

INFLUENCE OF CELLULAR PREPARATIONS OF CORD BLOOD ON MORPHOLOGY OF SKIN

**Khusanov E.U.¹, Ismoilov O.I.², Korzhavov Sh.O.³, Rakhmonov Z.M.⁴,
Mukhammadov N.A.⁵ (Republic of Uzbekistan)**

Email: Khusanov514@scientifictext.ru

¹*Khusanov Erkin Uktamovich - Candidate of Medical Sciences,
Associate Professor;*

²*Ismoilov Ortik Ismoilovich - Candidate of Medical Sciences, Associate Professor;*

³*Korzhavov Sherali Oblakulovich – Assistant;*

⁴*Rakhmonov Zafarzhon Mamadievich – Assistant;*

⁵*Muhammadov Nuriddin Askarovich – Assistant,*

**DEPARTMENT OF HUMAN ANATOMY OPERATIVE SURGERY AND
TOPOGRAPHIC ANATOMY,
SAMARKAND STATE MEDICAL INSTITUTE,
SAMARKAND, REPUBLIC OF UZBEKISTAN**

Abstract: *the nature of the influence of cryopreserved umbilical cord blood cells on skin morphology at different stages of in vitro skin cultivation and the nature of the influence of cord blood stem cells on the morphological and functional state of the dermis under experimental in vivo hypothyroidism were studied. The results of a histological study in an in vivo experiment show that the nature of the restoration processes in the skin of animals with experimental hypothyroidism with the introduction of the preparation KK has a pronounced tendency to complete regeneration of the lost morphofunctional properties of the skin. In our opinion, the main mechanism providing restoration processes in the skin both in vitro and in vivo is the introduction of biogenic stimulators present in the plasma of CK, which are involved in the normalization of metabolism in the body, and a certain amount of stem, including mesenchymal, cells that stimulate the growth of capillaries and fibroblasts. The preparation KK "Stemkord", added to an agarized culture medium, stimulates the proliferative activity of dermal and epidermal cells in vitro. In an in vivo experiment, the nature of the restoration processes in the skin of animals with experimental hypothyroidism with the administration of the KK "Stemkord" preparation has a pronounced tendency to complete regeneration of the morphofunctional properties lost by the skin.*

Keywords: *cord blood, skin, morphology, epidermis.*

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА МОРФОЛОГИЮ КОЖИ

**Хусанов Э.У.¹, Исmoilов О.И.², Коржавов Ш.О.³, Рахмонов З.М.⁴,
Мухаммадов Н.А.⁵ (Республика Узбекистан)**

¹*Хусанов Эркин Уктамович - кандидат медицинских наук, доцент;*

²*Исmoilов Ортик Исmoilович - кандидат медицинских наук, доцент;*

³*Коржавов Шерали Облакулович – ассистент;*

⁴Рахмонов Зафаржон Мамадиевич - ассистент;

⁵Мухаммадов Нуриддин Аскарлович – ассистент.

кафедра анатомия человека и оперативной хирургии и топографической анатомии,,

Самаркандский государственный медицинский институт,

г. Самарканд, Республика Узбекистан

Аннотация: в работе изучен характер влияния криоконсервированных зародышевых клеток пуповинной крови на морфологию кожи на разных этапах культивирования кожи *in vitro* и характер влияния стволовых клеток пуповинной крови на морфофункциональное состояние дермы в условиях экспериментального гипотиреоза *in vivo*. 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. 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.

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

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].

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 0,3×0,3 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 С и рН 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 [5]. В эксперименте были задействованы животные, подвергшиеся

тиреоидэктомии и последующему введению препарата КК в хвостовую вену [8]. Все эксперименты проводились в течении 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 окрашивали 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 [11,12]. 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).

