

UDK 615.361:615.451.1:618.58]:618.11-089.87-092.9:612.79

О.В. Фалько¹, Н.О. Шевченко^{1*}, В.В. Воліна¹, О.О. Терехова¹,
О.С. Прокопюк¹, А.І. Каверінська¹, В.Г. Карпенко³, В.Ю. Прокопюк^{1,2}

Кріоконсервований екстракт пуповини відновлює структуру шкіри оваріоектомованих щурів

UDC 615.361:615.451.1:618.58]:618.11-089.87-092.9:612.79

O.V. Falko¹, N.O. Shevchenko^{1*}, V.V. Volina¹, O.O. Terekhova¹,
O.S. Prokopyuk¹, A.I. Kaverinska¹, V.G. Karpenko³, V.Yu. Prokopyuk^{1,2}

Cryopreserved Umbilical Cord Extract Restores the Skin Structure in Ovariectomized Rats

Реферат: У роботі досліджували особливості дії кріоекстракту пуповини людини та середовища культивування її мезенхімальних стромальних клітин порівняно з синтетичною гіалуроновою кислотою на відновлення шкіри самиць щурів з моделюванням старіння. Зазначені речовини вводили оваріоектомованим тваринам внутрішньошкірно. Встановлено, що введення кріоекстракту пуповини людини тваринам з моделлю старіння шкіри приводило до відновлення структури шкіри вже через 2 тижні після ін'єкцій. Спостерігали потовщення епідермісу та дерми, явища проліферації клітин, збільшення кількості колагенових волокон, судин. Через 4 тижні після останньої ін'єкції відбувалася нормалізація стану шкіри до рівня інтактних тварин. Введення середовища культивування мезенхімальних стромальних клітин пуповини також приводило до збільшення кількості колагенових волокон, проліферації клітин, контуруванню шарів шкіри але мало менш виражений ефект при порівнянні з ін'єкціями кріоекстракту за показниками товщини дерми та епідермісу. Ін'єкції синтетичної гіалуронової кислоти приводили до «омолодження» верхніх шарів шкіри та мали менш виражений прояв порівняно з дією похідних пуповини людини.

Ключові слова: пуповина, кріоекстракт, кріоконсервування, щури, оваріоектомія, стовбурові клітини, гіалуронова кислота, старіння, шкіра.

Abstract: The research covers the specific effect of human umbilical cord cryoextract and the culture medium of its mesenchymal stromal cells in comparison with synthetic hyaluronic acid on the skin regeneration in female rats with simulated aging. The specified substances were administered intradermally to ovariectomized animals. The injection of human umbilical cord cryoextract into animals with a model of skin aging was established to restore the skin structure already 2 weeks after the injections. Thickening of the epidermis and dermis, phenomenon of cell proliferation, and an increased number of collagen fibers as well as blood vessels were observed. Four weeks after the last injection, the skin condition was normalized to the level of intact animals. Administration of the culture medium of mesenchymal stromal cells of the umbilical cord also led to an increased number of collagen fibers, cell proliferation, contouring of skin layers, but had a less pronounced effect compared to the injections of cryoextract on the indices of the dermis and epidermis thickness. Injections of synthetic hyaluronic acid led to "rejuvenation" of the upper layers of skin and had a less pronounced manifestation compared to the effect of human umbilical cord derivatives.

Key words: umbilical cord, cryoextract, cryopreservation, rats, ovariectomy, stem cells, hyaluronic acid, aging, skin.

Одним із головних викликів XXI століття є пошук ефективних методів протистояння старінню організму, особливо його видимим ознакам як-от вікові зміни шкіри. У сучасному суспільстві доглянута шкіра є ознакою гарного самопочуття та впевненості у собі [2, 4, 5, 22]. Шкіра як найбільший орган людини і тварин, який єдиний контактує з зовнішнім середовищем, є не лише «ареною боротьби» зі шкідливими впли-

One of the main challenges of the 21st century is the search for effective methods of combating the body aging, especially its visible signs, such as age-related changes of skin. In modern society, well-groomed skin is a sign of good health and self-confidence [2, 4, 5, 22]. The skin, as the largest organ of humans and animals, which is the only one in contact with the external environment, is not only an 'arena of struggle' with the harmful effects

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

³ Навчально-науковий інститут післядипломної освіти Харківського національного медичного університету, м. Харків, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: shevchenko_nadyusha@ukr.net

Надійшла 07.04.2023

Прийнята до друку 22.02.2024

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

³ Educational and Research Institute for Postgraduate Education of Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: shevchenko_nadyusha@ukr.net

Received April, 07, 2023

Accepted February, 22, 2024

вами різних чинників, а й відображенням загального стану організму [9, 20, 21]. Існує велика кількість чинників, які призводять до стоншення епідермального шару, зниження потенціалу оновлення кератиноцитів, ослаблення дермоепідермального з'єднання, атрофії підшкірно жирової та м'язової тканин. Усе це може спричинити старіння шкіри: поява зморшок, пігментних плям, тьмяність тощо [2, 4, 20, 22]. Гостро постає проблема старіння шкіри для жінок після згасання функції яєчників у постменопаузальний період та/або після овариоектомії [13, 17, 18].

Відомо, що для нормалізації функцій шкіри та відновлення її будови протоколами багатьох антиейджингових програм передбачено застосування речовин з різною дією, а саме: антиоксидантів, гормонів, ретиноїдів, протизапальних препаратів [20, 22], здатних утримувати воду речовин, наприклад гіалуронової кислоти (ГК) [6–8, 19]. Для покращення перебігу різних патологічних станів, викликаних старінням, стимуляції процесів репарації різних органів проводять процедури із введенням стовбурових клітин [1, 3, 10, 11, 15] та біологічно активних сполук тканини плаценти [12, 14]. Наразі пуповина є перспективним джерелом отримання глікозаміногліканів та стовбурових клітин, які вважаються ефективними засобами для лікування інволютивних змін [11, 16].

Виділення біологічно активних сполук для застосування в косметології є можливим завдяки кріоекстракції. Для визначення ефективності кріоекстракту пуповини (КЕП) людини та середовища культивування клітин пуповини (СККП) на відновлення шкіри тварин з модельованим старінням необхідним є експериментальне дослідження *in vivo*.

Мета роботи — проведення порівняльного аналізу дії кріоекстракту пуповини людини, середовища культивування її мезенхімальних стромальних клітин і синтетичної гіалуронової кислоти на структуру шкіри овариоектомованих щурів.

Матеріали та методи

Експерименти на тваринах, схвалені комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол №4 від 26.11.2013), проводили відповідно до положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

of various factors, but also a reflection of the body general state [9, 20, 21]. There are a large number of factors that lead to thinning of the epidermal layer, a decrease in the renewal potential of keratinocytes, a weakening of the dermoepidermal junction, and atrophy of subcutaneous fat and muscle tissue. All this can cause aging of skin: appearances of wrinkles, pigment spots, dullness, etc. [2, 4, 20, 22]. The problem of skin aging for women emerges acutely after the decline of ovarian function in the postmenopausal period and/or after oophorectomy [13, 17, 18].

