

ФОСФАТАЗОПОЗИТИВНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОЖИ БЕЛЫХ КРЫС В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

МЯДЕЛЕЦ О.Д.¹, ЛЕБЕДЕВА Е.И.¹, МЯДЕЛЕЦ Н.Я.²

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

²Витебский государственный медицинский колледж, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №2. – С. 37-46.

PHOSPHATASE-POSITIVE STEM CELLS OF THE SKIN OF WHITE RATS IN THE AGE ASPECT

MYADELETS O.D.¹, LEBEDEVA E.I.¹, MYADELETS N.Y.²

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

²Vitebsk State Medical College, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2018;17(2):37-46.

Резюме.

Введение. Изучение стволовых клеток (СК) кожи затруднено из-за отсутствия надежных критериев. Достоверными являются иммуногистохимические методы, требующие, однако, дорогостоящих реактивов. Щелочная фосфомоноэстераза (ЩФ) является одним из показателей тотипотентности эмбриональных стволовых клеток и плюрипотентности региональных стволовых клеток. Работ, посвященных описанию ЩФ-позитивных клеток в коже человека, недостаточно.

Цель исследования – выявить стволовые клетки в коже белых крыс в процессе постнатального онтогенеза с помощью ЩФ.

Материал и методы. Материалом для исследования явились полнослойные лоскуты кожи межлопаточной области белых крыс разных возрастов: новорожденные, 7-, 10-, 16-, 36- и 90-суточные. Из залитого в парафин материала готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином-эозином, ШИК-реакцией и орсеином. Из замороженного в жидком азоте материала готовили срезы, в которых выявляли активность ЩФ по методу М.Берстона.

Результаты. Установлено, что у новорожденных животных ЩФ-позитивные клетки немногочисленны в эпидермисе и волосяных фолликулах, но активность фермента высока в микрососудах дермы. Впервые в значительных количествах в эпидермисе и волосяных фолликулах фермент выявляется у 7-суточных животных. На 16-е и 36-е сутки жизни активность фермента в структурах кожи достигает максимума. В эпидермисе фермент обнаруживается не только в кератиноцитах базального, но и в шиповатом слое. Максимальная активность фермента выявлялась также в эпителии волосяных фолликулов, луковицы волосяного фолликула и в дермальном сосочке волоса.

Заключение. ЩФ является надежным критерием при выявлении всех видов региональных стволовых клеток кожи. В постнатальном онтогенезе обнаружены существенные изменения со стороны ЩФ-позитивных СК кожи. Параллельно с нарастанием морфогенетических процессов в эпидермисе, появлением, нарастанием количества СК происходит созревание базальной мембраны, в которой обнаруживаются участки, где окрашивание отсутствует. Они совпадают с участками отсутствия формазана в эпидермисе при выявлении ЩФ. В фазу анагена вокруг волосяных фолликулов появляется ЩФ-позитивный межклеточный матрикс, окружающий фолликулы. Волосяные сосочки и клетки волосяной луковицы (матрицы) в фазе анагена дают максимальную активность ЩФ.

Ключевые слова: кожа, региональные стволовые клетки, щелочная фосфомоноэстераза.

Abstract.

Introduction. The study of the skin stem cells is difficult due to the lack of reliable criteria. Immunohistochemical methods are reliable, however, they require expensive reagents. Alkaline phosphomonoesterase (AP) is one of the indicators

of totipotency of embryonic stem cells and pluripotency of regional stem cells. The amount of works devoted to the description of the AP-positive cells in the human skin is not enough.

Objectives. To identify stem cells in the skin of white rats in the process of postnatal ontogenesis with the help of AP.

Material and methods. The material of the study was full-layer skin flaps from the interblade area of white rats of different ages: newborns, of 7, 10, 16, 36 and 90 days. Paraffin sections were prepared from paraffin-embedded material, they were stained with hematoxylin-eosin, PAS-reaction and orsein. Slices were prepared from the frozen in liquid nitrogen material, then the activity of AP was detected in them by the method of M. Burstone.

Results. It has been established that in newborn animals, AP-positive cells are not numerous in the epidermis and hair follicles, but the activity of the enzyme is high in the microvessels of the dermis. For the first time the enzyme is detected in fair quantities in the epidermis and hair follicles, in 7-day animals. On the 16th and 36th day of their life, the activity of the enzyme in the structures of the skin reaches its maximum. In the epidermis, the enzyme is found not only in the keratinocytes of the basal, but also in the prickle-cell layer. The maximal activity of the enzyme was also detected in the epithelium of the hair follicles, bulb of the hair follicle and in the dermal papilla of the hair.

Conclusions. AP is a reliable criterion in the identification of all types of regional stem cells of the skin. In postnatal ontogenesis, essential changes of the AP-positive skin stem cells (SC) have been revealed. In parallel with the growth of morphogenetic processes in the epidermis, the appearance and increase in the number of SC, maturation of the basement membrane occurs, in which areas are found where there is no staining. They coincide with the areas of formazan absence in the epidermis while detecting AP. In the anagen phase AP-positive intercellular matrix, surrounding the follicles, appears. Hair papillae and cells of the hair bulb (matrix) in the anagen phase demonstrate the maximal activity of AP.

Key words: skin; regional stem cells; alkaline phosphomonoesterase.

Многослойный плоский ороговевающий эпителий кожи (эпидермис) является самой поверхностной тканью организма многих животных и человека. В процессе эволюции эпидермис приобрел замечательное свойство – способность его клеток к ороговению и превращению в мертвые роговые чешуйки – корнеоциты, которые обладают высокой устойчивостью к различным повреждающим факторам. В эпидермисе, как и в других многослойных эпителиях, существует так называемая стратификация – расслоение клеточных пластов в результате дифференцировки кератиноцитов при перемещении в вертикальном направлении. В базальном слое эпидермиса находятся стволовые клетки, которые тесно связаны с базальной мембраной. Это взаимодействие обеспечивает поляризацию базальных кератиноцитов, т.е. образование двух различных по строению клеточных полюсов (один из генеральных признаков эпителиев).

