

ЭМБРИОЛОГИЯ

УДК 591.47+591.3+57:51-76+57.02.001.57

ОЦЕНКА СОБЫТИЙ ПОСЛОЙНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

Э.Б. Всеволодов*, В.А. Голиченков, И.Ф. Латыпов*, Ю.К. Доронин, А.С. Мусаева*

(кафедра эмбриологии; e-mail: burlakovao@mail.ru)

Проведен корреляционный и регрессионный анализ морфогенетических связей диаметра поперечного среза волоса с параметрами других слоев волосяного фолликула. На основе этих данных составлена компьютерная модель, позволяющая при введении диаметра или площади сечения поперечного среза волоса получить данные о соответствующих параметрах других слоев фолликула в ходе устойчивого роста волоса (фаза анаген VI), обеспеченная разными диапазонами концентрации главного индуктора от оси к периферии фолликула, вырабатываемого камбием или соединительно-тканым сосочком луковицы. Модель предполагает для индукции некоторых слоев необходимость трех дополнительных контактных воздействий смежных слоев: (1) наружное влагалище → слой Генле; (2) внутреннее влагалище → кутикула волоса и (3) кутикула волоса → кутикула внутреннего влагалища. Результаты дополнительно повышают возможности использования волосяных фолликулов в качестве модели биологии развития.

Ключевые слова: волос, волосяной фолликул, индукционные процессы, масса закладки.

Волосяной фолликул — один из наиболее популярных модельных объектов для исследования процессов клеточной специализации, дифференциации и угасания клеточной активности при формировании терминальных структур фолликула. Значимость этой модели в исследованиях процессов развития трудно переоценить. Волосяные фолликулы и их производные морфологически сравнительно просты и многообразны у разных видов млекопитающих; как правило, многочисленны на малом лоскуте кожи и легкодоступны, прежде всего для микроскопического анализа [1]. Сведения о строении и функциях этих структур очевидно востребованы в медицине и косметологии, так же как в практике овцеводства и пушного звероводства.

Хорошо известно, что недифференцированные клетки, порождаемые клетками камбия луковицы (матриксом), смешаясь, формируют несколько слоев клеток, дифференцирующихся в существенно различающиеся терминальные структуры. Это три слоя волосяного стержня (сердцевина, кора и кутикула) и три слоя внутреннего корневого влагалища (кутикула внутреннего влагалища, слой Гексли и слой Генле). Слои волосяного стержня отличаются морфологией формирующих их клеток и составом структурных белков (кератины, кератиноподобные и кератинассоциированные белки), разнообразие вариантов которых исчисляется десятками [2]. Клетки слоев внутреннего

корневого влагалища отличаются цитохимически от соседних с ними клеток коры и кутикулы волоса, но относительно сходны между собой по составу структурных белков. В то же время для слоев внутреннего волосяного влагалища характерна выраженная гетерохрония белок-синтетических процессов. Темпы белкового синтеза в клетках слоя Генле выше, и кератинизируются они раньше, чем клетки кутикулы и слоя Гексли. В результате слой Генле как отчетливая морфологическая структура определяется в более проксимальных отделах луковицы по сравнению с другими слоями.

Несмотря на значительные успехи клеточной биологии волосяного фолликула (ВФ), до настоящего времени не существует однозначных ответов на ряд кардинальных вопросов биологии развития ВФ. Так, например, неясно, чем определяется жесткая концентрическая структура волосяного фолликула и его производных, так же как и характерные различия толщины концентрических слоев. Мы попытались оценить вклад камбиальных клеток в формирующиеся концентрические структуры волосяного фолликула и стержня волоса в функционирующих в стационарном режиме фолликулах разного размера.

Объекты и методы

Биопсию кожи (2 × 2 см) брали, согласно обычной зоотехнической практике, с середины латераль-

* Институт общей генетики и цитологии МОН, Алматы, Республика Казахстан.