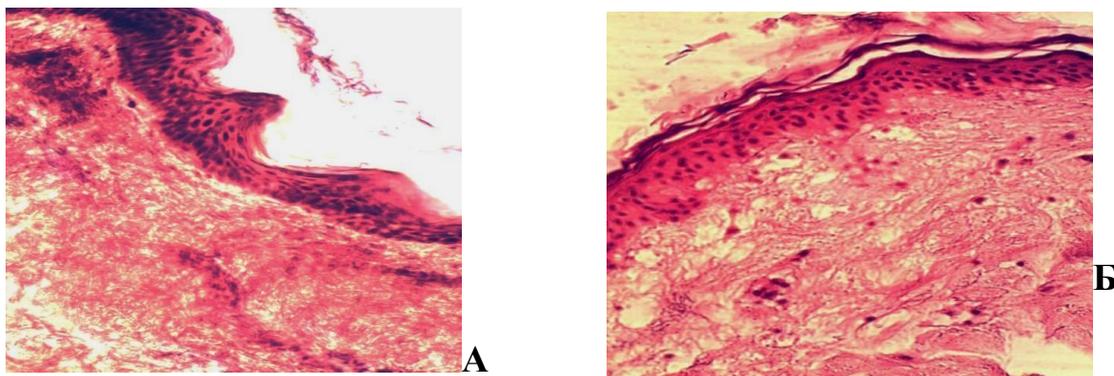


Рис. 1. Кожа в культуре in vitro на 5 сутки. а - на агаризованной питательной среде; б - на агаризованной питательной среде с добавлением препарата «Стемкорд». Окраска г.-э. Ув. ×400

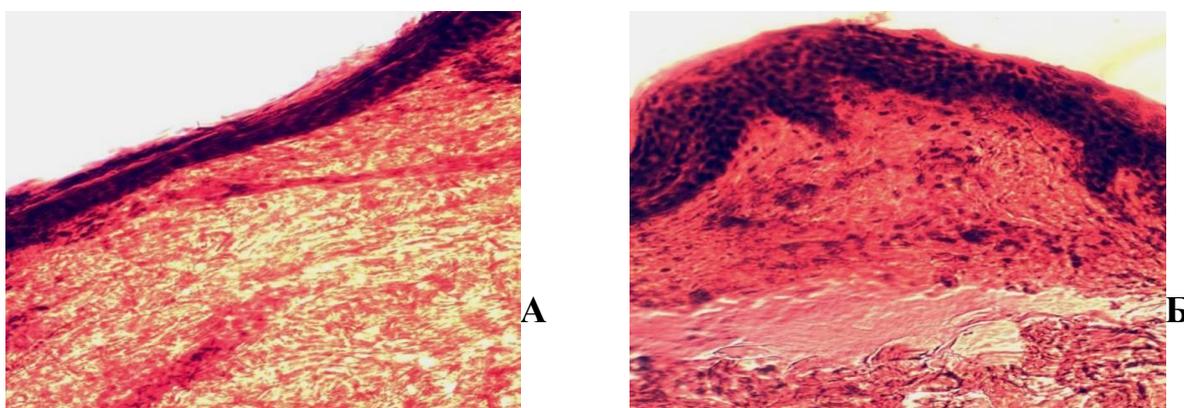


Рис. 2. Кожа в культуре in vitro на 15 сутки. А - на агаризованной питательной среде; Б - на агаризованной питательной среде с добавлением препарата «Стемкорд» Окраска г.-э. Ув. ×400

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. 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 фибробластов 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).

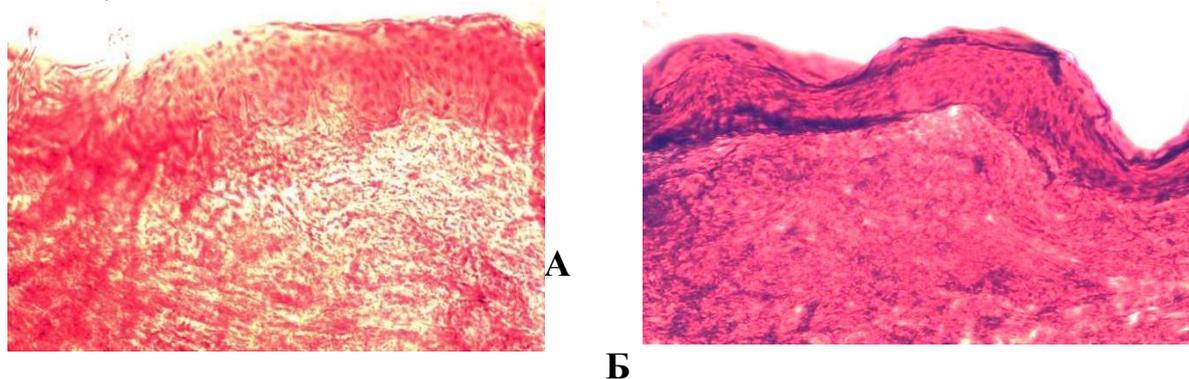


Рис. 3. Кожа в культуре in vitro на 25 сутки. А - на агаризованной питательной среде; Б - на агаризованной питательной среде с добавлением препарата «Стемкорд» Окраска г.-э. Ув. ×400

