

УДК 57.084.1

## ДЕРМАЛЬНЫЕ КИСТЫ УЧАСТВУЮТ В РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ЭПИДЕРМИСА У МЫШЕЙ ГЕНОТИПА $Hr^{hr}/Hr^{hr}$

© 2010 г. П. К. Головатенко-Абрамов, Е. А. Жиркова\*, Е. Г. Колокольчикова\*, В. С. Бочарова\*, Е. С. Платонов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

\* Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского

129010 Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3

E-mail: p.golovatenko@gmail.com

Поступила в редакцию 26.10.09 г.

Окончательный вариант получен 24.12.09 г.

Одним из фенотипических проявлений мутации в гене  $Hr$  у мыши является дезинтеграция волосяных фолликулов и их перерождение в незамкнутые воронкообразные образования (утрикулы), открывающиеся на поверхности кожи, и кисты, располагающиеся в толще дермы. Цель работы заключалась в изучении процесса репаративной регенерации кожи у мышей, гомозиготных по одному из мутантных аллелей гена  $Hr - Hr^{hr}$ . Показано, что эпителиальные клетки, составляющие внутреннюю выстилку кист, участвуют в процессе эпителизации глубоких ран кожи. Это свидетельствует о том, что компетенция эктодермальных клеток в отношении индуктивных сигналов, исходящих из травмированной кожи, сохраняется у мышей, гомозиготных по мутантному аллелю  $Hr^{hr}$ , несмотря на существенные анатомические аномалии волосяных фолликулов.

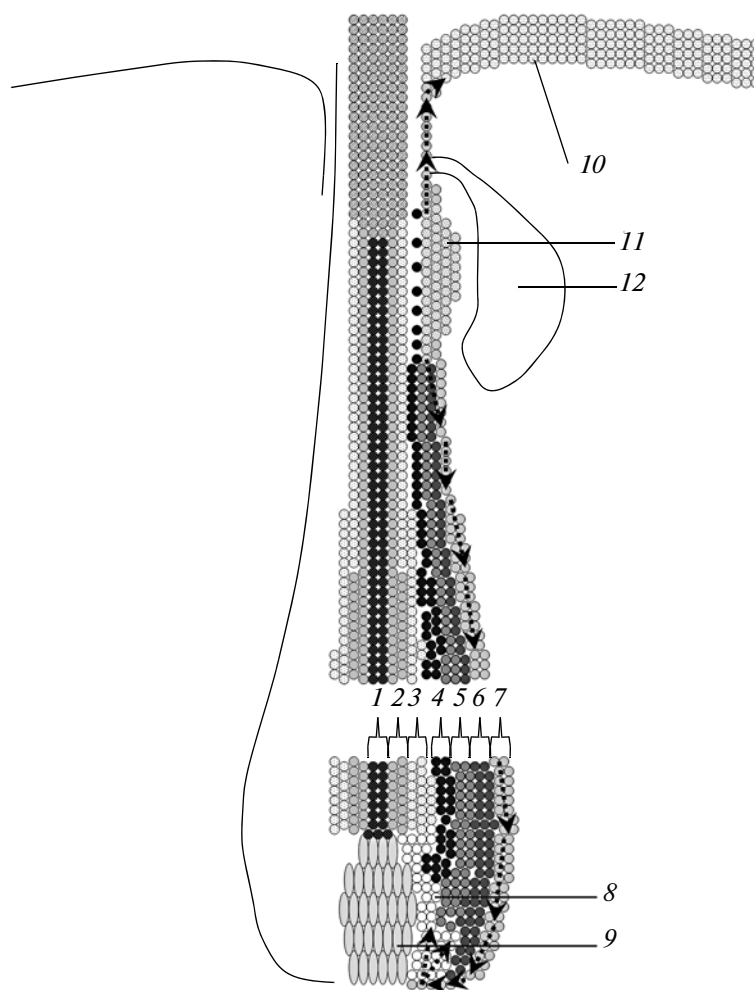
*Ключевые слова:* волосяные фолликулы, регенерация кожи.