It is known that in order to normalize skin functions and restore its structure, the protocols of many anti-aging programs provide for the use of substances with different effects, namely antioxidants, hormones, retinoids, anti-inflammatory drugs [20, 22], substances capable of retaining water, such as hyaluronic acid (HA) [6–8, 19]. Procedures with the injection of stem cells [1, 3, 10, 11, 15] and biologically active compounds of placenta tissue [12, 14] are performed to improve the course of various pathologies caused by aging, to stimulate the repair processes of various organs. Currently, the umbilical cord is a promising source of obtaining glycosaminoglycans and stem cells, which are considered effective means for the treatment of involutinal changes [11, 16].

Isolation of biologically active compounds for use in cosmetology is possible owing to cryoextraction. To determine the effectiveness of human umbilical cord cryoextract (UCC) and umbilical cord cell culture medium (UCCCM) for skin regeneration in animals with simulated aging, an *in vivo* experimental study is necessary.

The purpose of this investigation was a comparative analysis of the effect of human umbilical cord cryoextract, the culture medium of its mesenchymal stromal cells, and synthetic hyaluronic acid on the skin structure of ovariectomized rats.

Materials and methods

Experiments in animals were approved by the bioethics committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (protocol No. 4 dated November 26, 2013) and were carried out in accordance with the provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV dated 21.02.2006), 'European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).



Для експериментів було відібрано 36 самиць щурів лінії Вістар віком 6 місяців, вагою 180–200 грамів. Їх розділили на 6 груп по 6 тварин у кожній: 1 — інтактні щури; 2 — самиці після овариоектомії; 3 — тварини, яким після видалення яєчників внутрішньошкірно вводили 0,9% розчин натрію хлориду (NaCl); 4 — тварини, яким після видалення яєчників внутрішньошкірно вводили КЕП; 5 — тварини, яким після видалення яєчників внутрішньошкірно вводили СККП; 6 — тварини, яким після видалення яєчників внутрішньошкірно вводили ГК.

Отриману з інформованої згоди жінки в стерильних умовах після кесаревого розтину пуповину розділяли на фрагменти по 5–6 см, відмивали 0,9% розчином натрію хлориду від крові. Потім її переносили в поліпропіленові пробірки об'ємом 15 мл (Starlab, Україна) та піддавали триразовому заморожуванню до -196°C шляхом занурення у рідкий азот. Розморожували зразки тканини пуповини на водяній бані за температури 40°C . Після розморожування фрагменти пуповини подрібнювали за допомогою гомогенізатора до однорідної маси, додавали фосфатно-сольовий буфер $\text{pH} = 7,2$ у співвідношенні 1:4 і залишали на 2 години за кімнатної температури. Гомогенат фільтрували через капроновий фільтр, рідку фракцію центрифугували протягом 5 хв за 1250g. Супернатант розливали в стерильні пластикові кріопробірки (Starlab), об'ємом 1,0 мл і заморожували до -196°C шляхом занурення у рідкий азот.

Мезенхімальні стромальні клітини пуповини отримували методом експлантів [15]. Для одержання СККП зразки культивували після формування моношару протягом двох діб у середовищі DMEM (Bio-West, Франція) у концентрації 200 тисяч клітин на мл без додавання ембріональної сироватки.

За вмістом серомукоїдів КЕП та СККП стандартизували порівняно з 1% розчином ГК (In Lab Medical, Франція) додаванням фосфатно-сольового буфера.

Моделювання старіння шкіри, характерного для періоду менопаузи, проводили за методом I. Özyazgan [13]. Овариоектомію проводили хірургічним шляхом: крізь лапаротомічний доступ відсікали яєчники після накладання лігатури. Через 3 місяці після операції модель вважали сформованою.

Досліджувані речовини об'ємом 1 мл вводили щоденно протягом 5-ти діб в ділянку спини розміром $2 \times 2 \text{ cm}^2$ у епідерміс методом поверхневого напажу на глибину 0,5 мм по 0,02 мл за один прокол, відстань між якими складала

Thirty six female Wistar rats aged 6 months, weighing 180–200 grams, were selected for the experiments. They were divided into 6 groups of 6 animals each: 1 — intact rats; 2 — females after ovariectomy; 3 — animals that, after removing the ovaries, were injected intradermally with a 0.9% sodium chloride (NaCl) solution; 4 — animals that, after removal of the ovaries, were injected intradermally with UCC; 5 — animals, which after removal of the ovaries were injected intradermally with UCCCM; 6 — animals that after removal of the ovaries were intradermally injected with HA.

The umbilical cord obtained with the informed consent of women under sterile conditions after a cesarean section was divided into 5–6 cm fragments, washed with a 0.9% sodium chloride solution from the blood. Then it was transferred to 15 ml polypropylene tubes (Starlab, Ukraine) and subjected to triple freezing to -196°C by immersion in liquid nitrogen and heating in a water bath at 40°C . After the last heating, the fragments of the umbilical cord were crushed using a homogenizer to a homogeneous mass, phosphate-salt buffer $\text{pH} = 7.2$ was added in a ratio of 1:4 and left for 2 hours at room temperature. The homogenate was filtered through a kapron filter; the liquid fraction was centrifuged for 5 minutes at 1250g. The supernatant was poured into 1.0 ml sterile plastic cryotubes (Starlab) and frozen to -196°C by immersion in liquid nitrogen.

The umbilical cord mesenchymal stromal cells were derived by the explants method [15]. To obtain the UCCCM, the samples were cultured after monolayer formation during two days in DMEM (Bio-West, France) at a concentration of 200,000 cells per ml with no fetal serum.

According to the content of seromucoids, UCC and UCCCM were standardized compared to 1% HA solution (In Lab Medical, France) by adding phosphate-saline buffer.

Skin aging, characteristic of the menopause period, was modeled according to the method of I. Özyazgan [13]. Ovariectomy was performed surgically: the ovaries were cut off through a laparotomy approach after applying a ligature. Three months after the operation, the model was considered formed.

The substances under investigation in a volume of 1 ml were injected daily for 5 days into the $2 \times 2 \text{ cm}^2$ area in the epidermis by the method of surface nappage to a depth of 0.5 mm by 0.02 ml per puncture, the distance between which was no more than 0.4 cm. Two and four weeks after the last injection, 3 animals from each group (1–6)

не більше ніж 0,4 см. Через 2 та 4 тижні після введення останньої ін'єкції з експерименту виводили по 3 тварини з кожної групи (1–6). Для подальшого дослідження з ділянки введення досліджуваних сполук видаляли фрагменти шкіри, які фіксували у 10%-му формаліні, промивали водою та зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, після чого заливали у парафін. Парафінові зрізи шкіри товщиною 4–6 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином. Для морфометричного дослідження вимірювали товщину шарів дерми і епідермісу, визначали кількість складок на 1 мм² зрізу. Мікроскопічне дослідження здійснювали з використанням світлооптичного мікроскопа «NIB-100» (Delta Optical, Польща) з камерою «MCMOS 3100» (Sigeta, Китай). Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення «Toup View V 3.7» (Hangzhou Toup Tek Photonics Co. Ltd, Китай). Гістологічні препарати представлені на рис. 1–4. Результати морфометричного дослідження наведені на рис. 5.