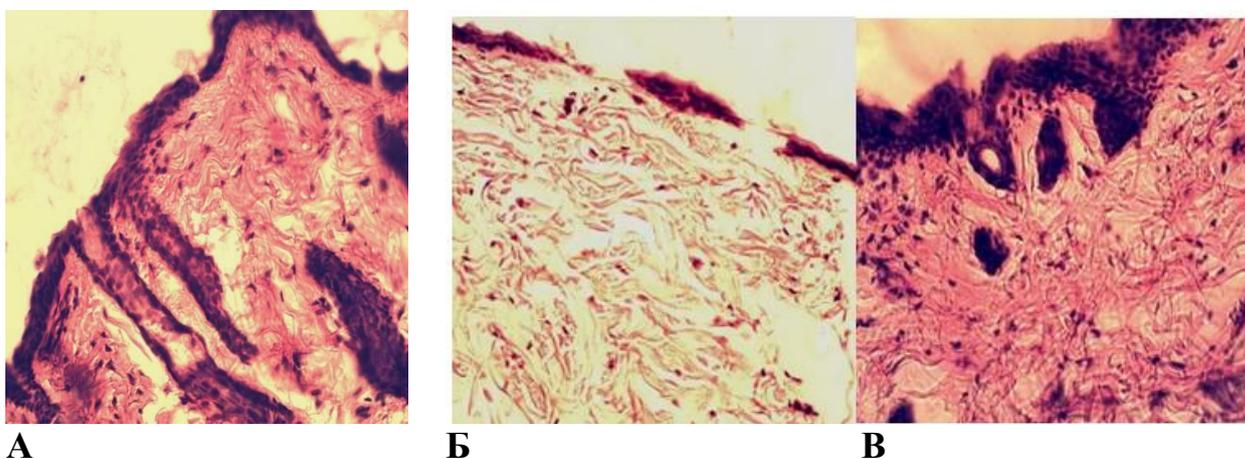


Рис. 4. Кожа крыс экспериментальных групп: А – интактные животные; Б – животные с моделированным гипотиреозом через 1 мес; В - тиреоидэктомизированные животные, которым вводили препарат КК. Окраска г.-э. Ув. ×400

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 тиреоидэктомированных 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 [13,14]. Дериваты кожи – сальные железы и волосяные фолликулы – встречаются редко, они уменьшены в размерах, ядра их клеток пикнотичны (рис. 4б).

Кожа тиреоидэктомированных 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 происхождения, 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.

Список литературы / References

1. *Гариб Ф.Ю. и др.* Иммунозависимые болезни. Ташкент. 1996.
2. *Зайниев С.С.* Ультраструктура костной ткани при хроническом рецидивирующем гематогенном остеомиелите у детей //Bulletin of Experimental & Clinical Surgery, 2016. Т. 9. № 1.
3. *Коржавов Ш.О. и др.* Динамика заживления ран у крыс на модели термического ожога кожи с коррекцией производными хитозана //International Scientific and Practical Conference World science. ROST, 2017. Т. 5. № 6. С. 38-39.
4. *Коржавов Ш.О. и др.* Развитие микроциркуляторного русла аффлекторов кожи в постнатальном онтогенезе //International Scientific and Practical Conference World science. ROST, 2017. Т. 5. № 5. С. 41-43.
5. *Коржавов Ш.О. и др.* Скрининговая оценка протекторных свойств лекарственных препаратов при воздействии ультрафиолета на кожу крыс //Здоровье, демография, экология финно-угорских народов health, demography, ecology. С. 43.
6. *Маматалиев А.Р., Хусанов Э.У.* Морфология интрамурального нервного аппарата гастрохоледоходуоденальной зоны после экспериментальной холецистэктомии //Морфология, 2008. Т. 133. № 2. С. 82b-82b.
7. *Орипов Ф.С., Дехканов Т.Д., Блинова С.А.* Функциональная морфология апудоцитов тощей кишки кроликов при антенатальном воздействии пестицидом //Здоровье, демография, экология финно-угорских народов, 2015. № 4. С. 41-42.
8. *Тошмаматов Б.Н. и др.* Макроскопическое строение илеоцекальной заслонки у кроликов //International Scientific and Practical Conference World