Волосяной фолликул млекопитающих — сложная структурно-функциональная единица, в которой постоянно протекают процессы клеточной дифференцировки. Развитие волосяного фолликула начинается в эмбриогенезе и продолжается в циклической манере в течение всей жизни индивида. С самого рождения и до смерти волосяной фолликул подвергается повторяющимся стадиям роста (анаген), дегенерации (катаген) и покоя (телоген) (Chase et al., 1953). Такая периодичность обусловлена наличием в нем собственных камбиальных элементов — стволовых клеток (СК) волосяного фолликула, которые располагаются в области выпячивания наружного корневого влагалища (НКВ) (рис. 1). Вместе с сальной железой эту область не затрагивают постоянно сменяющие друг друга процессы дегенерации и роста (Paus, Cotsarelis, 1999). Однако так как именно эти клетки составляют основу для каждой следующей стадии роста фолликула, то и процессам, протекающим в их нише, также свойственна определенная периодичность. После очередной дегенерации структуры волосяного фолликула СК выпячивания подвергаются пролиферативной активации, после чего половина дочерних клеток спускается в область дермального сосочка, и волосяной фолликул снова начинает расти (Matsuzaki, 2008). Известно также, что СК волосяного фоллику-

ла участвуют не только в физиологической, но и в репаративной регенерации самого волосяного фолликула, а также сальной железы и даже межфолликулярного эпидермиса в случае травмы (Oshima et al., 2001; Blanpain et al., 2004; Morris et al., 2004).

Несмотря на определенные межвидовые различия в хронометраже морфогенетического цикла волосяного фолликула, основные его стадии и ключевые факторы, индуцирующие переходы между ними, очень консервативны. Поэтому мышь наряду с другими лабораторными животными является вполне адекватным модельным объектом для изучения особенностей развития и физиологии этого органа, а существование огромного числа мутантных линий мышей с наследственными нарушениями роста волос делает этих животных незаменимым инструментом в исследовании морфогенеза волосяного фолликула и разработке подходов к лечению заболеваний кожи и волос у человека.

Рецессивный мутантный ген  $hr$  (*hairless*) был впервые описан у мышей в 1926 г. (Brooke, 1926). Наиболее явным проявлением этого мутантного гена является полное и необратимое выпадение волос в течение первых трех недель жизни животного. Относительно недавно был охарактеризован нормальный аллель  $Hr$  этого гена у мыши (Cachon-Gonzalez



**Рис. 1.** Схема строения волосяного фолликула мыши: 1–3 – сердцевина, кора и кутикула волоса соответственно; 4 – кутикула внутреннего корневого влагалища, 5, 6 – слои Гексли и Генле, 7 – наружное корневое влагалище, 8 – матрикс луковицы волосяного фолликула, 9 – дермальный сосочек, 10 – эпидермис, 11 – выпячивание наружного корневого влагалища, 12 – сальная железа.

et al., 1994) и обнаружены его ортологи у других млекопитающих, в частности у человека (Ahmad et al., 1998). Были также охарактеризованы различные мутантные аллели этого гена (Zhang et al., 2005), однако во всех случаях фенотип животных, мутантных по гену *Hr*, характеризуется полным отсутствием волос на теле. Пантелеев с соавторами (Panteleyev et al., 1998) изучили особенности развития характерного мутантного фенотипа у мышей, гомозиготных по мутантному аллелю этого гена, и показали, что топография нормального волосяного фолликула полностью утрачивается. Алопеция наступает вследствие дезинтеграции волосяного фолликула и перерождения их фрагментов в незамкнутые воронкообразные образования (утрикулы), открывающиеся на поверхности эпидермиса, и кисты, располагающиеся в толще дермы. Однако клетки, составляющие дермальные кисты и утрикулы, продолжают экспрессировать определенные кератиоцитарные и специфичные для волосяного фолликула маркеры (Pan-

teleyev et al., 1998). В нашей работе мы решили выяснить, сохраняют ли клетки дермальных кист компетенцию, свойственную клеткам волосяного фолликула, при повреждении кожи мутантных животных на примере ожоговой и вырезанной ран.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Экспериментальные животные.** В работе использовали мышей *Mus musculus*, несущих в гомозиготе мутантный аллель *Hr<sup>hr</sup>* на генетическом фоне линии BALB/c, в возрасте 3–4 мес весом 20–25 г, а также рандомбредных мышей соответствующего возраста и веса.