Важным качеством эпидермиса как ткани является поддержание тканевого гомеостаза. Тканевый гомеостаз эпидермиса обеспечивается следующими факторами: 1) делением стволовых клеток; 2) клеточной дифференцировкой; 3) перемещением клеток в вертикальном направлении; 4) апоптозом и слущиванием роговых чешуек с поверхности.

Важнейшим звеном в реализации тканевого гомеостаза в эпидермисе является клеточное

воспроизводство путем деления эпидермальных стволовых клеток (ЭСК). Как указывает Попов Б.В. (2010), в эпидермисе содержатся два вида клеток, способных к митотическому делению и играющих важную роль в регенераторных процессах: 1) редко делящиеся региональные эпидермальные стволовые клетки (РЭпСК) с высокими способностями к самоподдержанию и способностью к терминальной дифференцировке; 2) пролиферирующие транзиторные клетки. Клетки первой группы лежат на базальной мембране и тесно с ней взаимодействуют не только механически (с помощью полудесмосом), но и с помощью набора адгезионных молекул, таких как интегрины $\alpha 6$, $\beta 1$, катенины и др. Кроме того, у этих клеток имеются такие маркеры, как транскрипционные факторы Tcf-3 dN-p63 α , а также цитокератины 5, 14 [1].

Образующимися в результате деления этих клеток дочерними клетками формируется вторая группа (субпопуляция) способных к делению клеток – транзиторные клетки эпидермиса. Последние совершают 3-5 делений и в дальнейшем приступают к терминальной дифференцировке. Митотическая активность базальных клеток зависит от толщины эпителиального пласта и контролируется гормонами и факторами роста [1]. Если говорить традиционным языком гистологии, то эти два вида, способных к митотическому делению клеток, формируют так называемый

ростковый слой эпидермиса (слой Мальпиги) [2].

Как указывают Е.А. Воротеляк и В.В. Терских (2009), изучение стволовых клеток эпидермиса затруднено из-за отсутствия надежных критериев [3]. Считается, что стволовые клетки (СК) имеют упрощенное строение, высокое ядерно-цитоплазматическое отношение и незначительное содержание органелл. Однако одни только морфологические методы исследования не могут позволить достоверно установить указанные клетки. В этом отношении более достоверными являются иммуногистохимические методы с выявлением цитокератинов K5, K14, K19 и белка p63. Последний является транскрипционным фактором и экспрессируется не только стволовыми кератиноцитами, но и частью транзиторных клеток. Показано, что изоформы p63 являются необходимыми для морфогенеза эпидермиса, в частности, для начала его стратификации. Эти изоформы необходимы также для поддержания целостности базальной мембраны и формирования шиповатого слоя эпидермиса [1, 2].

Щелочная фосфомоноэстераза (ЩФ) является одним из показателей тотипотентности эмбриональных стволовых клеток и плюрипотентности стромальных стволовых клеток [4]. При культивировании стволовые клетки секретируют в культуральную среду щелочную и кислую фосфомоноэстеразы, а также другие факторы. ЩФ является наиболее точным маркером стволовых клеток. Поэтому в коже максимальная экспрессия этого фермента определяется в раннем анагене. Она является индикатором индукционной способности дермального сосочка, а также эпидермиса и эпителия волосяного фолликула. Однако в культуре клеток со временем многие белки, характерные для интактных клеток дермального сосочка, в том числе и ЩФ, практически не определяются, и индукционный потенциал клеток исчезает. Это связывают с изменением клеточного микроокружения в культуре ткани. Очевидно, это же происходит и по мере завершения в коже морфогенетических процессов. Экспрессия щелочной фосфомоноэстеразы указывает в основном на то, что в клетках идет процесс репрограммирования, но не обязательно отражает полностью репрограммированное состояние. Таким образом, выявление ее с помощью гистоэнзимологических реакций может позволить достаточно полно судить о наличии стволовых клеток и морфогенетических процессах в коже.

Целью настоящего исследования явилось выявление стволовых клеток в коже белых крыс в

процессе постнатального онтогенеза с помощью фермента щелочной фосфомоноэстеразы.

Материал и методы

Материал для настоящего исследования был получен в ходе выполнения экспериментов в период времени с 1980 по 1987 г. и в последующем по некоторым соображениям был использован не в полной мере. В связи с резко возросшим в настоящее время интересом к стволовым клеткам тканей, в том числе и к региональным стволовым клеткам кожи в частности, возникла необходимость вернуться к полученным ранее материалам и рассмотреть их с точки зрения учения о стволовых клетках кожи. Поскольку материал был задокументирован, в том числе и фотографически и заархивирован, это оказалось несложным.

Материалом для исследования явились полнослойные лоскуты кожи межлопаточной области белых беспородных крыс разных возрастов: 0 суток (новорожденные), 7-, 10-, 16-, 36- и 90- суточные. Образцы кожи разрезали на 2 части. Одну часть помещали на полоску фильтровальной бумаги, к которой кожа в силу адгезивных свойств соединительной ткани прочно прилипала, маркировали и помещали в фиксатор Буэна на 24 ч. Из этой части образцов готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином-эозином, ШИК-реакцией и орсеином. Вторую часть образцов вместе с маркировочной полоской фильтровальной бумаги заворачивали в кусочек тонкой фольги и помещали в сосуд Дьюара с жидким азотом ((температура жидкого азота составляет -190°C). Спустя некоторое время замороженный материал переносили в криостат, где готовили срезы толщиной 10 мкм, помещали их на предметные стекла и фиксировали нанесением на них нескольких капель ацетона. ЩФ выявляли методом азосочетания по М. Берстону с использованием фосфата нафтола AS-MX и прочного синего RR. Это сочетание красителей является наилучшим для выявления ЩФ в коже [5]. Гистопрепараты подвергались микрофотографированию и архивированию. Излагаемый в настоящей статье материал ранее не публиковался.