Статистичну обробку даних проводили програмою «PAST V.3.15» (Університет Осло, Норвегія) з використанням непараметричного критерію Краскела-Уоліса.

Результати та обговорення

Гістологічне дослідження структури шкіри тварин групи 1 показало звичайний мікрорельєф епідермісу та диференціацію на шари, великі гетерохромні ядра. Дермоепідермальний кордон переважно мав чіткі контури. У власне дермі спостерігали клітини фібробластичного ряду, колагенові та еластичні волокна, орієнтовані паралельно поверхні шкіри, велику кількість залоз та волосяних фолікулів. У глибоких шарах підшкірної клітковини виявлялися кровоносні судини. М'язові волокна власного м'яза шкіри були добре розвинені, орієнтовані в поздовжньому та поперечному напрямках (див. рис. 1, А, С).

Морфометричні дані, а саме товщина дерми, епідермісу та кількість складок шкіри інтактних тварин наведені на рис. 5.

Через 3 місяці після оваріоектомії спостерігалися зміни, характерні для старіння шкіри: стоншення товщини епідермісу шляхом зменшення кількості клітин у його шарах (кератинізація та міграція), деякі клітини мали пікнотичні ядра, більшість ядер були гіперхромними. Відзначалася згладженість дермоепідермального кордону. Товща дерми також стоншувалася, сосочковий та сітчастий шари не диференціювалися. Сполучнотканинна частина дерми являла собою розпушені, фрагментовані та контурно змінені

were removed from the experiment. For further research, skin fragments were removed from the injection site of the studied compounds, fixed in 10% formalin, washed with water and dehydrated in alcohols of increasing concentration, afterwards they were paraffinembedded. Paraffin skin sections with a thickness of 4–6 μm were stained with hematoxylin and eosin. The morphometric study was carried out according to the following indices: the thickness of the dermis and epidermis layers, number of folds per 1 mm² section was measured. Microscopic examination was carried out using a light-optical microscope 'NIB-100' (Delta Optical, Poland) with a camera 'MCMOS 3100' (Sigeta, China). Toup View V 3.7 software (Hangzhou Toup Tek Photonics Co. Ltd, China) was used for image processing. Histological preparations are presented in Figs. 1–4. The results of the morphometric study are presented in Fig. 5.

Statistical data processing was carried out using ('PAST V.3.15' software (University of Oslo, Norway)) with non-parametric Kruskal-Wallis criteria.

Results and discussion

Histological examination of the structure of the skin of animals of group 1 showed the usual microrelief of the epidermis and differentiation into layers, large heterochromic nuclei. The dermoepidermal border mostly had clear contours. In the dermis itself, fibroblastic cells, collagen and elastic fibers oriented parallel to the skin surface, a large number of glands and hair follicles were observed. Blood vessels were found in the deep layers of the subcutaneous tissue. Muscle fibers of the skin's own muscle were well developed, oriented in the longitudinal and transverse directions (see Fig. 1, A, C).

Morphometric data of the thickness of dermis, epidermis and the number of skin folds in intact animals are shown in Fig. 5.

Three months after ovariectomy, the changes characteristic of skin aging were observed: thinning of the epidermis by reducing the number of cells in its layers (keratinization and migration), some cells had pyknotic nuclei; most of the nuclei were hyperchromic. Smoothing of the dermoepidermal border was noted. The thickness of the dermis also thinned, the papillary and reticular layers did not differentiate. The connective tissue part of the dermis consisted of loose, fragmented and contoured bundles of collagen and elastic fibers, among which a small number of randomly arranged fibroblastic cells with dense nuclei were observed somewhere. Single hair follicles and sebaceous



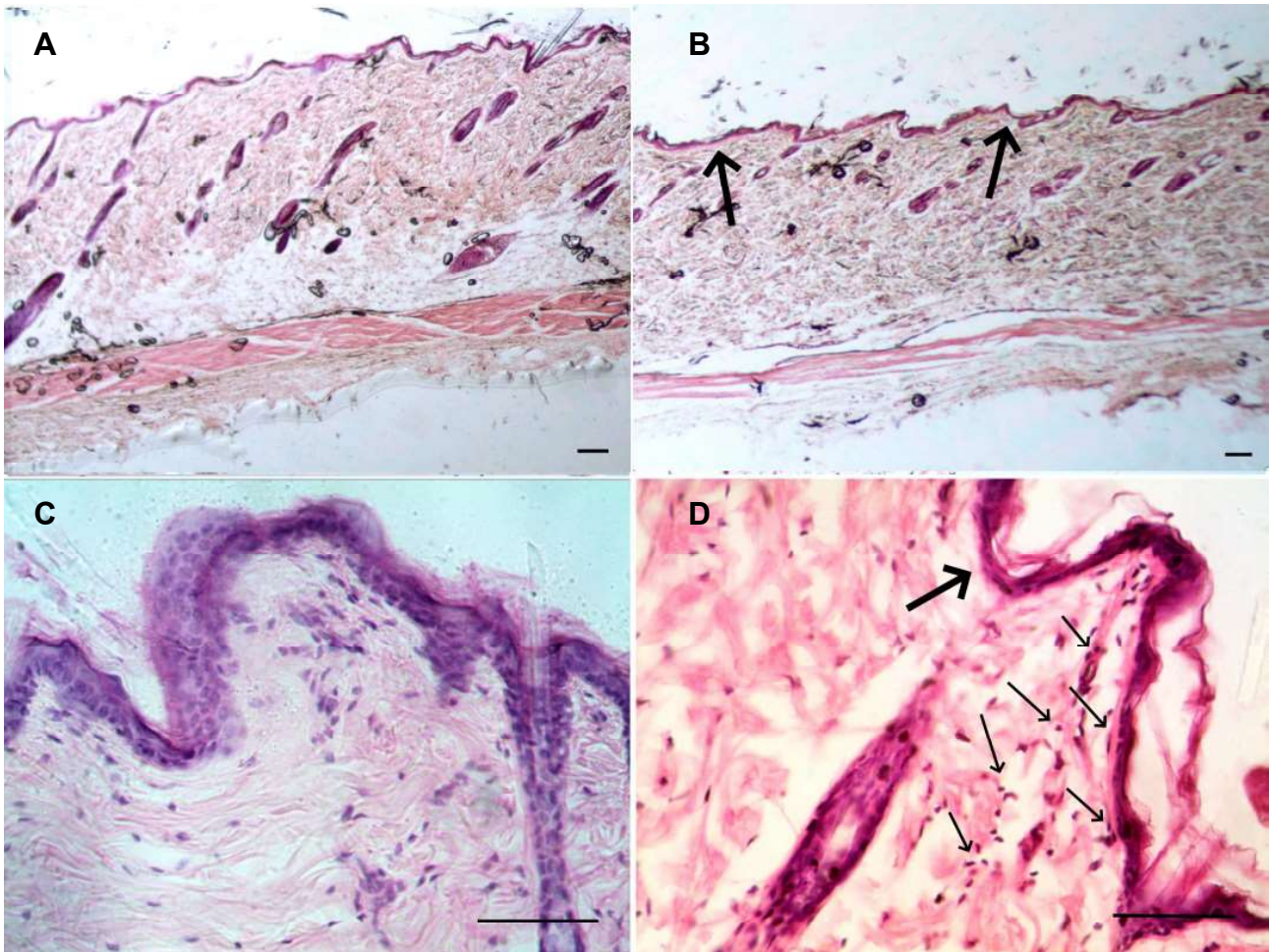


Рис. 1. Шкіра інтактних тварин (А, С) та тварин через 3 місяці після овариоектомії (В, D). Забарвлення гематоксилином та еозином. Масштабні лінійки 100 мкм. Товсті стрілки — стоншення епідермісу, тонкі стрілки — гіперхромія ядер.