**Техника нанесения травмы.** Животных наркотизировали авертином (2%-ный трибромэтанол в дозе 20 мкл/г веса животного). Экспериментальных животных разделили на две группы.

На спину мышей группы 1 (20 животных) при помощи металлической печатки диаметром 12 мм, нагретой до 95–100°C, в течение 8 с наносили ожог субдермальной глубины, соответствующий ожогу степени IIIa 3% поверхности тела (поражение всех слоев эпидермиса и части дермы). Время экспозиции нагретой печатки для получения ожога должной глубины было подобрано на основе морфологической оценки глубины поражения. Для предотвращения контракции раны к коже подшивали кольца диаметром 12 мм из поливинилхлорида. Сразу после нанесения ожога кожа в зоне поражения становилась белой, пузыри отсутствовали. Через 5–10 мин кожа розовела, происходила отслойка эпидермиса, который удаляли марлевым тампоном.

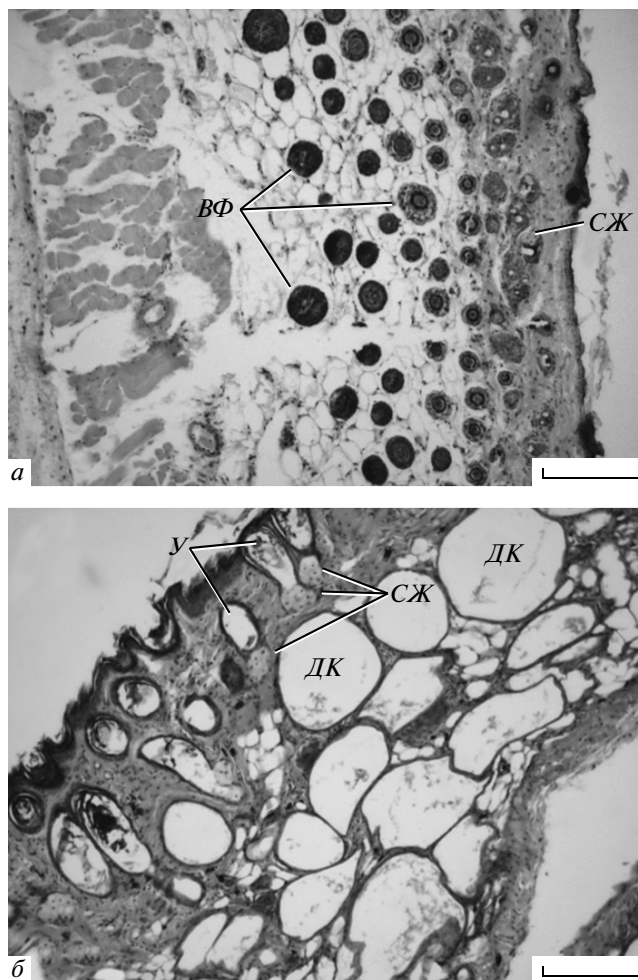
На спину мышей группы 2 (20 животных) наносили рану кожи размером приблизительно 10 × 10 мм с удалением эпидермиса и части дермы, чтобы глубина поражения соответствовала таковой в случае ожога степени IIIa.

**Морфологические исследования.** Для гистологического исследования материал (образцы ожоговой или вырезанной раны через 6 ч, а также на 1, 2, 5–7-е сут после травмы) фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Парафиновые срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