Результаты и обсуждение

Кожа новорожденных крысят представляет собой сильно недоразвитый орган, имеющий вид

тонкой полупрозрачной пленки, через которую просвечиваются кровеносные сосуды. Она содержит неразвитые зачатки волос и не содержит сальных желез. Волосяной покров отсутствует.

Эпидермис у новорожденных животных толстый и состоит из 5-7 рядов клеток, а также рогового слоя и является более толстым, чем у крыс других возрастов. Один, нижний, ряд является базальным слоем, 2-3 ряда включают шиповатый и 3-4 ряда – зернистый слой клеток с большим количеством гранул кератогиалина разной величины. Роговой слой достаточно хорошо развит, рыхлый (рис. 1). Активность щелочной фосфоэстеразы в эпидермисе на большем протяжении отсутствует и выявляется в единичных кератиноцитах.

Граница между эпидермисом и дермой ровная из-за того, что эпидермис не формирует гребешков, отсутствуют и сосочки дермы. Дермо-эпидермальное соединение (базальная мембрана) эпидермиса при окраске по методу ШИК и орсеином бледная, тонкая, часто размытая, неотчетливая или прерывистая (рис. 2). Дерма тонкая, имеет клеточное строение, при этом основными клетками в ней являются фибробласты с признаками функциональной активности. Волокнистый аппарат не выражен. Разделение дермы на сосочковый и сетчатый слои отсутствует. В дерме находятся зачатки многочисленных волосяных фолликулов, которые не достигают поверхности эпидермиса. ЩФ в волосяных фолликулах не выявляется. Она выявляется с максимальной степенью выраженности в микрососудах дермы, которые являются практически единственными фосфатазопозитив-

ными структурами в этот срок (рис. 3).

Спустя 7 суток после рождения крысят в эпидермисе и волосяных фолликулах появлялись фосфатазопозитивные клетки, локализующиеся в базальном слое эпидермиса и наружном волосяном влагалище. И те, и другие давали умеренно выраженную реакцию на фермент. К этому времени волосяной покров животных достаточно выражен, благодаря ему кожа имеет специфический бархатистый вид. В это время в эпидермисе уменьшалось количество клеточных рядов в шиповатом и зернистом слоях. В дерме отмечалась активация процессов фолликулогенеза. Количество фибробластов в ней возрастало, появлялись коллагеновые фибриллы значительной толщины и отдельные тучные клетки.

На 16-е сутки жизни у животных сформировался достаточно выраженный, длинный и густой волосяной покров. Толщина эпидермиса, а также активность и распространенность выявления щелочной фосфоэстеразы в нем возрастали. Фермент выявлялся не только в кератиноцитах базального, но и в клетках нижних рядов шиповатого слоев. Однако распределение фермента как в базальном, так и шиповатом слоях эпидермиса было неравномерным, участки его высокой активности чередовались с участками ее отсутствия. Базальная мембрана эпидермиса при окрасках ШИК-реакцией и орсеином становилась отчетливой, интенсивно окрашенной, однако участки снижения интенсивности или отсутствия окрашивания в ней сохранялись (рис. 4). При этом данные участки совпадали с участками отсутствия в кератиноцитах эпидермиса активности ЩФ.

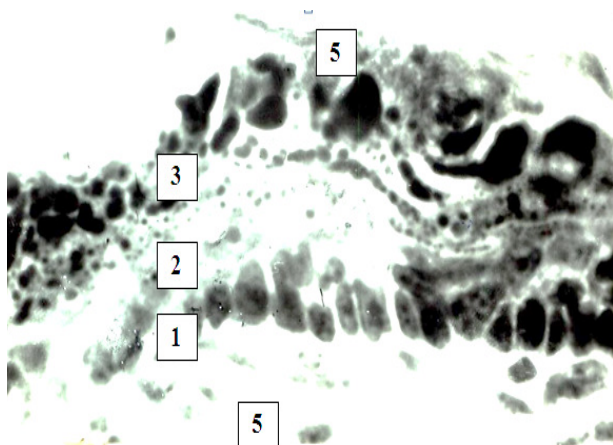


Рисунок 1 – Кожа новорожденных крысят. Гематоксилин и эозин. х400: 1 – базальный, 2 – шиповатый, 3 – зернистый, 4 – роговой слой эпидермиса; 5 – дерма.

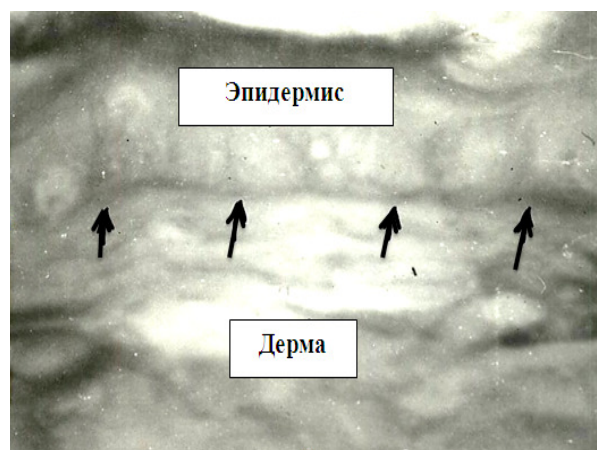


Рисунок 2 – Базальная мембрана эпидермиса кожи новорожденных крысят. ШИК-реакция. х600. Стрелками указано дермо-эпидермальное соединение (базальная мембрана).