Fig. 1. Skin of intact animals (A, C) and animals 3 months after ovariectomy (B, D). Staining with hematoxylin and eosin. Scale bars are 100 μm. Thick arrows – thinning of the epidermis, thin arrows – hyperchromia of the nuclei.

пучки колагенових та еластичних волокон, серед яких подекуди спостерігали невелику кількість хаотично розташованих фібробластичних клітин зі щільними ядрами. У власне дермі визначалися поодинокі волосяні фолікули та сальні залози. Власний м'яз шкіри був витончений і складався з гіпотрофованих м'язових волокон, орієнтованих у поздовжньому та поперечному напрямках (див. рис. 1, B, D). Морфометричні дані товщини дерми, епідермісу та кількість складок шкіри тварин з моделлю старіння шкіри наведені на рис. 5.

Після внутрішньошкірного введення 0,9% розчину NaCl овариоектомованим тваринам (група 3) спостерігали ті ж ознаки, які були виявлені у самиць щурів групи 2.

Дослідження шкіри тварин з моделлю старіння через 2 тижні після введення тваринам КЕП (група 4) показало, що епідерміс мав нормальний мікрорельєф і диференціацію на шари (див. рис. 2, A).

glands were identified in the dermis itself. The skin's own muscle was thin and consisted of hypotrophied muscle fibers oriented in the longitudinal and transverse directions (see Fig. 1, B, D). Morphometric data of the thickness of the dermis, epidermis and the number of skin folds in the animals with a skin aging model are shown in Fig. 5.

After intradermal injection of 0.9% NaCl solution, ovariectomized animals (group 3) showed the same signs as were observed in female rats of group 2.

Examination of the skin of animals with an aging model 2 weeks after administration of UCC to animals (group 4) showed that the epidermis had normal microrelief and differentiation into layers (see Fig. 2, A).

During the experiment, the proliferation of its basal cells and the epithelium of hair follicles was observed, single intraepidermal macrophages

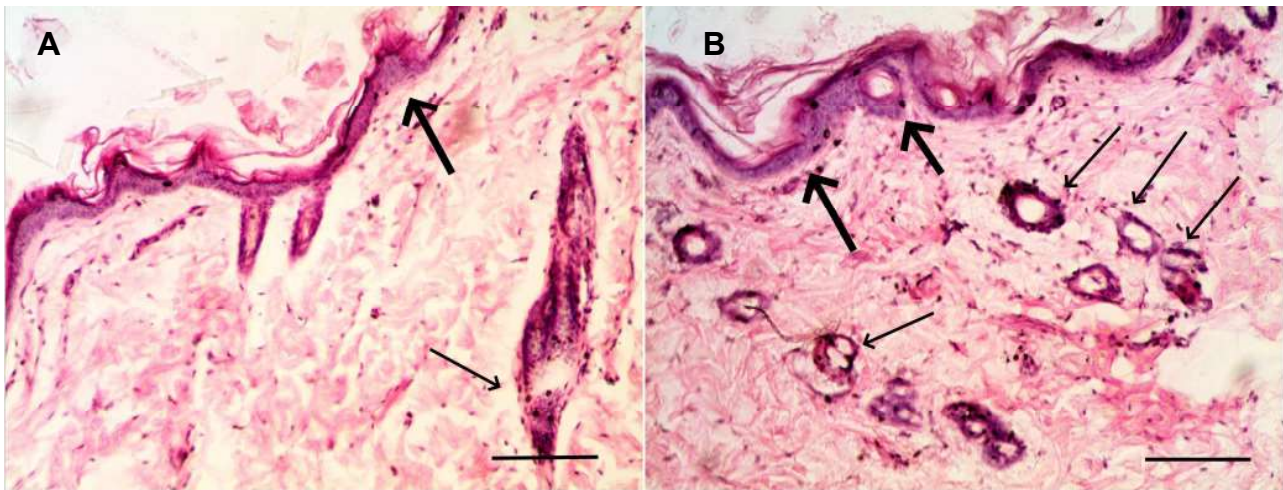


Рис. 2. Шкіра овариоектомованих тварин у місці ін'єкції через 2 (А) та 4 (В) тижні після введення КЕП. Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Масштабні лінійки 100 мкм. Товсті стрілки — гіпертрофія з диференціацією на шари, тонкі стрілки — кровonosні судини.

Fig. 2. Skin of ovariectomized animals at the injection site in 2 (A) and 4 (B) weeks after UCC administration. Staining with hematoxylin and eosin. Scale bars are 100 μm . Thick arrows are hypertrophy with differentiation into layers, thin arrows are blood vessels.

Під час експерименту спостерігали проліферацію його базальних клітин та епітелію волосяних фолікулів, виявлялися поодинокі внутрішньоепідермальні макрофаги. Товщина епідермісу та дерми збільшувалася. У власне дермі відзначали збільшену кількість фібробластів та кровonosних капілярів, особливо в сосочковому шарі, а також більш-менш упорядковано орієнтовані колагенові та еластичні волокна. Введення КЕП викликало значущі зміни морфометричних показників порівняно з такими у тварин груп 2 і 3, а саме: значне збільшення товщини дерми, епідермісу та зменшення кількості складок (див. рис. 5). Досліджені показники не досягли контрольних значень, характерних для тварин групи 1.

Через 4 тижні після введення КЕП епідерміс мав звичайний мікрорельєф та диференціацію на шари, збільшувалася кількість волосяних фолікулів (див. рис. 2, В). Дермоепідермальний кордон переважно чітко контуровався. У власне дермі виявлялася збільшена кількість клітин фібробластичного ряду. Привертала увагу густа мережа молодих новоутворених колагенових і еластичних волокон, орієнтованих паралельно поверхні шкіри. У глибоких шарах підшкірної клітковини виявляли кровonosні судини. М'язові волокна власного м'яза шкіри були спрямовані в поздовжньому та поперечному напрямках. Товщина епідермісу та кількість складок шкіри не відрізнялися від таких у інтактних тварин, шар дерми був дещо стовщений (див. рис. 5). Таким чином, введення КЕП тваринам з моделлю старіння шкіри приводило до відновлення бу-

were detected. The thickness of the epidermis and dermis increased. In the dermis itself, an increased number of fibroblasts and blood capillaries were noted, especially in the papillary layer, as well as more or less orderly oriented collagen and elastic fibers. The introduction of UCC caused significant changes in morphometric indices compared to those in animals of groups 2 and 3, namely: a significant increase in the thickness of the dermis, epidermis and a decrease in the number of folds (see Fig. 5). The studied indices did not reach the control values characteristic of animals of group 1.