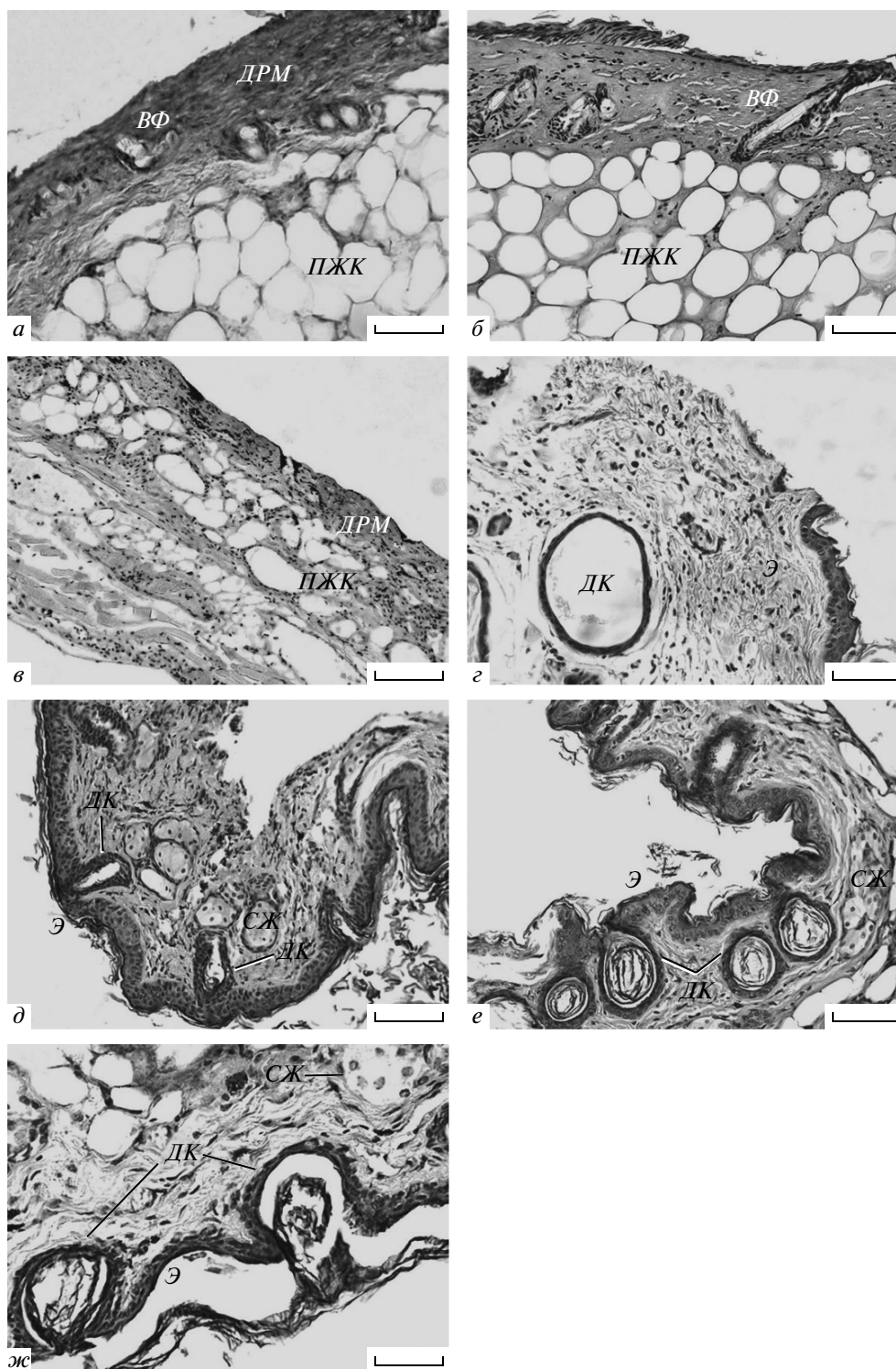
Алопеция, развивающаяся у мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$ , сопровождается дезинтеграцией волосяного фолликула и перерождением их частей в утрикулы на поверхности эпидермиса и кисты, располагающиеся на разной глубине в толще дермы. Эти аномальные структуры представлены в коже мутантных мышей 3-месячного возраста (рис. 2). В соответствии с гипотетическим сценарием, предложенным Пантелеевым с соавторами (Panteleyev et al., 1998), дермальные кисты и утрикулы развиваются из эпителиальных клеток НКВ, т.е. из производных СК волосяного фолликула, в норме поддерживающих морфогенетический цикл волосяного фолликула. Однако, несмотря на кажущуюся гомологию дермальных кист и нормальных волосяных фолликулов, функциональная схожесть клеток, составляющих эти образования, отнюдь не очевидна.