- science. ROST, 2017. Т. 5. № 5. С. 58-59.
9. Хусанов Э.У., Коржавов Ш.О., Ортикбаева Н.Т. Морфологическая картина дегрануляции апудоцитов гастродуоденальной зоны при экспериментальном голодании //International Scientific and Practical Conference World science. ROST, 2017. Т. 5. № 5. С. 59-61.
 10. Хусанов Э.У., Дехканов Т.Д. Сравнительная морфология иммунных структур двенадцатиперстной кишки //Аллергология и иммунология, 2007. Т. 8. № 1. С. 26-26.
 11. Пак Е.А., Мавлянова З.Ф., Ким О.А. Показатели состояния сердечно-сосудистой системы у детей, занимающихся каратэ //Спортивная медицина: наука и практика, 2016. Т. 6. № 1. С. 21-25.
 12. Тешаев Ш.Ж. Реактивные изменения семенников крыс при воздействии которана и хлората магния //Морфология, 2004. Т. 126. № 4. С. 121.
 13. Тешаев Ш.Ж. Морфометрические показатели семенников крыс и их изменения при воздействии хлората магния и которана //Морфология, 2008. Т. 133. № 2. С. 133с-133с.
 14. Юсупов Ш.А. Влияние озона на морфологическую структуру брюшины при экспериментальном перитоните //Педиатрия, 2009. Т. 61. № 7.
 15. Шамсиев А.М., Атакулов Ж.А., Лёнюшкин А.М. Хирургические болезни детского возраста //Ташкент: Изд-во «Ибн-Сино», 2001.
 16. Шамсиев А.М., Хамраев А.Ж. Малая хирургия детского возраста. – O'qituvchi, 2006.
 17. Aminov Z., Haase R. & Carpenter D., 2011. The Effects of Polychlorinated Biphenyls on Lipid Synthesis. *Epidemiology*. 22 (1). S. 298-S299.
 18. Davlatov S.S., Kasimov S.Z. Extracorporeal technologies in the treatment of cholemic intoxication in patients with suppurative cholangitis //The First European Conference on Biology and Medical Sciences, 2014. С. 175-179.
 19. Indiaminov S.I. Morphological features of the human brain in different variants of fatal blood loss on the background of alcohol intoxication //Herald of Russian State Medical University. Moscow, 2011. № 5. С. 63-66.
 20. Jamshid S., Ravshan S. Accompanying defects of development in children with congenital cleft of lip and palate //European science review, 2017. № 1-2.
 21. Malik A. et al. Hypertension-related knowledge, practice and drug adherence among inpatients of a hospital in Samarkand, Uzbekistan //Nagoya journal of medical science, 2014. Т. 76. № 3-4. С. 255.
 22. Minaev S.V. et al. Laparoscopic treatment in children with hydatid cyst of the liver //World journal of surgery, 2017. Т. 41. № 12. С. 3218-3223.
 23. Kasimov S. et al. Haemosorption in complex management of hepatargia //The International Journal of Artificial Organs, 2013. Т. 36. № 8.
 24. Slepov V.P. et al. Use of ethonium in the combined treatment of suppurative and inflammatory diseases in children //Klinicheskaja khirurgiia. – 1981. № 6. С. 78.
 25. Sayit I. Damages to hypothalamus vessels in various types of blood loss on the background of acute alcohol intoxication //European science review, 2016. № 7-8.

26. *Zayniev S.S.* Ultrastructure of the Bone Tissue in Chronic Recurrent Hematogenous Osteomyelitis in Children //Journal of Experimental and Clinical Surgery, 2016. Т. 9. № 1. С. 53-57.
27. *Shamsiev A.M., Zayniev S.S.* Комп'ютерно-томографічна семіотика хронічного рецидивного гематогенного остеомієліту //Вісник наукових досліджень, 2017. № 4.
28. *Shamsiyev A., Davlatov S.* A differentiated approach to the treatment of patients with acute cholangitis //International Journal of Medical and Health Research, 2017. С. 80-83.
29. *Shamsiev A.M., Yusupov S.A., Shahriev A.K.* Ефективність ультразвукової сонографії при апендикулярних перитонітах у дітей //Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 2016. Т. 26. № 2.