Толщина дермы увеличивалась, появлялись достаточно толстые волокна в сетчатом слое, и формировался сосочковый слой. Помимо фибробластов, в дерме обнаруживались макрофаги и тучные клетки. Волосяные фолликулы находились в фазе анагена. В них в наружном корневом влагалище выявлялась достаточно высокая активность щелочной фосфомоноэстеразы, которая определялась также и в волосяном сосочке, причем в последнем в максимальном объеме – до сплошного темно-синего цвета. Вокруг формирующихся во-

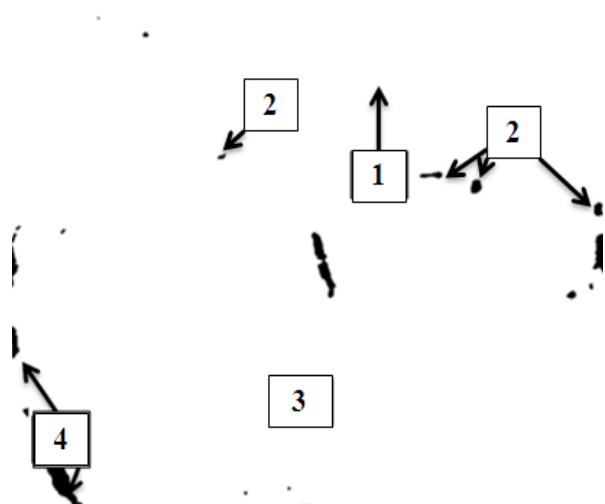


Рисунок 3 – Щелочная фосфатаза в эпидермисе новорожденных крысят выявляется в единичных базальных кератиноцитах эпидермиса. Максимально она выявляется в гемокапиллярах дермы кожи.

Метод М. Берстона. $\times 100$: 1 – эпидермис; 2 – единичные ЩФ-позитивные кератиноциты в базальном слое эпидермиса; 3 – гемокапилляры; 4 – ЩФ-позитивные микрососуды в дерме.

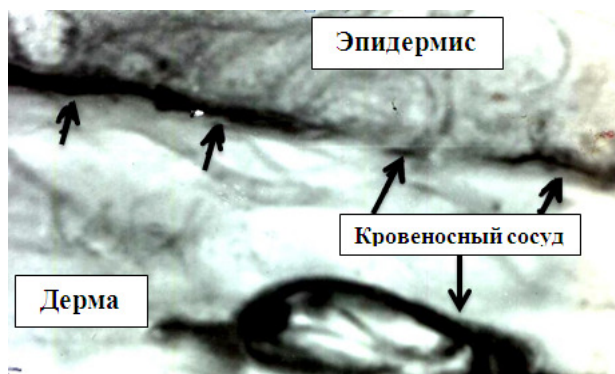


Рисунок 4 – Базальная мембрана эпидермиса (дермо-эпидермальное соединение) у крысят на 16-е сутки жизни. ШИК-реакция. $\times 400$. Стрелки указывают на интенсивно окрашенные участки, между которыми находятся слабо окрашенные участки.

лосяных фолликулов появлялись участки ЩФ-позитивного внеклеточного матрикса.

Наиболее выраженные морфогенетические процессы в коже крыс происходили на 36-е сутки жизни. К этому времени волосяной покров у животных по морфологическим признакам во многом напоминал таковой у взрослых животных. Толщина эпидермиса снижалась, он приобретал вид эпидермиса взрослых крыс. В то же время, в эпидермисе часто обнаруживались митотически делящиеся клетки (рис. 5), что свидетельствует о продолжающихся морфогенетических процессах.

В это время в эпидермисе и наружном корневом влагалище волосяных фолликулов существенно возрастала активность щелочной фосфомоноэстеразы (рис. 6). При этом она выявлялась неравномерно: в отдельных участках носила сливной характер, когда невозможно было определить границы отдельных клеток. При этом иногда гранулы формазана выявлялись и в клеточных ядрах (это, возможно, является артефактом, поскольку обычно указывается, что ядра клеток не содержат этот фермент. Вместе с тем, Э. Пирс (1960) считает, что ЩФ в ядре все же определяется. В других же участках фермент выявлялся в минимальном количестве. В некоторых участках ЩФ определялась только в базальном слое, однако чаще он обнаруживался и в клетках нижних рядов шиповатого слоя (транзиторных клетках). В эпителии волосяных фолликулов характер распределения активности ЩФ был похож на таковой в интерфолликулярном эпителии (рис. 6).

Интенсивно окрашенных на фермент участков межклеточного вещества было значи-

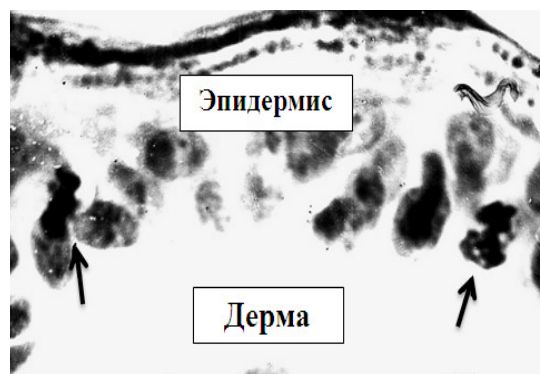


Рисунок 5 – Митотически делящиеся клетки в эпидермисе 36-суточных крыс (показаны стрелками). Гематоксилин и эозин. $\times 600$.