Four weeks after the introduction of UCC, the epidermis had a normal microrelief and differentiation into layers, the number of hair follicles increased (see Fig. 2, B). The dermoepidermal border was mostly clearly contoured. An increased number of fibroblastic cells was found in the dermis itself. Attention was drawn to a dense network of young, newly formed collagen and elastic fibers oriented parallel to the skin surface. Blood vessels were found in the deep layers of the subcutaneous tissue. The muscle fibers of the skin's own muscle were directed in the longitudinal and transverse directions. The thickness of the epidermis and the number of skin folds did not differ from those of intact animals, the dermis layer was somewhat thickened (see Fig. 5). Thus, the administration of UCC to animals with a model of skin aging led to the restoration of the skin structure already 2 weeks after the introduction, after 4 – a certain normalization of its condition to the level of intact animals took place.



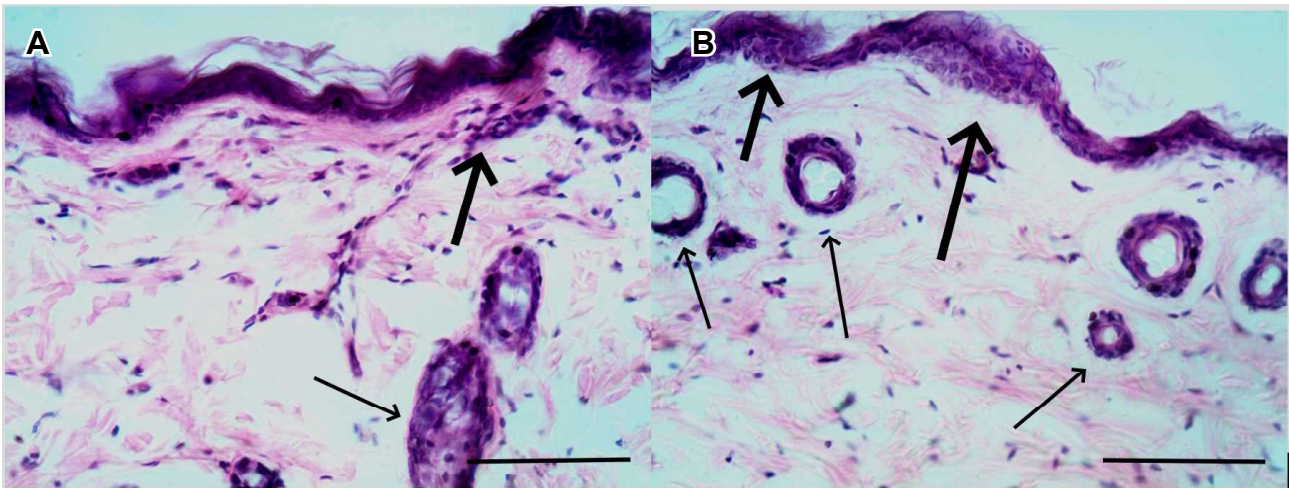


Рис. 3. Шкіра овариоектомованих тварин через 2 (А) та 4 (В) тижні після введення СККП. Забарвлення гематоксилином та еозином. Масштабні лінійки 100 мкм. Товсті стрілки — гіпертрофія епідермісу з диференціацією на шари, тонкі стрілки — кровоносні судини.

Fig. 3. Skin of ovariectomized animals in 2 (A) and 4 (B) weeks after UCCCM administration. Staining with hematoxylin and eosin. Scale bars are 100 µm. Thick arrows are hypertrophy of the epidermis with differentiation into layers, thin arrows are blood vessels.

дови шкіри вже через 2 тижні після ін'єкцій, через 4 тижні — відбувалася певна нормалізація її стану до рівня інтактних тварин.

Під час дослідження гістологічного препарату фрагмента шкіри шурів групи 5 через 2 тижні після введення СККП виявлено шар епідермісу з нормальною складчастістю, диференціацією на шари, спостерігалася проліферація базальних клітин та епітелію волосяних фолікулів. У власне дермі відзначалася збільшена кількість фібробластів та орієнтованих паралельно поверхні шкіри колагенових та еластичних волокон (див. рис. 3, А). Морфометричний аналіз показав нормалізацію товщини епідермісу до рівня, характерного шкірі інтактних шурів, та деяке стоншення дерми, яке значуще не відрізнялося від показників тварин групи 1, а також зменшення кількості складок шкіри, порівняно з контрольними значеннями (див. рис. 5).

Через 4 тижні після введення СККП епідерміс мав звичайний мікрорельєф і диференціацією на шари, у власне дермі виявлялося збільшення кількості волосяних фолікулів, сальних залоз, клітин фібробластичного ряду та орієнтованих паралельно поверхні шкіри колагенових і еластичних волокон, які мали дещо розпушений вигляд. У підшкірній клітковині відзначали глибоко залегли кровоносні судини. Власний м'яз шкіри складався з волокон, орієнтованих у поздовжньому та поперечному напрямках. Іншими словами, введення СККП шурам з моделю старіння приводило до нормалізації будови шкіри (див. рис. 3, В). Морфометричний аналіз показав стоншення дерми та епідермісу, порів-

During the examination of a histological preparation of a fragment of the skin of rats of group 5, 2 weeks after the introduction of UCCCM, a layer of the epidermis with normal folds, differentiation into layers was found, and proliferation of basal cells and the epithelium of hair follicles was observed. In the dermis itself, there was an increased number of fibroblasts and collagen and elastic fibers oriented parallel to the skin surface (see Fig. 3, A). Morphometric analysis showed the normalization of the thickness of the epidermis to the level characteristic of the skin of intact rats, and some thinning of the dermis, which did not differ significantly from the indices of the group 1 animals, as well as a decreased number of skin folds, compared to control values (see Fig. 5).

Four weeks after the introduction of UCCCM, the epidermis had a normal microrelief and differentiation into layers, the dermis itself showed an increase in the number of hair follicles, sebaceous glands, cells of the fibroblastic series, and collagen and elastic fibers oriented parallel to the skin surface, which had a somewhat loose appearance. Deep blood vessels were noted in the subcutaneous tissue. The skin's own muscle consisted of fibers oriented in the longitudinal and transverse directions. By other words, the administration of UCCCM to rats with an aging model led to the normalization of the skin structure (see Fig. 3, B). Morphometric analysis showed the dermis and epidermis thinning, compared to the control, the number of folds did not differ from the control values (see Fig. 5).

