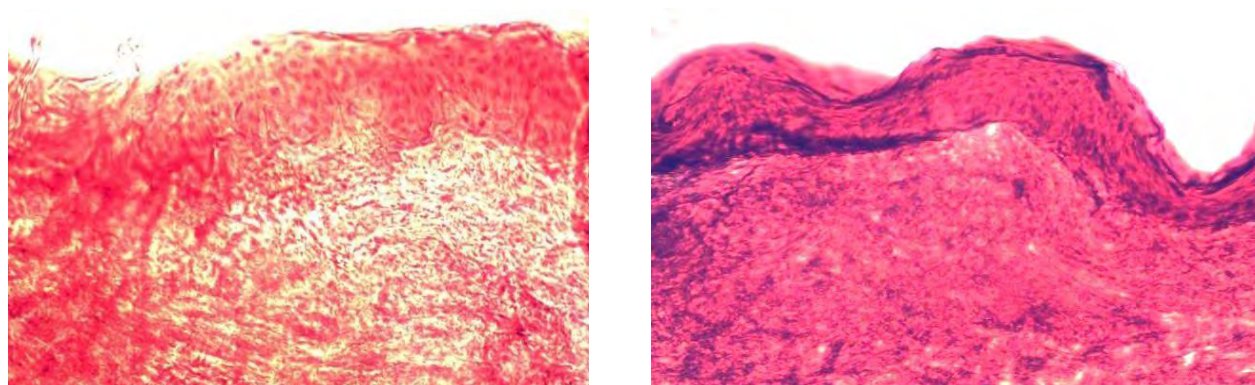
а.

б.

Рис. 2. Кожа в культуре *in vitro* на 15 сутки. а - на агаризованной питательной среде; б - на агаризованной питательной среде с добавлением препарата «Стемкорд» Окраска г.-э. Ув. $\times 400$

Клетки базального слоя эпидермиса имели выраженную базофилию (ядра гиперхромные, занимающие почти всю клетку, цитоплазма – ацидофильная). Дермоэпидермальная граница контурировалась. В дерме, непосредственно в сосочковом слое, увеличивалось количество фиб-

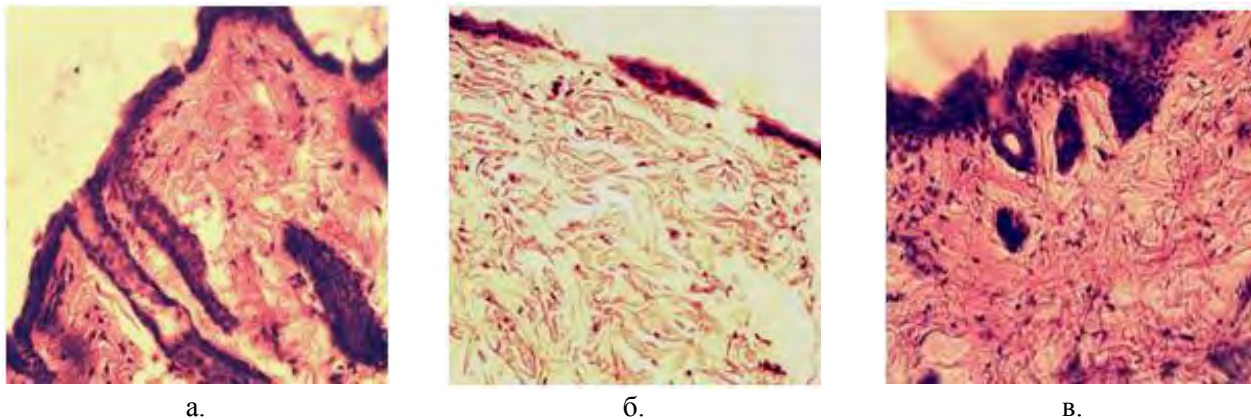
робластов по сравнению с их содержанием в коже групп 1 и 2. Соединительная ткань была представлена плотно упакованными пучками коллагеновых волокон, фибробласты гиперхромные (рис. 2, б).



а.

б.