Таблица 1

Описательная статистика морфометрических данных

	<i>Df</i>	<i>Di</i>	<i>Dh</i>	<i>Dm</i>
Число измерений	155	155	155	155
Среднее \pm стандартное отклонение	93,7 \pm 41,67	57,9 \pm 30,13	42,8 \pm 26,68	15,4 \pm 28,42
Минимальное—максимальное значения	31,0—210,0	20,0—156,0	13,0—141,0	0,0—121,0
Медиана	82,0	44,0	31,0	0,0
Асимметрия \pm стандартная ошибка	1,1 \pm 0,19	1,4 \pm 0,19	1,8 \pm 0,19	2,1 \pm 0,19
Куртозис \pm стандартная ошибка	0,29 \pm 0,39	1,6 \pm 0,39	2,7 \pm 0,39	3,9 \pm 0,39

ной поверхности тела грубошерстной овцы, и фиксировали в течение суток в 10%-м формалине. Получали парафиновые срезы (5 мкм) фрагментов лоскута (8 \times 8 мм), ориентируя плоскость срезов перпендикулярно осям волос в коже, и после депарафинирования окрашивали гематоксилином Эрлиха. На микрофотографиях препаратов измеряли диаметры фолликулов (*Df*) и входящих в них концентрических структур (внутреннего влагища, *Di*, стержня волоса, *Dh* и сердцевинки волоса, *Dm*), рассеченных срезом ниже пилярного просвета проксимальнее места отделения стержня волоса от внутреннего влагища. Статистический анализ данных производили с помощью программ Statistica 6.0 (StatSoft) и Sigma-Plot (Systat).

Результаты

Известно, что для шерстного покрова домашних овец характерен длительный период устойчивого роста волос (несколько лет у тонкорунных, несколько месяцев у грубошерстных овец). В этот период не формируются новые фолликулы, а размер функционирующих фолликулов не изменяется месяцами при благоприятных (не стрессогенных) условиях содержания. Таким образом, предметом исследования послужило заложенное ранее (заданное) множество фолликулов разного размера (от 12 до 140 мкм в диаметре). Разнообразие размеров фолликулов связано с гетерохронностью их закладок: крупные фолликулы формировались на более ранних стадиях развития плода, мелкие — на более поздних. Слово “прирост”, употребляемое ниже по отношению к фолликулам или концентрическим структурам фолликула, характеризует различия размеров этих структур, но не их изменения во времени.

Результаты наших измерений показали, что для всех полученных распределений размеров структур характерна положительная асимметрия, которая возрастает для показателей центральных структур фолликула (табл. 1). Аналогичную тенденцию имеет куртозис для распределений *Di*, *Dh* и *Dm*, но не для *Df*. Все эмпирические распределения отличаются от соответствующих нормальных и логнормальных распределений.

Диаметры фолликулов и входящих в них концентрических структур с высокой степенью значимости положительно коррелировали между собой (табл. 2). Соотношения между диаметрами фолликулов и входящих в их состав концентрических структур целесообразно аппроксимировать ломаными прямыми (рис. 1, *A*, *B*, *B*). В то же время соотношения между диаметрами внешнего влагища, стержня и сердцевинки волоса (рис. 1, *Г*, *Д*), так же как между диаметрами стержня и сердцевинки волоса (рис. 1, *Е*), лучше описываются простой линейной зависимостью.

Таблица 2

Корреляции значений *Df*, *Di*, *Dh* и *Dm*

		Коэффициент корреляции Пирсона, r^*			
		<i>Df</i>	<i>Di</i>	<i>Dh</i>	<i>Dm</i>
Коэффициент ранговой корреляции Спирмена, R^*	<i>Df</i>		0,930	0,890	0,820
	<i>Di</i>	0,902		0,980	0,930
	<i>Dh</i>	0,841	0,906		0,970
	<i>Dm</i>	0,777	0,804	0,810	

*Значимость коэффициентов корреляции r и R не превышает 0,00001.

В соответствии с величинами коэффициентов сдвига (*b*) первой ветви регрессий (табл. 3), внутреннее влагище появляется в фолликулах с диаметром, равным $11,4 \pm 3,45$ мкм; стержень волоса и сердцевинка волоса — в фолликулах с диаметром $19,0 \pm 3,64$ мкм и $70,6 \pm 1,96$ мкм соответственно.

Коэффициенты наклона (*a*) первой ветви регрессий свидетельствуют о том, что прирост диаметров фолликулов опережает прирост диаметров внутреннего влагища, стержня и сердцевинки волоса (табл. 3, рис. 1, *A*, *B*, *B*). Прирост диаметра внутреннего влагища превышает прирост диаметра стержня и сердцевинки волоса в ряду увеличивающихся в диаметре фолликулов (достоверное различие коэффициентов наклона описывающих регрессий $p = 0,002$ и $0,006$ соответственно), но прирост диаметров стержня и сердцевинки волоса в этом ряду следует полагать одинаковым ($p = 0,557$).