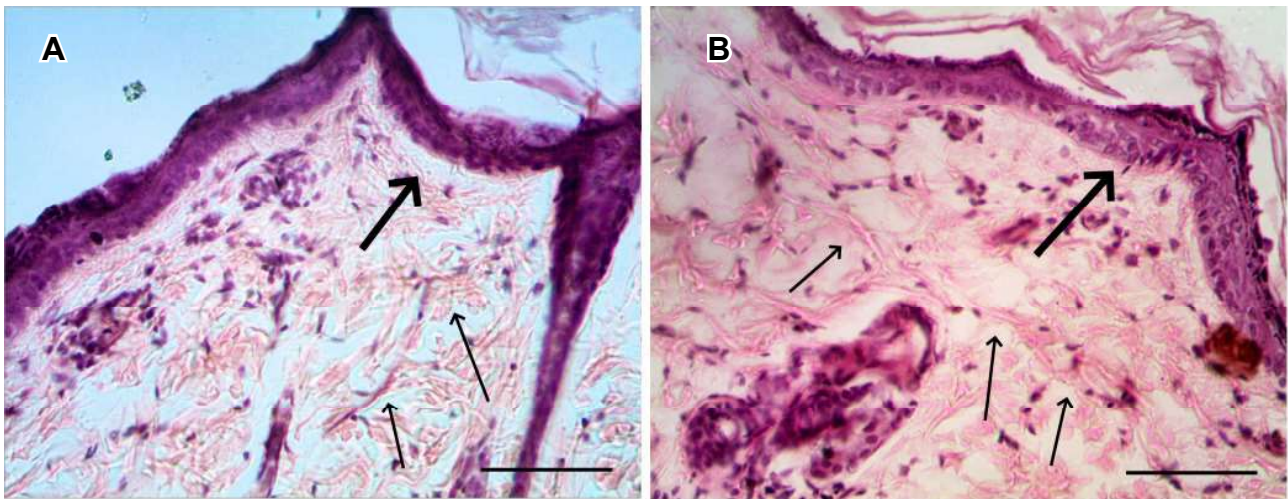


Рис. 4. Шкіра овариоектованих тварин через 2 (А) та 4 (В) тижні після введення ГК. Забарвлення гематоксином та еозином. Масштабні лінійки 100 мкм. Товсті стрілки — гіпертрофія епідермісу з диференціацією на шари, тонкі стрілки — орієнтація волокон.

Fig. 4. Skin of ovariectomized animals in 2 (A) and 4 (B) weeks after HA administration. Staining with hematoxylin and eosin. Scale bars are 100 μm . Thick arrows are hypertrophy of the epidermis with differentiation into layers, thin arrows are fiber orientation.

няно з контролем, кількість складок не відрізнялася від контрольних значень (рис. 5).

Таким чином, після введення СККП тваринам з моделлю старіння шкіри спостерігали ознаки відновлення клітинних і структурних елементів шкіри.

Дослідження впливу синтетичної ГК показало, що через 2 тижні після введення епідерміс тварин групи 6 мав нормальну складчастість та диференціацію, спостерігалася проліферація його базальних і епітеліальних клітин, волосяних фолікулів. У власне дермі, особливо в її сосочковому шарі, спостерігалася збільшена кількість фібробластів і орієнтованих паралельно поверхні шкіри молодих колагенових волокон, а також велика кількість новоутворених кровоносних капілярів (див. рис. 4, А). Відзначалося значуще зменшення складок шкіри, по відношенню не тільки до значень, отриманих для овариоектованих, але й для контрольних тварин (див. рис. 5).

Через 4 тижні після введення ГК епідерміс у місці ін'єкцій мав дещо згладжений мікрорельєф та слабку диференціацію на шари. У власне дермі виявилися колагенові та еластичні волокна, які мали розпушений вигляд. Спостерігалася проліферація базальних клітин епідермісу та епітелію волосяних фолікулів. У сосочковому шарі дерми відзначали збільшену кількість фібробластів та численні кровоносні капіляри (див. рис. 4, В). Результати морфометричного аналізу показали значуще стоншення епідермісу до рівня овариоектованих тварин, товщина дерми відповідала значенням, отриманим для контрольної групи (див. рис. 5).

Thus, after the introduction UCCCM to animals with a model of skin aging, the signs of restoration of cell and structural elements of the skin were observed.

The study of the synthetic HA effect showed that 2 weeks after the introduction, the epidermis of animals of group 6 had normal folds and differentiation into layers, proliferation of its basal, epithelial cells and the hair follicles was observed. In the dermis itself, especially in its papillary layer, there was an increased number of fibroblasts and young collagen fibers oriented parallel to the skin surface, as well as a large number of newly formed blood capillaries (see Fig. 4, A). A significant decrease in skin folds was noted, in relation not only to the values obtained for ovariectomized animals, but also for control animals (see Fig. 5).

Four weeks after HA introduction, the epidermis at the injection site had a slightly smoothed microrelief and weak differentiation into layers. The dermis itself was revealed with collagen and elastic fibers that had a loose appearance. Proliferation of basal cells of the epidermis and epithelium of hair follicles was observed. An increased number of fibroblasts and numerous blood capillaries were noted in the papillary layer of the dermis (see Fig. 4, B). The results of the morphometric analysis showed a significant thinning of the epidermis to the level of ovariectomized animals, the thickness of the dermis corresponded to the values obtained for the control group (see Fig. 5).

The skin is the largest organ of the body and is most exposed to various negative exogenous and



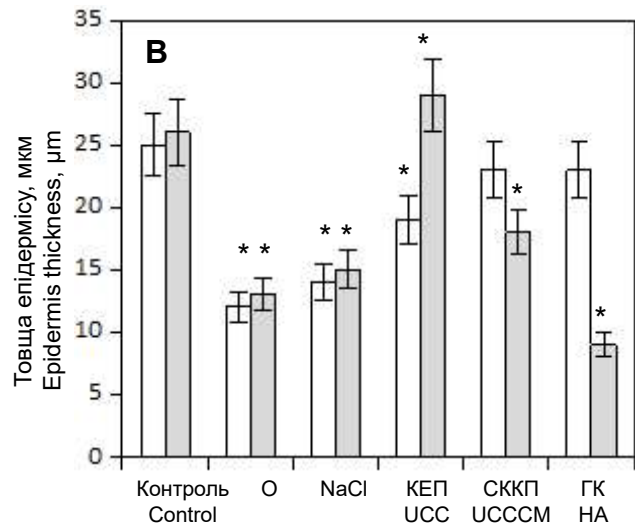
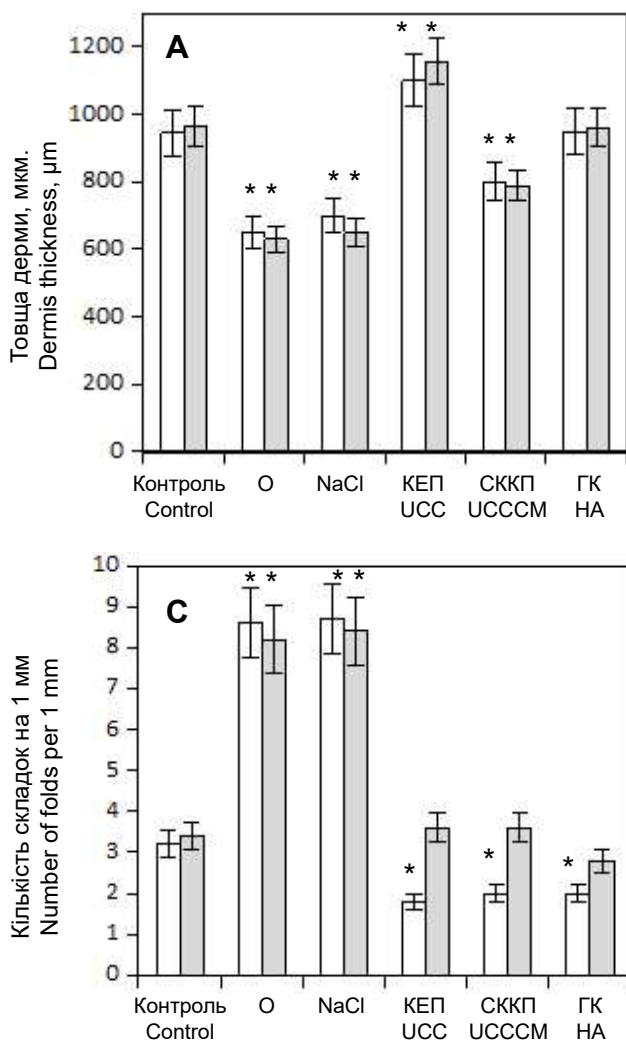