Для того чтобы проверить способность дермальных кист и утрикул принимать участие в репаративной регенерации эпидермиса, мы наносили ожог степени IIIa на спину мышей нормального и мутантного генотипов (рис. 3). Через 6 ч после нанесения ожоговой травмы рана мыши нормального генотипа (рис. 3, а) характеризуется отсутствием эпидермиса, выраженными деструктивными изменениями дермы, а также началом пролиферации эпителиальных клеток в сохранившихся частях волосяного фолликула. Через 1 сут после нанесения ожога у мышей



**Рис. 2.** Гистологические препараты кожи мышей нормального (а) и мутантного по гену  $Hr$  (б) генотипов (окраска гематоксилин-эозином). ВФ – волосяной фолликул, СЖ – сальная железа, ДК – дермальная киста, У – утрикула. Масштаб: 0.15 мм.

нормального генотипа также отмечается пролиферация эпителиальных клеток в составе волосяного фолликула и начало их миграции по поверхности раны (рис. 3, б). У мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  через 6 ч после нанесения травмы наблюдается картина, сходная с описанной у мышей нормального генотипа (рис. 3, в): отмечается лейкоцитарная инфильтрация дермы, а также начало пролиферации эпителиальных клеток дермальных кист, сохранившихся в непораженных глубоких слоях дермы. Через 1 сут после нанесения ожога у мышей мутантного генотипа (рис. 3, г) поверхность раны уже частично покрыта нормальным двухслойным эпителием, под которым восстанавливается структура дермы (в той части раны, которая еще не покрыта эпителием, деструктивные изменения дермы и лейкоцитарная инфильтрация сохраняются). Уже одно это наблюдение свидетельствует, по меньшей мере, об ускоренной инициации эпителизации ожоговой раны и позволяет



**Рис. 3.** Гистологические препараты обожженной кожи (окраска гематоксилин-эозином): *а, б* — нормального генотипа через мышцы 6 ч и 1 сут после нанесения травмы соответственно; *в–ж* — генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  через 6 ч, 1, 3, 5 и 7 сут после нанесения травмы соответственно. *Дрм* — дерма, *ПЖК* — подкожная жировая клетчатка, ост. обозначения см. на рис. 2. Масштаб: *а–е* — 100, *ж* — 50 мкм.

высказать предположение об ускоренных темпах заживления ожога у мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  по сравнению с темпами заживления ожога у мышей нормального генотипа. Дермальные кисты, находя-

щиеся в глубине раны, имеют выстилку, состоящую из двух–трех слоев эпителиальных клеток, что свидетельствует о пролиферативной активности последних. На 3-и сут заживления ожоговая рана му-

тантных мышей практически полностью покрывается эпителием (рис. 3, *д*). На этой стадии мы обнаружили, что замкнутые образования, выстланные эпителиальными клетками, “раскрываются” на поверхности раны, в результате чего клетки их выстилки включаются в поверхностный эпителий, сформированный *de novo*. Некоторые из этих образований ассоциированы с салными железами и внешне похожи на утрикулы, присутствующие в интактной коже мутантных мышей (рис. 2). Однако то, что в результате травмы был удален весь эпидермис и все структурные образования, находящиеся в нем, исключает возможность участия утрикул в первичной регенерации. Аналогичная картина отмечается и на 5-е сут заживления (рис. 3, *е*). Через 7 сут после нанесения ожога в коже мутантных мышей (рис. 3, *ж*) дермальных кист практически не наблюдалось, из чего мы делаем предположение о том, что именно эти образования принимают участие в регенерации эпидермиса.

Мы провели аналогичный эксперимент, в котором вместо ожога мышам наносили глубокую вырезанную рану кожи, удаляя эпидермис и часть дермы. Результаты гистологического исследования (рис. 4) оказались сходными с таковыми исследования ожоговых ран. Через 6 ч и 1 сут после нанесения раны эпидермис отсутствует у мышей как нормального, так и мутантного генотипов (рис. 4), поверхность раны покрыта слоем лейкоцитов. В глубине дермы мутантных мышей видны кисты, эпителиальная выстилка которых утолщена, что свидетельствует о выраженной пролиферативной активности клеток (рис. 4, *з*). На 3-и сут заживления поверхность раны у мышей нормального генотипа покрыта двухслойным эпителием, наблюдается пролиферация эпителиальных клеток волосяного фолликула (рис. 4, *д*). Так же, как и в случае с заживлением ожоговой раны, через 3 сут после нанесения раны у мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  обнаруживаются дермальные кисты, “раскрывающиеся” на поверхности (рис. 4, *е*). Через 7 сут заживления морфология эпидермиса мышей нормального генотипа (рис. 4, *ж*) соответствует таковой мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  через 5 сут после нанесения раны (рис. 4, *з*). Это указывает на ускоренные темпы заживления вырезанной раны у мутантных мышей. Число кист в дерме мышей мутантного генотипа также снижается с ходом регенерации эпидермиса, давая основания и здесь предполагать участие этих образований в заживлении раны.