Рис. 3. Кожа в культуре *in vitro* на 25 сутки. а - на агаризованной питательной среде; б - на агаризованной питательной среде с добавлением препарата «Стемкорд» Окраска г.-э. Ув. $\times 400$



а.

б.

в.

Рис. 4. Кожа крыс экспериментальных групп: а – интактные животные; б – животные с моделированным гипотиреозом через 1 мес; в – тиреоидэктомизированные животные, которым вводили препарат КК. Окраска г.-э. Ув. $\times 400$

На 25-е сутки культивирования на агаризованной среде без препарата в коже появлялись очаги микронекроза. В эпидермисе увеличивались межклеточные пространства, плохо дифференцировались слои клеток. Ядра эпителиальных клеток были пикнотичны, цитоплазма – вакуолизирована. Отмечалась стертость границы между эпидермисом и дермой, наблюдались очаги клеточного детрита. В дерме происходила дезорганизация соединительной ткани в виде гомогенизации и глыбчатого распада коллагеновых и эластиновых волокон. Количество фибробластов уменьшалось. Наблюдались отеки и деструкция железистых структур и волосяных фолликулов (рис. 3, а). При культивировании фрагментов кожи в среде с добавлением препарата «Стемкорд» на 25-е сутки некротические процессы как в эпидермисе, так и в дерме не отмечались. Толщина эпидермиса сохранялась на уровне 15-х суток, причем базальный слой оставался активным, отмечалось увеличение количества сливающихся роговых чешуек.

Граница между эпидермисом и дермой была четко выражена. В дерме сохранялась высокая клеточность, хотя количество фибробластов уменьшалось по сравнению с 15 сутками культивирования. В сетчатом слое четко контурировались коллагеновые и эластиновые волокна, которые формируют сетчатую структуру соединительной ткани, однако их плотность уменьшалась по сравнению с 15 сутками культивирования, а в некоторых участках кожных фрагментов сохранялась плотная структура соединительной ткани. Дериваты кожи – волосяные фолликулы и сальные железы – сохраняли свою структуру, хорошо контурировались. В отдельных участках кожных фрагментов отмечались отслоение эпидермиса и микроочаги клеточного детрита (рис. 3, б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат КК «Стемкорд» стимулирует пролиферативную активность клеток дермы и эпидермиса *in vitro*.

В экспериментах *in vivo* при гистологическом исследовании кожи тиреоидэктомизированных животных (группа 1-ЭГт) через 1 месяц после моделирования гипотиреоза обнаруживалось, что эпидермис очень истончен, уплощен, отсутствует его нормальная складчатость. Слои эпидермиса не дифференцируются, некоторые клетки имеют пикнотичные ядра. В собственно дерме сосочковый и сетчатый слои также не дифференцируются. Соединительнотканная часть дермы представляет собой разрыхленные, фрагментированные и контурно измененные пучки коллагеновых и эластических волокон, среди которых находится уменьшенное, по сравнению с нормой, количество фибробластических клеток с плотными ядрами. Дериваты кожи – сальные железы и волосяные фолликулы – встречаются редко, они уменьшены в размерах, ядра их клеток пикнотичны (рис. 4б).

Кожа тиреоидэктомизированных животных, которым через 1 месяц после операции вводили препарат КК (группа 2-ЭГт), иссекалась у животных под эфирным наркозом спустя 7 суток. При гистологическом исследовании обнаруживался новообразованный эпидермис, который был утолщен по сравнению с нормой. В нем обнаруживалась складчатость и дифференцировка клеток с формированием характерных слоев. Клетки фибробластического ряда, количество которых было увеличено по сравнению с нормой, в большинстве случаев располагались параллельно новообразованным пучкам коллагеновых волокон, формирующих дерму, трещин и щелей между ними не обнаружено (рис. 4в). В собственно дерме, особенно в глубоких ее отделах, обнаруживались растущие волосяные фолликулы. На границе дермы и подкожной ткани наблюдалось разрастание мелких кровеносных сосудов и капилляров, а также – фибробластических клеточных элементов, вероятно произошедших из перицитов (периваскулярных клеток мезенхимального проис-

хождения, служащих главными предшественниками фибробластов).