Рис. 5. Морфометричні показники шкіри овариоектомованих щурів: **A** — товщина дерми, **B** — товщина епідермісу, **C** — кількість складок шкіри; □ — шкіра тварин через 2 тижні експерименту, ■ — шкіра тварин через 4 тижні експерименту, O — без лікування, NaCl — шкіра на тлі введення фізіологічного розчину, GK — введення синтетичної гіалуронової кислоти, SKKP — введення середовища культивування мезенхімальних стромальних клітин пуповини, KEP — введення криоекстракту пуповини; * — зміни значущі порівняно з контролем, $p < 0,01$.

Fig. 5. Morphometric parameters of skin of ovariectomized rats: **A** — thickness of the dermis, **B** — thickness of the epidermis, **C** — number of skin folds; □ — skin of animals after 2 weeks of the experiment, ■ — skin of animals after 4 weeks of the experiment, O — no treatment, NaCl — introduction of saline, HA — introduction of synthetic hyaluronic acid, UCCCM — introduction of the umbilical cord cells culture medium, UCC — introduction of umbilical cord cryoextract; * — changes are significant compared to the control, $p < 0.01$.

Шкіра є найбільшим органом тіла та дуже сильно піддається впливу різних негативних екзо- і ендогенних факторів. Її вікові зміни є наслідком зниження здатності клітинної репарації ДНК і втрати теломер, точкових мутацій позаядерної мітохондріальної ДНК, окиснювального стресу, підвищення частоти хромосомних аномалій, одногенних мутацій, зниження вмісту вуглеводів, хронічних запалень [2, 4]. Типовими змінами шкіри при старінні є дегідратація, стоншення епідермісу та дерми, зменшення кількості елементів шкіри (залоз та фолікулів), зниження кровообігу, вмісту колагену, еластину, глікозаміногліканів [5, 9, 20].

Проведене дослідження показало, що застосування біологічно активних сполук, які містяться в тканині пуповини людини, чинить «омолоджувальну» дію на шкіру тварин з модельованим старінням. Було показано, що введення СККП тваринам після овариоектомії приводить до відновлення клітинних елементів шкіри. Ефект, який спостерігався після введення СККП, мож-

endogenous factors. Its age-related changes are the result of a decrease in the ability of cellular DNA repair and loss of telomeres, point mutations of extranuclear mitochondrial DNA, oxidative stress, a rise in frequency of chromosomal abnormalities, single-gene mutations, a decrease in carbohydrate content, and chronic inflammation [2, 4]. Typical skin changes during aging are dehydration, thinning of the epidermis and dermis, a decrease in the number of skin elements (glands and follicles), a decrease in blood circulation, the amount of collagen, elastin, and glycosaminoglycans [5, 9, 20].

The conducted study showed that the use of biologically active compounds contained in the tissue of the human umbilical cord has a 'rejuvenating' effect on the skin of animals with simulated aging. The introduction of UCCCM to animals after ovariectomy was shown to lead to the restoration of the skin cell elements. The effect that was observed after the injection of UCCCM can

на пояснити дією активних компонентів, які входять до його складу: ендотеліальний фактор росту судин, фактор росту фібробластів, трансформуючий фактор росту b1 та b2, фактор росту гепатоцитів, кератиноцитів, тромбоцитарний та плацентарний фактори росту, що було доведено результатами клітинної терапії [1, 3, 10, 11, 16]. Після застосування препаратів, які містять ГК природного походження, наприклад похідних пуповини, відновлення епідермального шару шкіри, потовщення дерми може бути пов'язано з накопиченням рідини та стимуляцією метаболізму шкіри, посиленням проліферації клітинних елементів [11]. Авторами було показано, що застосування КЕП сприяло відновленню стану шкіри тварин після овариоектомії.

Дія біологічно активних сполук пуповини людини у якості потенційного антиейджингового компонента може виявитися набагато ширшою, ніж дія синтетичної ГК, яка наразі традиційно застосовується для «омолодження» стану шкіри. У роботі показано, що досліджувані речовини можуть виступати регуляторами процесів старіння шкіри, однак умови, які спонукають їх до виконання різноманітних регуляторних функцій, є недостатньо зрозумілими. Таким чином, потрібне значно глибше розуміння дії біологічно активних сполук при експериментальному старінні шкіри, перш ніж вони можуть бути застосовані у косметології.

Висновки

Таким чином, внутрішньошкірне застосування КЕП у овариоектомованих щурів приводить до зменшення проявів старіння: епідерміс та дерма потовщуються, спостерігаються явища проліферації клітин, збільшується кількість судин. Введення СККП приводило до позитивних змін у шарах епідермісу та дерми через 2 тижні спостереження, але мало менш виражений ефект порівняно з ін'єкціями КЕП. Ін'єкції синтетичної ГК приводили до «омолодження» верхніх шарів шкіри, починаючи тільки з 4-го тижня після останньої ін'єкції, спостерігали найменшу ефективність даної речовини порівняно з дією КЕП і СККП.

Робота виконувалася за підтримки Національного фонду досліджень України (проект № 2021.01/0414).

Література

1. Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, et al. Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *J Cell Physiol.* 2020; 235(12): 9230–40.

be explained by the action of the active components that are part of it: endothelial vascular growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor b1 and b2, hepatocyte, keratinocyte growth factor, platelet and placental growth factors, which was proven with cell therapy results [1, 3, 10, 11, 16]. After the use of drugs that contain HA of natural origin, such as umbilical cord derivatives, restoration of the skin epidermal layer, thickening of the dermis may be associated with fluid accumulation and stimulation of skin metabolism, increased proliferation of cell elements [11]. The authors showed that the use of UCC contributed to the restoration of skin state in the animals after ovariectomy.

The effect of biologically active compounds of human umbilical cord as a potential anti-aging component may be much wider than the effect of synthetic HA, which is currently traditionally used to 'rejuvenate' the skin condition. The research shows that the studied substances can act as regulators of skin aging processes, but the conditions that prompt them to perform various regulatory functions are not sufficiently understood. Thus, a much deeper understanding of the effect of biologically active compounds in experimental skin aging is needed before they can be applied in cosmetology.