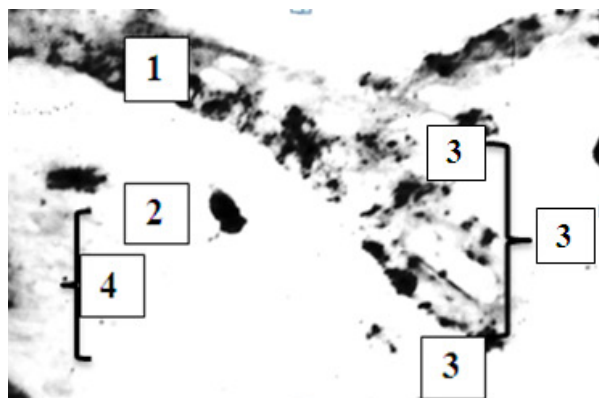


Рисунок 6 – Эпидермис 36-суточных животных.

Щелочная фосфоноэстераза в эпидермисе и эпителии волосяных фолликулов.

Метод М. Берстона. х400.

- 1 – эпидермис; 2 – фосфатазопозитивные микрососуды в дерме; 3 – волосяной фолликул; 4 – фосфатазопозитивное межклеточное вещество.

тельно больше, чем слабо окрашенных или неокрашенных совсем.

Как известно, эпителий волосяного фолликула представляет собой своеобразный инвагинат (дубликатуру) росткового слоя эпидермиса (его базальный и шиповатый слой). Фермент с высокой активностью выявлялся в основном в слоях наружного корневого влагалища, обращенных к дерме (в базальном и наружных рядах шиповатого слоев), т.е. в тех же слоях, что и в эпидермисе. Реже фермент определялся в клетках наружного влагалища, непосредственно прилежащих к внутреннему волосяному влагалищу. Кроме того, максимальная активность фермента обнаруживалась в волосяных сосочках формирующихся волос и волосяной луковице. В дерме на 36-е сутки выявлялась максимальная активность ЩФ в гемомикрососудах.

Таким образом, обнаружено явление, не обсуждавшееся ранее в доступной литературе. Оно заключается в том, что на 16-36-е сутки жизни животных установлена достаточно выраженная (особенно на 36-е сутки жизни животных) положительная реакция на ЩФ внеклеточного матрикса дермы (рис. 6). Чаще это окрашивание локализовалось в области расположения волосяных фолликулов, окружая их в виде своеобразной муфты, однако такие участки встречались и в других зонах. Возможно, это те участки, максимум активности фермента в которых оказался в других срезах препарата.

Как уже упоминалось, щелочная фосфо-

ноэстераза является одним из показателей тотипотентности эмбриональных стволовых клеток и плюрипотентности стромальных стволовых клеток. Ее определение используется для визуализации указанных клеток. Так, С.С. Целуйко и соавт. (2014, 2017) с помощью ЩФ выявляли стволовые клетки эпителия трахеи при воздействии на организм низких температур и показали усиление при этом регенераторных свойств эпителия на фоне введения антиоксидантных препаратов дигидрокверцитина и арабиногалактана [6, 7]. При культивировании стволовые клетки секретируют в культуральную среду щелочную и кислую фосфатазы и другие факторы. Щелочная фосфатаза является наиболее точным маркером стволовых клеток. Поэтому в коже наибольшая экспрессия этого фермента определяется в раннем анагене. Она является индикатором индукционной способности дермального сосочка, а также эпидермиса и эпителия волосяного фолликула под воздействием регуляторных факторов [4]. Однако в культуре клеток со временем многие белки, характерные для интактных клеток дермального сосочка, в том числе и щелочная фосфоноэстераза, практически не определяются, и индукционный потенциал клеток исчезает. Это связывают с изменением клеточного микроокружения в культуре ткани. Очевидно, это же происходит и по мере завершения в коже морфогенетических процессов. Экспрессия ЩФ указывает в основном на то, что в клетках идет процесс репрограммирования, но не обязательно отражает полностью репрограммированное состояние [4].

Сказанное выше, возможно, объясняет тот факт, почему у новорожденных животных при наличии в дерме большого количества зачатков волосяных фолликулов щелочная фосфоноэстераза в них и в эпидермисе отсутствует. Это может быть связано с изменением микроокружения стволовых клеток, поскольку сам факт рождения является для организма животных сильным стрессирующим состоянием. Поэтому стволовые клетки эпидермиса и волосяных фолликулов переходят в неактивное состояние, и процессы морфогенеза эпидермиса и фолликулогенеза, начавшиеся и происходившие во внутриутробном периоде (о чем свидетельствует большая толщина эпидермиса и зачатков волосяных фолликулов в дерме), временно остановились. Произошло также подавление активности щелочной фосфоноэстеразы. В последующие сроки, уже в постнатальном периоде, на 7-36-е сутки жизни, происходила постепенная адаптация крысят к существованию вне

материнского организма, сопровождавшаяся суперактивацией процессов морфогенеза и резким возрастанием активности ЩФ.

В связи с обнаружением при выявлении ЩФ в коже интенсивного окрашивания межклеточного вещества дермы вокруг формирующихся волосных фолликулов можно предположить, что при формировании волос в раннем постнатальном онтогенезе задействована не только щелочная фосфомоноэстераза кератиноцитов, но и ЩФ, секретируемая клетками во внеклеточный матрикс, и данный фермент становится важным участником формирования волосных фолликулов, воздействуя на события в дифференцирующихся клетках извне. Это предположение, на наш взгляд, подтверждается отмеченным выше фактом, что при культивировании вне организма стволовые клетки секретируют в культуральную среду щелочную и кислую фосфатазы и другие факторы [4]. На наш взгляд, клетками, осуществляющими секрецию щелочной фосфомоноэстеразы, могут быть фибробласты, адипоциты, не исключено участие и других клеток.