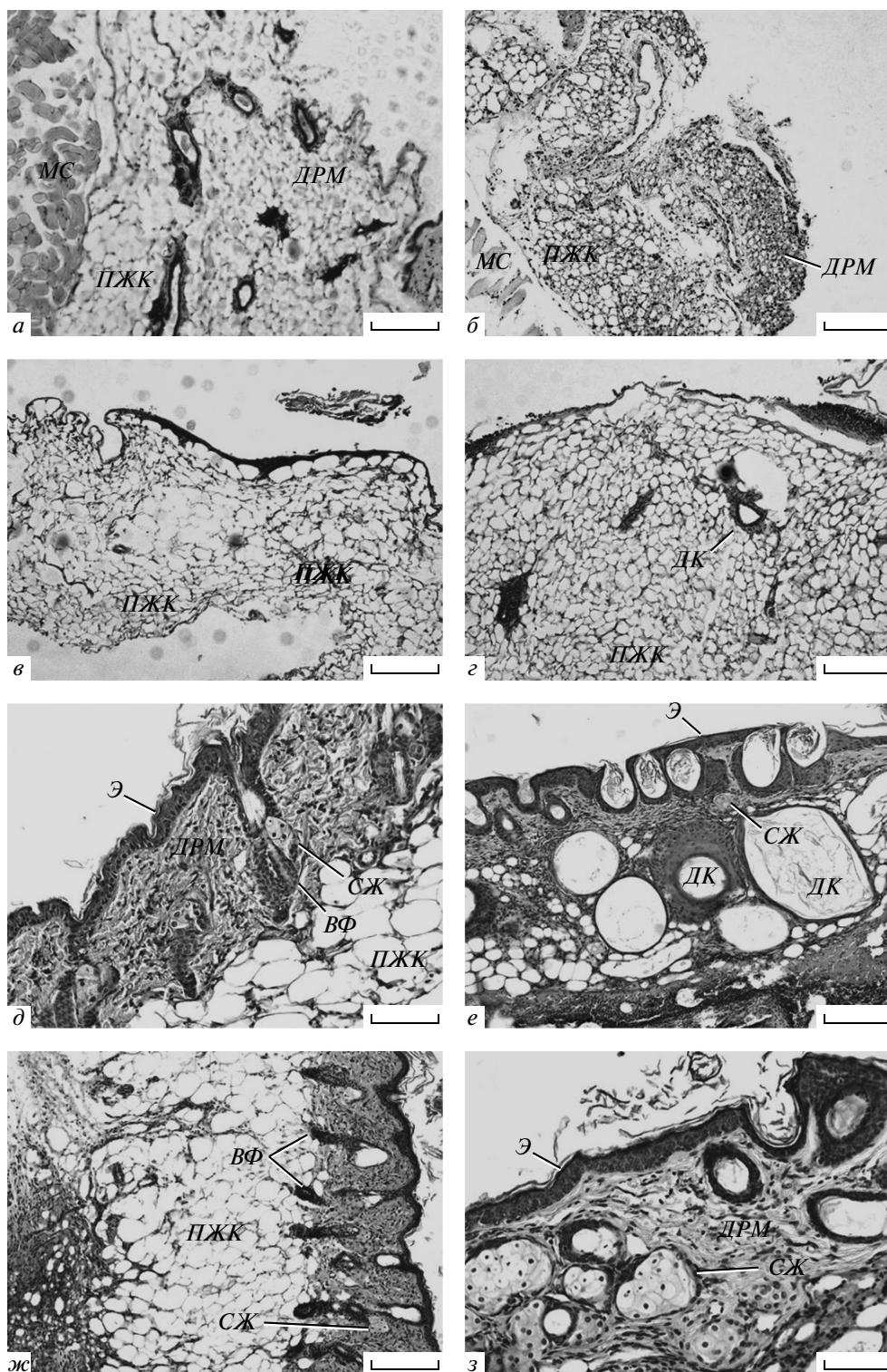
Известно, что клетки выпячивания НКВ волосяного фолликула способны принимать участие не только в регенерации самого фолликула, но и в восстановлении межфолликулярного эпидермиса в случае травмы (Taylor et al., 2000). Было показано, что производные этих клеток способны к миграции как в проксимальном направлении, поставляя материал для роста волоса, так и в направлении эпидер-