Conclusions

Thus, the intradermal application of UCC in ovariectomized rats results in a reduced manifestations of aging: the epidermis and dermis thicken, the phenomena of cell proliferation are observed, and the number of blood vessels increases. The introduction of UCCCM led to positive changes in the layers of the epidermis and dermis after 2 week of observation, but had a less pronounced effect compared to UCC injections. The introduction of synthetic HA led to the 'rejuvenation' of the upper layers of the skin, starting only from the week 4 after the last injection, the lowest effectiveness of this substance was found compared to the effect of UCC and UCCCM.

The study was supported with the National Research Fund of Ukraine (project No. 2021.01/0414).

References

1. Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, et al. Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *J Cell Physiol.* 2020; 235(12): 9230–40.



2. Boismal F, Serror K, Dobos G, et al. Vieillesse cutané — Physiopathologie et thérapies innovantes. *Med Sci (Paris)*. 2020; 36(12):1163–72.
3. Deng Q, Huang S, Wen J, et al. PF-127 hydrogel plus sodium ascorbyl phosphate improves Wharton's jelly mesenchymal stem cell-mediated skin wound healing in mice. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 Apr 3 [Cited 11.11.2022]; 11(1): 143. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-01638-2>
4. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the aging skin. *Adv Wound Care*. 2013; 2(1): 5–10.
5. Fornieri C, Quaglino D Jr, Mori G. Correlations between age and rat dermis modifications. Ultrastructural-morphometric evaluations and lysyl oxidase activity. *Aging Clin Exp Res*. 1989; 1(2): 127–38.
6. Gutowski KA. Hyaluronic acid fillers: Science and clinical uses. *Clin Plast Surg*. 2016; 43(3): 489–96.
7. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, et al. Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules* [Internet]. 2021 Jul 22 [Cited 11.11.2022]; 26(15): 4429. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/15/4429/htm>
8. Keen MA. Hyaluronic acid in dermatology. *Skinmed*. 2017; 15(6): 441–8.
9. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin*. 2011; 19(2): 229–34.
10. Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(8): 1–14.
11. Mathen C, Sawant MG, Gupta R, et al. Evaluation of potential application of Wharton's jelly-derived human mesenchymal stromal cells and its conditioned media for dermal regeneration using rat wound healing model. *Cells Tissues Organs*. 2021; 210(1): 31–44.
12. Musatova IB, Volina VV, Chub OV, et al. Effects of implantation of cryopreserved placental explants on the behavioral indices and morphological characteristics of the cerebral structures in senescent mice. *Neurophysiology*. 2017; 49(5): 363–71.
13. Ozyazgan I, Liman N, Dursun N, Güneş I. The effects of ovariectomy on the mechanical properties of skin in rats. *Maturitas*. 2002; 43(1): 65–74.
14. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko NA, et al. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(2): 143–50.
15. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, et al. Wharton's Jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization. *Acta Med Iran*. 2018; 56(1): 28–33.
16. Roy A, Mantay M, Brannan C, Griffiths S. Placental tissues as biomaterials in regenerative medicine. *Biomed Res Int* [Internet]. 2022 Apr 21 [Cited 11.11.2022]; 2022: 6751456. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2022/6751456/>
17. Thomas JR. Effects of age and diet on rat skin histology. *Laryngoscope*. 2005; 115(3): 405–11.
18. Tsukahara K, Moriwaki S, Ohuchi A, et al. Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. *Photochem Photobiol*. 2001; 73(5): 525–31.
19. Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *Int J Biol Macromol*. 2020; 151: 1012–29.
20. Wong QYA, Chew FT. Defining skin aging and its risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Nov 11 [Cited 11.11.2022]; 11(1): 22075. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01573-z>
21. Zaki SM. Characteristics of the skin of the female albino rats in different ages: histological, morphometric and electron
2. Boismal F, Serror K, Dobos G, et al. Vieillesse cutané — Physiopathologie et thérapies innovantes. *Med Sci (Paris)*. 2020; 36(12):1163–72.
3. Deng Q, Huang S, Wen J, et al. PF-127 hydrogel plus sodium ascorbyl phosphate improves Wharton's jelly mesenchymal stem cell-mediated skin wound healing in mice. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 Apr 3 [Cited 11.11.2022]; 11(1): 143. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-01638-2>
4. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the aging skin. *Adv Wound Care*. 2013; 2(1): 5–10.
5. Fornieri C, Quaglino D Jr, Mori G. Correlations between age and rat dermis modifications. Ultrastructural-morphometric evaluations and lysyl oxidase activity. *Aging Clin Exp Res*. 1989; 1(2): 127–38.
6. Gutowski KA. Hyaluronic acid fillers: Science and clinical uses. *Clin Plast Surg*. 2016; 43(3): 489–96.
7. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, et al. Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules* [Internet]. 2021 Jul 22 [Cited 11.11.2022]; 26(15): 4429. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/15/4429/htm>
8. Keen MA. Hyaluronic acid in dermatology. *Skinmed*. 2017; 15(6): 441–8.
9. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin*. 2011; 19(2): 229–34.
10. Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(8): 1–14.
11. Mathen C, Sawant MG, Gupta R, et al. Evaluation of potential application of Wharton's jelly-derived human mesenchymal stromal cells and its conditioned media for dermal regeneration using rat wound healing model. *Cells Tissues Organs*. 2021; 210(1): 31–44.
12. Musatova IB, Volina VV, Chub OV, et al. Effects of implantation of cryopreserved placental explants on the behavioral indices and morphological characteristics of the cerebral structures in senescent mice. *Neurophysiology*. 2017; 49(5): 363–71.
13. Ozyazgan I, Liman N, Dursun N, Güneş I. The effects of ovariectomy on the mechanical properties of skin in rats. *Maturitas*. 2002; 43(1): 65–74.
14. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko NA, et al. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(2): 143–50.
15. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, et al. Wharton's Jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization. *Acta Med Iran*. 2018; 56(1): 28–33.
16. Roy A, Mantay M, Brannan C, Griffiths S. Placental tissues as biomaterials in regenerative medicine. *Biomed Res Int* [Internet]. 2022 Apr 21 [Cited 11.11.2022]; 2022: 6751456. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2022/6751456/>
17. Thomas JR. Effects of age and diet on rat skin histology. *Laryngoscope*. 2005; 115(3): 405–11.
18. Tsukahara K, Moriwaki S, Ohuchi A, et al. Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. *Photochem Photobiol*. 2001; 73(5): 525–31.
19. Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *Int J Biol Macromol*. 2020; 151: 1012–29.
20. Wong QYA, Chew FT. Defining skin aging and its risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Nov 11 [Cited 11.11.2022]; 11(1): 22075. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01573-z>

- microscopic study. J Cytol Histol [Internet]. 2015 Mar 11 [Cited 11.11.2022]; S3: 004. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/3481/dc9d515abcadbc7040b4fc3ff17c558b6558.pdf>
- 22.Zhang S, Duan E. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. Cell Transplant. 2018; 27(5): 729–38.
- 21.Zaki SM. Characteristics of the skin of the female albino rats in different ages: histological, morphometric and electron microscopic study. J Cytol Histol [Internet]. 2015 Mar 11 [Cited 11.11.2022]; S3: 004. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/3481/dc9d515abcadbc7040b4fc3ff17c558b6558.pdf>
- 22.Zhang S, Duan E. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. Cell Transplant. 2018; 27(5): 729–38.