Одним из кандидатов на источники щелочной фосфатазы может являться белая жировая ткань (БелЖТ). Во-первых, кожа является местом самых крупных скоплений этой ткани: ею сформирован один из самых протяженных слоев органа – гиподерма. Кроме того, жировая ткань из гиподермы на значительном протяжении проникает и в дерму [5, 8]. Вокруг волосных фолликулов, сальных и потовых желез (т.е. источников стволовых клеток) она образует мощные муфты. Во-вторых, жировая ткань очень богата снабжена кровеносными микрососудами, территория вокруг которых является излюбленным местом локализации стволовых клеток. В-третьих, уже давно (Н.Н. Аничков и соавт., 1951 и др.) было показано, что жировая ткань активно участвует в регенераторном процессе в коже. В ней в первой появляются клетки воспалительного инфильтрата и тонкостенные кровеносные микрососуды. На основе этой ткани формируется грануляционная соединительная ткань, являющаяся морфогенетически активной тканью. При разворачивании раневого процесса в коже в воспалительные и новообразовательные изменения последовательно вовлекаются все новые порции БелЖТ, которая становится грануляционной тканью, давая, как известно, новые фибробласты.

В-четвертых, БелЖТ – самообновляющаяся ткань, состоящая из: 1) основных клеток -

адипоцитов, 2) клеток стромально-васкулярной клеточной фракции (СВКФ) и 3) межклеточного вещества [9]. В состав СВКФ входят стволовые клетки жировой ткани, являющиеся ключевым его компонентом, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перициты, фибробласты, а также находящиеся внутри сосудов форменные элементы крови. Содержание в жировой ткани взрослого человека стволовых клеток наибольшее по сравнению с другими их источниками. Так, в частности, в 1 см³ БелЖТ содержится в 100-1000 раз больше стволовых клеток, чем в 1 см³ костного мозга [9].

Как видно из собственных исследований, при формировании волосного покрова структурно оформлялась и базальная мембрана эпидермиса. Она давала интенсивную фуксинофилию при проведении ШИК-реакции.

Появление фосфатазопозитивных кератиноцитов в эпидермисе сопровождалось усилением окраски базальной мембраны (дермо-эпидермального соединения). В связи с этим следует привести следующие литературные данные, суммированные в прекрасном обзоре Е.А. Воротеляк и В.В. Терских [3]. При дифференцировке кератиноцитов базального слоя они теряют контакт с базальной мембраной в результате того, что на их плазмолеммах уменьшается количество интегринов $\alpha 6$ и $\beta 1$. Происходит также замена цитокератинов 5 и 14 на цитокератины 15 и 19. В последнее время установлено, что региональные эпидермальные СК содержат транскрипционный фактор р63, который может являться маркером стволовых клеток эпидермиса и относится к семейству белков, включающих белки р53 и р73. Он является важнейшим белком в отношении морфогенеза эпидермиса. Мыши, лишённые этого белка, не способны к стратификации эпидермиса, т.е. не могут формировать слои и базальную мембрану. Их эпидермис состоит из терминально дифференцированных кератиноцитов, расположенных непосредственно на дерме. Показано (M.I. Koster et al., 2007), что на начальных стадиях морфогенеза эпидермиса изоформа р63 α индуцирует экспрессию компонента внеклеточного матрикса FrasI, необходимого для поддержания целостности базальной мембраны, а затем – экспрессию киназы ИКК α , обеспечивающую формирование шиповатого слоя.

Таким образом, появление и увеличение количества фосфатазопозитивных кератиноцитов

в эпидермисе могут являться одним из условий для созревания базальной мембраны эпидермиса, что и показано в настоящем исследовании.

На 90-е сутки жизни животных кожа имела строение, характерное для половозрелых крыс. В это время у животных наблюдалась смена волос и большинство фолликулов находились в фазе роста, т.е. анагена. При этом в эпидермисе и волосяных фолликулах выявлялась высокая активность ЩФ. Кроме того, фермент выявлялся не только в эпителии наружного корневого влагалища, но и (с максимальной активностью) в волосяной луковице и дермальном волосяном сосочке (рис. 7, 8). При этом окрашивание в них было настолько интенсивным и носило настолько сливной характер, что различить отдельные структуры как в сосочке, так и в волосяной матрице было невозможно. Это позволяет предположить, что окрашивание захватывает не только клетки волосяного сосочка, но и его внеклеточного матрикса.

Как указывают Е.А. Воротеляк и В.В. Терских [3], в настоящее время накоплено много убедительных доказательств того, что мультипотентные стволовые клетки эпидермиса сконцентрированы в волосяном фолликуле, т.е. защищены от вредных факторов внешней среды местоположением. Неопровержимым подтверждением этого является тот факт, что неглубокие

раны кожи заживают только при размножении стволовых клеток волосяного фолликула, потомки которых мигрируют вверх и эпителизируют рану. Однако через несколько недель после заживления раны меченые потомки фолликулярных стволовых клеток из эпидермиса исчезают.

Поэтому предполагается, что в волосяном фолликуле содержатся стволовые клетки, которые осуществляют экстренную репарацию эпидермиса, быстро восстанавливая дефект кожи за счет генерации популяции короткоживущих транзиторных клеток для временного восстановления дефекта. В условиях нормы регенерация эпидермиса осуществляется за счет его собственных стволовых клеток. На основании этого сделан вывод, что в эпителии кожи содержится иерархия стволовых клеток с разным пролиферативным потенциалом, причем клетки с наибольшим потенциалом находятся в эпителии волосяных фолликулов [3].

Как оказалось, развитием волосяных фолликулов управляет один из костных морфогенетических белков (КМБ или BMP, «Bone morphogenetic protein»), который находится в клетках волосяного сосочка и кодируется соответствующим геном [10, 11]. Этот белок во многом определяет биохимический «портрет» клеток волосяного сосочка. Он является цитокином, и его главная функция – регуляция развития костной и хрящевой тканей.