миса. В настоящем исследовании мы наблюдали сходный ответ на повреждение эпидермиса со стороны дермальных кист у мышей, мутантных по гену *Hr*. Наблюдаемая картина (включение эпителиальной выстилки этих аномальных образований в формирующийся эпидермис наряду с сокращением числа кист в ходе заживления раны) позволяет предположить, что кисты мутантных мышей и волосяные фолликулы мышей нормального генотипа участвуют в регенерации сходным образом.

На основании сделанных наблюдений мы можем предположить, что кисты с признаками активной пролиферации эпителиальных клеток флотируют из глубины дермы к раневой поверхности.

Кроме того, пролиферация эпителия кист свидетельствует о том, что СК волосяного фолликула у мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  сохраняются. Более того, они сохраняются в кистах, которые, как считалось ранее, происходят из глубоких отделов волосяного фолликула, не связанных с выпячиванием НКВ (Panteleyev et al., 1998). Тот факт, что низкокодифференцированные эпителиальные предшественники присутствуют в дермальных кистах мутантных мышей независимо от происхождения этих кист, приводит нас к предположению о том, что и у мышей нормального генотипа регенерация межфолликулярного эпидермиса может осуществляться не только за счет клеток выпячивания НКВ, но и за счет клеток глубоких отделов волосяного фолликула.

Результаты, полученные в нашей работе, говорят о том, что молекулярные механизмы, контролирующие ответ волосяного фолликула при травме кожи, не нарушаются при мутации по гену *Hr*. Известно, что в контроле морфогенеза волосяного фолликула ключевую роль играют *SHH*-, *WNT*- и *BMP*-зависимые генные сети и система их взаимодействий (Головатенко-Абрамов, Платонов, 2009). *SHH*-зависимая генная сеть контролирует клеточную пролиферацию во многих тканях и органах, в том числе и в волосяном фолликуле (Wang et al., 2000), *WNT*-зависимая генная сеть необходима для асимметричного деления стволовых клеток и периодически активируется в ходе нормально цикла волосяного фолликула (Millar et al., 1999), а *BMP*-зависимая генная сеть отвечает за терминальную дифференцировку клеток волосяного фолликула и формирование волоса (Kullessa et al., 2000). Опираясь на полученные результаты, мы можем предполагать, что работа каждой из этих сетей в отдельности не нарушается, так как ключевые морфогенетические явления в ходе регенерации у мышей генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  не исчезают (наблюдаются пролиферация клеток кист и утрикул, их миграция и дифференцировка на местах). Однако согласованность работы этих сетей у мутантных мышей явно нарушена; предположения об этом так или иначе высказывались ранее (Zarach et al., 2004; Beau-doin et al., 2005). Наше предположение о том, что темпы пролиферации эпителия при регенерации



**Рис. 4.** Гистологические препараты вырезанной раны кожи мышей (окраска гематоксилин-эозином): *a, в, д, ж* – нормального генотипа через 6 ч, 1, 3 и 7 сут после нанесения травмы соответственно; *б, г, e, з* – генотипа  $Hr^{hr}/Hr^{hr}$  через 6 ч, 1, 3 и 5 сут после нанесения травмы соответственно. МС – мышечный слой, ост. обозначения см. на рис. 3. Масштаб: *a–г, e, ж* – 200, *д, з* – 100 мкм.