Результаты гистологического исследования в эксперименте *in vivo* показывают, что характер восстановительных процессов в коже животных с экспериментальным гипотиреозом при введении препарата КК имеет выраженную тенденцию к полной регенерации утраченных морфофункциональных свойств кожи. По нашему мнению, основным механизмом, обеспечивающим восстановительные процессы в коже как *in vitro*, так и *in vivo*, является введение биогенных стимуляторов, присутствующих в плазме КК, которые участвуют в нормализации метаболизма в организме, и определенного количества стволовых, в том числе и мезенхимальных, клеток, стимулирующих рост капилляров и фибробластов.

Заключение. Препарат КК «Стемкорд», добавленный в агаризованную питательную среду культивирования, стимулирует пролиферативную активность клеток дермы и эпидермиса *in vitro*. В эксперименте *in vivo* характер восстановительных процессов в коже животных с экспериментальным гипотиреозом при введении препарата КК «Стемкорд» имеет выраженную тенденцию к полной регенерации утраченных кожей морфофункциональных свойств. Применение препаратов пуповинной крови как при культивировании фрагментов кожи *in vitro*, так и в условиях экспериментального гипотиреоза можно рассматривать как перспективный фактор воздействия на течение и последствия эндокринных нарушений всего организма и кожи, в частности.

Литература:

1. Бабийчук Л. А. Новые перспективы в криоконсервировании ядросодержащих клеток пуповинной крови / Л. А. Бабийчук, О. В. Кудокочева, В. В. Рязанцев // Гематологія і переливання крові. – 2008. № 34. – С. 17-21.
2. Калюжная Л., Дзюбак В. Старение кожи: патогенетические и лечебные аспекты / Л. Калюжная, В. Дзюбак // Укр. мед. часопис. – 2010. – № 2 (28). – С. 68-72.
3. Кандрор В. Физиологические эффекты тиреоидных гормонов и механизм их действия // Руководство по клинической эндокринологии: статья / В. Кандрор. – Питер, 2011. – С. 120-124.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия / Лакин Г. Ф. – М.: Высш. школа, 2010. – 352 с.

5. Легач Е. И. Ретроградный способ тиреоидэктомии крыс как адекватная модель гипотиреоза / Е. И. Легач // Трансплантология. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 92-94.
6. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / Меркулов Г. А. – Ленинград, 2008. – 340 с.
7. Озерская О. Экспериментальные подходы к обоснованию применения клеточных композиций на основе фибробластов в дерматокосметологии / О. Озерская, В. Щеголев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, № 2. – С. 66-67.
8. Применение препаратов пуповинной крови и общей экстремальной аэрокриотерапии для восстановления нарушений дермы, вызванных хроническим гипотиреозом / В. Ю. Пурешева, И. И. Ломакин, О. В. Кудокочева [и др.] // Трансплантология. – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 100-103.
9. Стволовые клетки. Биология и потенциальное клиническое использование / Н. Я. Спивак, Г. Т. Сухих, В. В. Малайцев и др. // Трансплантология. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 6-14.
10. Scott D. W. Miller and Kirk 's small animal dermatology / Scott D. W., Miller W. H., Griffin C. E. - 5th ed. - Philadelphia etc.: W/B/Saunders Company, 2010. - 1213 p.

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА МОРФОЛОГИЮ КОЖИ КРЫС

Ш.О. КОРЖАВОВ, Э.У. ХУСАНОВ,
М.М. ЮСУПОВ, Н.А. МУХАММАДОВ,
О.Т. ШОДМОНОВ

Самаркандский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Самарканд

В работе изучен характер влияния криоконсервированных зародышевых клеток пуповинной крови на морфологию кожи на разных этапах культивирования кожи *in vitro* и характера влияния стволовых клеток пуповинной крови на морфофункциональное состояние дермы в условиях экспериментального гипотиреоза *in vivo*. Применение стволовых клеток пуповинной крови - это перспективы в качестве терапевтического лечения дермы.

Ключевые слова: пуповинная кровь, кожа, крыса, эпидермис.