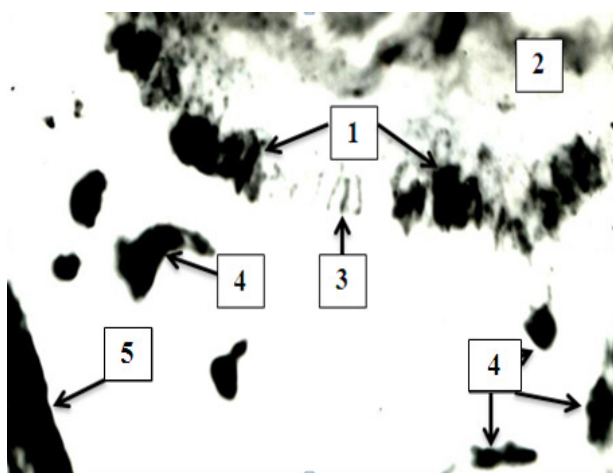


Рисунок 7 – Щелочная фосфатаза в коже 90-суточных крыс. Метод азосочетания по М. Берстону. x400:

- 1 – базальный слой эпидермиса, участки с максимальной активностью ЩФ;
- 2 – роговой слой эпидермиса (отслоен);
- 3 – микрососуды с максимальной активностью фермента;
- 4 – волосяной фолликул с максимальной активностью фермента в наружном корневом влагалище.

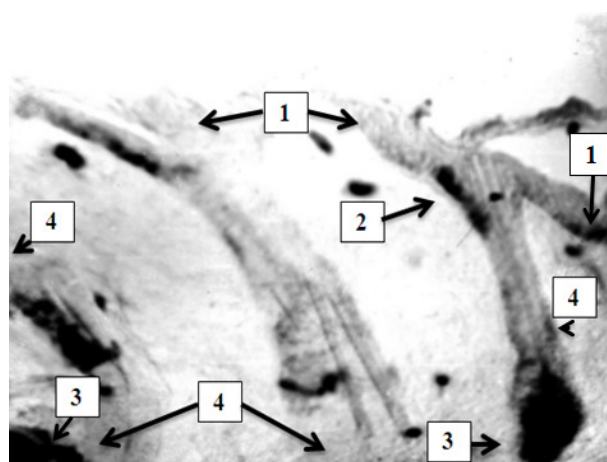


Рисунок 8 – Кожа крысы на 90-е сутки жизни.

- Щелочная фосфатаза. Метод азосочетания по М. Берстону. x100: 1 – эпидермис; справа – активность фермента отсутствует, слева – высокая активность фермента; 2 – высокая активность ЩФ в наружном корневом влагалище в области волосяной воронки; 3 – максимальная активность ЩФ в волосяном фолликуле; 4 – ЩФ-позитивный внеклеточный матрикс вокруг волосяных фолликулов.

Как выяснилось, кроме участия в формировании опорно-двигательной системы, белки КМБ играют роль в регуляции дифференцировки и пролиферации эпителиальных стволовых клеток, как во взрослом организме, так и в эмбриогенезе.

Роль костного морфогенетического белка 6 (КМБ-6) была установлена в результате экспериментального исследования активности различных веществ, в норме присутствующих в тканевой «нише» волосяного фолликула [10, 11]. В качестве биохимического признака клеток волосяного фолликула авторы выбрали активность щелочной фосфатазы, которая сохранялась длительное время только при воздействии КМБ, но не любого другого из 23 протестированных авторматериалов. При обработке КМБ других клеток (например, дермальных фибробластов или остеобластов), также содержащих активную щелочную фосфоэстеразу и другие характерные для клеток волосяного сосочка белки, активность этих генов волосяного сосочка, отвечающих за развитие волос, практически не изменяется.

Как известно, волосяной сосочек представлен рыхлой соединительной тканью, отличающейся по строению от рыхлой соединительной ткани другой локализации. В ней существенно преобладают клетки и основное вещество, тогда как волоконный состав скудный [5]. Из клеток в нем находятся в основном фибробласты. Следовательно, источником ЩФ в волосяном сосочке могут являться фибробласты и их предшественники, т.е. стволовые клетки фибробластов. Поскольку окраска на ЩФ дермального волосяного сосочка сплошная и максимальная, и клетки в нем не выявляются, то можно предположить, что межклеточное вещество его также является ЩФ-позитивным. Топографически волосяной фолликул располагается в непосредственной близости к камбиальным клеткам волосяной луковицы, обеспечивающим рост волос в длину, и волосяной сосочек считается продуцентом индукторов для этих клеток [10, 11]. Одним из таких индукторов может являться щелочная фосфоэстераза дермального волосяного сосочка.

Заключение

1. Щелочная фосфоэстераза является надежным критерием при выявлении всех видов региональных мезенхимальных стволовых клеток кожи. Ее определение позволяет подробнее изучить морфогенез эпидермиса в постнатальном периоде онтогенеза.

2. В процессе постнатального онтогенеза белых крыс обнаружены существенные изменения со стороны СК кожи. У новорожденных животных ЩФ выявляется в основном в микрососудах дермы и в единичных кератиноцитах базального слоя эпидермиса. Спустя 7 сут после рождения в эпидермисе и в наружном корневом влагалище появляются очаги фосфатазопозитивных кератиноцитов, локализующихся в основном в базальном слое. В последующие сутки жизни (16-90-е сут) ЩФ-позитивные кератиноциты обнаруживаются и в клетках шиповатого слоя. В фазу анагена активность ЩФ и количество фосфатазопозитивных кератиноцитов резко возрастает.

3. Параллельно с нарастанием морфогенетических процессов в эпидермисе происходит созревание базальной мембраны, где обнаруживаются участки, в которых окрашивание отсутствует. Эти участки совпадают с участками отсутствия формазана в эпидермисе при выявлении щелочной фосфоэстеразы.

