

Влияние препарата кордовой крови на морфофункциональные свойства кожи крыс в культуре *in vitro*

UDC 615.361:612.649;612.118.7:57.085.2

V.YU. PURYSHEVA*, O.V. KUDOKOTSEVA, V.V. VOLINA, L.V. SOKOL

Effect of Cord Blood Preparation on Morphofunctional Properties of Rat's Skin During *In Vitro* Culturing

Изучали характер влияния криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови на морфологию кожи в разные сроки культивирования *in vitro*. Под влиянием препарата кордовой крови на 15 дней продлевалась жизнеспособность кожи *in vitro* по сравнению с жизнеспособностью в контрольной группе, стимулировались пролиферация клеток эпидермиса и дермы, в дерме резко увеличивалось количество фибробластов и волокнистых структур, а также клеточных элементов дериватов кожи.

Ключевые слова: фрагменты кожи, кордовая кровь, культивирование *in vitro*.

Вивчали характер впливу криоконсервованих ядромісних клітин на морфологію шкіри в різні строки культивування *in vitro*. Під впливом кордової крові на 15 діб зростала тривалість життя шкіри *in vitro* у порівнянні з тривалістю життя шкіри в контрольній групі, стимулювалась проліферація клітин епідерміса та дерми, у дермі різко зростала кількість фібробластів і волокнистих структур, а також клітинних елементів дериватів шкіри.

Ключові слова: фрагменти шкіри, кордова кров, культивування *in vitro*.

The character of influence of the cryopreserved nucleated cells of cord blood on the skin morphology was investigated at different stages of skin culturing *in vitro*. Under the cord blood influence the period of skin's viability increased by 15 days as compared with the duration period of control skin viability, the proliferation activities of epidermocytes and dermocytes are stimulated in derma, the fibroblasts number and fibers structures sharply increased. The gland's structures were increased in derma under the cord blood influence. The cell number was increased in gland's and in hair follicles in derma when cord blood was added to culturing media.

Key-words: skin flaps, cord blood, culturing *in vitro*.

В свете современной концепции выделяют естественное и экзогенное старение кожи, проявляющееся в снижении скорости ее обновления за счет угнетения пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток [2].

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 [3, 4]. Однако механизм действия этих препаратов изучен недостаточно. Полученные результаты не всегда однозначны [3, 4].

Цель работы – изучение влияния криоконсервированных ядерных клеток кордовой крови человека на морфофункциональные процессы в культивируемой *in vitro* коже крыс.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись образцы кожи крыс. Фрагменты кожи размером 0,3×0,3 см отделяли скальпелем от подкожной жировой клетчатки,

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 (контроль) – 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 кордовой крови.

Препарат кордовой крови “Стемкорд” представляет собой криоконсервированную взвесь ядродержащих клеток (ЯСК). Криоконсервирование осуществляли по уникальной 4-этапной программе, что позволило снизить концентрацию криопротектора ДМСО до 3,5% и использовать препарат сразу после отогрева без предварительного отмывания от криопротектора [1]. Исследования ЯСК (CD45⁺) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических (CD34⁺), проведены до и после криоконсервирования методом проточной цитометрии по международному ISHAGE протоколу.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Культивирование кожи выполняли *in vitro* в условиях термостата при температуре 37°C и pH среды 7,2. Фрагменты кожи извлекали на 5, 15 и 25-е сутки культивирования, фиксировали в 10%-м формалине, заливали в целлоидин и готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Все манипуляции с животными выполняли согласно принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985).

Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

На гистологических препаратах структура интактной кожи соответствует норме и 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 увеличилось по сравнению с интактной кожей. В сетчатом слое дермы появились молодые коллагеновые волокна, которые интенсивно окрашивались, увеличилось количество клеток в волосяных фолликулах и железистых структурах.

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.

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.

В присутствии препарата “Стемкорд” на 15-е сутки культивирования кожи по сравнению с группой 2 увеличивалась толщина эпидермиса, 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.

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 – вакуолизована. 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. Наблюдалась отечность и деструкция железистых структур и волосяных фолликулов.

При культивировании фрагментов кожи в среде с добавлением препарата “Стемкорд” на 25-е сутки некротические процессы как в эпидермисе, так и в дерме не наблюдались. Толщина эпидермиса сохранялась на уровне 15-х суток, причем базальный слой оставался активным, отмечалось увеличение количества слущивающихся 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 железы – сохраняли свою морфологию, хорошо контурировались. В отдельных участках кожных фрагментов отмечались отслоение эпидермиса и микроочаги клеточного детрита.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии препарата “Стемкорд” в среде культивирования стимулируется пролиферативная активность клеток дермы и эпидермиса. При добавлении кордовой крови в культуральную

среду за счет находящегося в препарате комплекса клеточных и гуморальных факторов на 15 дней дольше сохранялось гистологическое строение образцов кожи по сравнению с контрольной группой, отмечались процессы активного клеточного обновления.

Установленный факт стимулирующего действия препарата “Стемкорд” на культивируемые *in vitro* эксплантаты кожи позволяет ожидать положительного эффекта при его использовании в регенерационной медицине и косметологии, при проведении мезотерапии для улучшения тургора и эластичности кожи.

Литература

1. *Бабийчук Л.А., Кудокоцева О.В., Рязанцев В.В. и др.* Новые перспективы в криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови // Гематология і переливання крові.– 2008.– №34.– С. 17–21.
2. *Калюжная Л.Д., Дзюбак В.Е.* Старение кожи: патогенетические и лечебные аспекты // Укр. мед. часопис.– 2002.– №2 (28).– С. 68–72.
3. *Спивак Н.Я., Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М.* Стволовые клетки. Биология и потенциальное клиническое использование // Трансплантологія.– 2005.– Т.8, №3.– С. 6–14.
4. *Morasso M.I., Tomic-Canic M.* Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing // Biol. Cell.– 2005.– Vol. 97, N3.– P. 173–183.

Поступила 19.06.2008