кожных травм у мышей генотипа *Hr<sup>hr</sup>/Hr<sup>hr</sup>* выше, чем у мышей нормального генотипа, основанное на анализе морфологии ожоговой и вырезанной ран, косвенно подтверждает гипотезы других авторов об основах патогенеза фенотипа мутантных мышей. Это соответствует представлениям о том, что баланс основных морфогенетических событий смещен в сторону клеточной пролиферации в случае мутации по гену *Hr*.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Головатенко-Абрамов П.К., Платонов Е.С. Генные регуляторные сети, контролирующие морфогенез волосяного фолликула у мыши // Успехи соврем. биологии. 2009. Т. 129. С. 144–157.
- Ahmad W., Faiyaz ul Haque M., Brancolini V. et al. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene // Science. 1998. V. 279. P. 720–724.
- Beaudoin G.M.J. III, Sisk J.M., Coulombe P.A. et al. Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 14653–14658.
- Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A. et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche // Cell. 2004. V. 118. P. 635–648.
- Brooke H.C. Hairless mice // J. Hered. 1926. V. 17. P. 173–174.
- Cachon-Gonzalez M.B., Fenner S., Coffin J.M. et al. Structure and expression of the hairless gene of mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 7717–7721.
- Chase H.B., Montagna W., Malone J.D. Changes in skin in relation to the hair growth cycle // Anat. Rec. 1953. V. 116. P. 75–81.
- Kulesa H., Turk G., Hogan B.L.M. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle // EMBO J. 2000. V. 19. P. 6664–6674.
- Matsuzaki T. Technologies for hair reconstitution and their applicability for pharmaceutical research // Yakugaku Zasshi. 2008. V. 128. P. 11–20.
- Millar S.E., Willert K., Salinas P.C. et al. WNT signaling in the control of hair growth and structure // Devel. Biol. 1999. V. 207. P. 133–149.
- Morris R.J., Liu Y., Males L. et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 411–417.
- Oshima H., Rochat A., Kedzja C. et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells // Cell. 2001. V. 104. P. 233–245.
- Panteleyev A.A., van der Veen C., Rosenbach T. et al. Towards defining the pathogenesis of the hairless phenotype // J. Invest. Dermatol. 1998. V. 110. P. 902–907.
- Paus R., Cotsarelis G. The biology of hair follicles // N. Engl. J. Med. 1999. V. 341. P. 491–497.
- Taylor G., Lehrer M.S., Jensen P.J. et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis // Cell. 2000. V. 102. P. 451–461.
- Wang L.C., Liu Z.Y., Gambardella L. et al. Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration // J. Invest. Dermatol. 2000. V. 114. P. 901–908.
- Zarach J.M., Beaudoin G.M.J. III, Coulombe P.A. et al. The corepressor hairless has a role in epithelial cell differentiation in the skin // Development. 2004. V. 131. P. 4189–4200.
- Zhang J.T., Fang S.G., Wang C.Y. A novel nonsense mutation and polymorphisms in the mouse hairless gene // J. Invest. Dermatol. 2005. V. 124. P. 1200–1205.

## Dermal Cysts Participate in Reparative Regeneration of Epidermis in *Hr<sup>hr</sup>/Hr<sup>hr</sup>* Mice

P. K. Golovatenko-Abramov<sup>a</sup>, E. A. Zhirkova<sup>b</sup>, E. G. Kolokol'chikova<sup>b</sup>,  
V. S. Bocharova<sup>b</sup>, and E. S. Platonov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics RAS, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Sklifosovskiy Research Institute of Emergency Care, pl. B. Sukharevskaya 3, Moscow, 129010 Russia

e-mail: p.golovatenko@gmail.com

**Abstract**—One of the phenotypic effects of mutation in the *Hr* gene in mice is disintegration of hair follicles and their degeneration into open funnel-shaped structures (utricles) opened on skin surface and cysts located in the depth of the dermis. The aim of the current study consists in analysis of the process of reparative regeneration of skin in homozygous mice with one of the mutant alleles of the *Hr* gene—*Hr<sup>hr</sup>*. It is shown that epithelial cells that constitute the inner pavement of cysts take part in the process of epithelization of deep skin wounds. This indicates that the competence of ectodermal cells in relation to inductive signals from injured skin remains in *Hr<sup>hr</sup>* homozygote mice, in spite of the significant anatomic abnormalities of the hair follicles.

*Key words:* hair follicles, regeneration of skin