4. В фазу анагена вокруг волосяных фолликулов появляется ЩФ-позитивное межклеточное вещество, которое охватывает фолликулы в виде муфты. В межфолликулярных участках окраска его либо существенно ниже, либо она отсутствует.

5. Волосяные фолликулы и клетки волосяной луковицы (матрицы) в фазе анагена дают максимальную активность ЩФ. При этом окрашивание двух этих структур дает сплошной сливной характер, что позволяет предположить окрашивание не только клеток сосочка, но и его межклеточного вещества.

6. Можно предположить, что ЩФ, демонстрирующая наличие в коже стволовых клеток, является индуктором в ней морфогенетических процессов.

Литература

1. Попов, Б. В. Введение в клеточную биологию стволовых клеток : учеб.-метод. пособие / Б. В. Попов. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 319 с.
2. Заварзин, А. А. Сравнительная гистология / А. А. Заварзин. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2000. – 520 с.
3. Воротеяк, Е. А. Стволовые клетки эпителиальных тканей / Е. А. Воротеяк, В. В. Терских // Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. – М. : Медицина, 2009. – Т. 2. – С. 53–74.
4. Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния / И. А. Мучкаева [и др.] // Acta Nature. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 48–57.
5. Руководство по изучению кожного покрова млекопитающих / под ред. В. Е. Соколова, Р. П. Женева. – М. :

Наука, 1988. – 280 с.

6. Целуйко, С. С. Гистохимическая локализация кислой и щелочной фосфатаз в эпителии трахеи при холодном воздействии / С. С. Целуйко, Н. П. Красавина // Бюл. физиологии и патологии дыхания. – 2017. – Вып. 66. – С. 34–40.
7. Влияние природных антиоксидантов на регенерацию эпителия слизистой оболочки трахеи при общем охлаждении организма / С. С. Целуйко [и др.] // Дальневосточ. мед. журн. – 2014. – № 1. – С. 95–99.
8. Мяделец, О. Д. Морфофункциональная дерматология / О. Д. Мяделец, В. П. Адашкевич. – М. : Мед. лит., 2006. – 752 с.
9. Парфенова, Е. В. Стромальные клетки жировой ткани:

молекулярная характеристика, антигенные свойства и перспективы использования для терапии сердечно-сосудистых заболеваний / Е. В. Парфенова, Д. О. Трактеев, В. А. Ткачук // Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. – М. : Медицина, 2009. – Т. 2. – С. 4–35.

10. Rendl, M. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties / M. Rendl, L. Polak, E. Fuchs // Genes Dev. – 2008 Feb. – Vol. 22, N 4. – P. 543–557.
11. Rendl, M. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle / M. Rendl, L. Lewis, E. Fuchs // PLoS Biol. – 2005 Sep. – Vol. 3, N 11. – P. e331.

Поступила 06.03.2018 г.

Принята в печать 29.03.2018 г.

References

1. Popov BV. Introduction into cell biology of stem cells: ucheb-metod posobie. Saint-Petersburg: SpetsLit; 2010. 319 p. (In Russ.)
2. Zavarzin AA. Comparative histology. Saint-Petersburg: Izd-vo S-Peterb un-ta; 2000. 520 p. (In Russ.)
3. Vorotelyak EA, Terskikh VV. Stem cells of epithelial tissues. V: Pal'tsev MA, red. Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii. Moscow, RF: Meditsina; 2009. T 2. P. 53-74. (In Russ.)
4. Muchkaeva IA, Dashinimaev EB, Artyukhov AS, Myagkova EP, Vorotelyak EA, Egorov EE, i dr. Reprogramming of human dermal papilla cells to pluripotent state. Acta Nature. 2014;6(1):48-57. (In Russ.)
5. Sokolov VE, Zhenevskaya RP. Guide to the study of the skin of mammals. Moscow, RF: Nauka; 1988. 280 p. (In Russ.)
6. Tseluyko SS, Krasavina NP. Histochemical localization of acid and alkaline phosphatase in the epithelium of the trachea during cold exposure. Biul Fiziologii Patologii Dykhaniia. 2017; Vyp 66:34-40. (In Russ.)

7. Tseluyko SS, Gorbunov MM, Namakonova VS, Krasavina NP. The effect of natural antioxidants on the regeneration of the epithelium of the tracheal mucosa in General cooling of the body. Dal'nevostoch Med Zhurn. 2014;(1):95-9. (In Russ.)
8. Myadelets OD, Adaskevich VP. Morphological dermatology. Moscow, RF: Med lit; 2006. 752 p. (In Russ.)
9. Parfenova EV, Traktuev DO, Tkachuk VA. Adipose tissue stromal cells: molecular characteristics, antigenic properties and prospects for use in the treatment of cardiovascular diseases. V: Pal'tsev MA, red. Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii. Moscow, RF: Meditsina; 2009. T 2. P. 4-35. (In Russ.)
10. Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. Genes Dev. 2008 Feb;22(4):543-57. doi: 10.3410/f.1108862.566008
11. Rendl M, Lewis L, Fuchs E. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. PLoS Biol. 2005 Sep;3(1):e331. doi: 10.1371/journal.pbio.0030331

Submitted 06.03.2018

Accepted 29.03.2018

Сведения об авторах:

Мяделец О.Д. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Витебский государственный медицинский университет;

Лебедева Е.И. – к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Витебский государственный медицинский университет;

Мяделец Н.Я. – преподаватель гистологии и генетики, Витебский государственный медицинский колледж.

Information about authors:

Myadelets O.D. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Lebedeva E.I. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Myadelets N.Y. – lecturer of histology and genetics, Vitebsk State Medical College.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии. E-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Лебедева Елена Ивановна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Histology, Cytology & Embryology. E-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Elena I. Lebedeva.