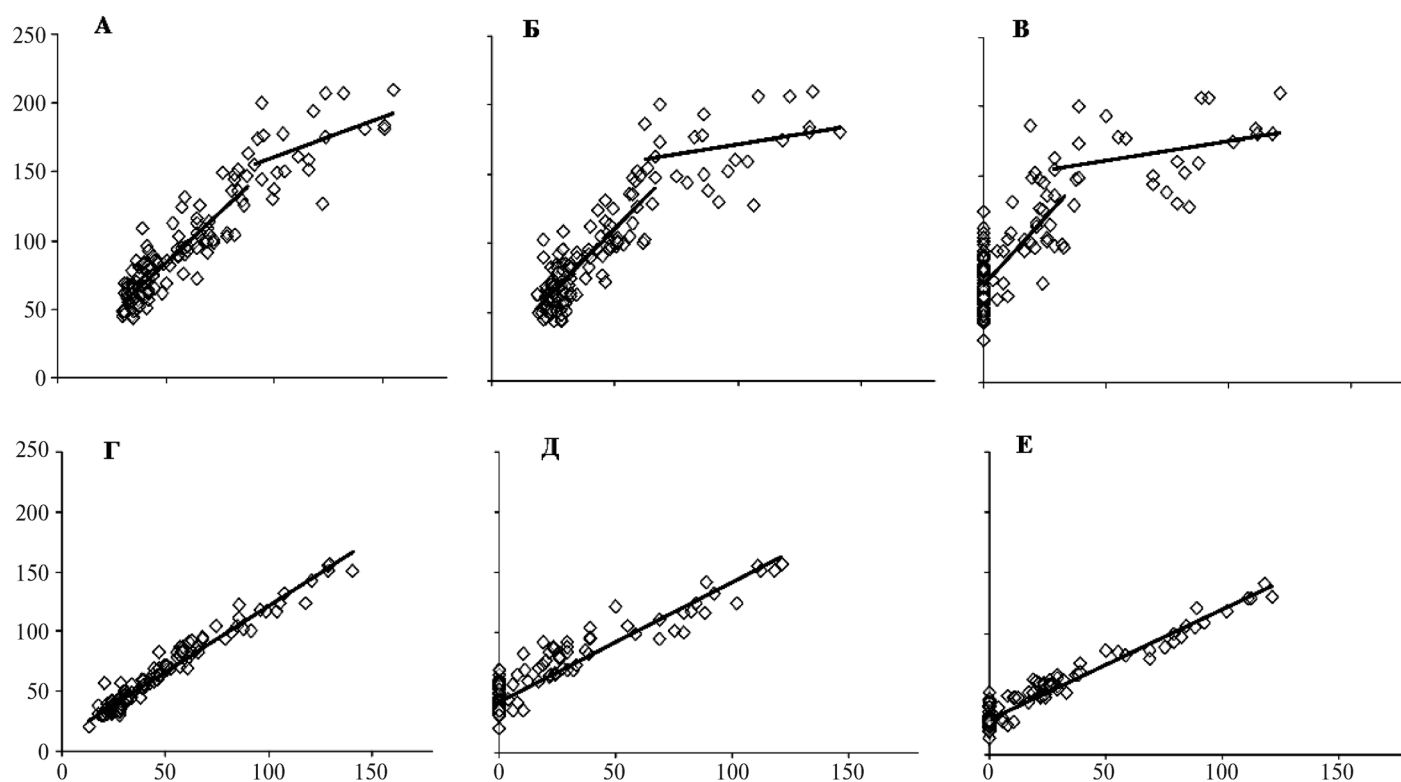


Рис. 1. Линейные тренды, аппроксимирующие соотношения между диаметрами волосяных фолликулов и их слоев. А — диаметрами фолликула (Df — ось ординат) и внутреннего волосяного влагалища (Di — ось абсцисс); Б — диаметрами фолликула (Df — ось ординат) и сердцевини стержня волоса (Dh — ось абсцисс); В — диаметрами фолликула (Df — ось ординат) и сердцевини волоса (Dm — ось абсцисс); Г — диаметрами внутреннего волосяного влагалища фолликула (Di — ось ординат) и стержня волоса (Dh — ось абсцисс); Д — диаметрами внутреннего волосяного влагалища фолликула (Df — ось ординат) и сердцевини волоса (Dm — ось абсцисс) и Е — между диаметрами стержня волоса (Dh — ось ординат) и сердцевини волоса (Dm — ось абсцисс). Статистические оценки параметров трендов представлены в табл. 2 и 3

Коэффициенты наклона регрессий, сочетающих значения Di и Dh , Di и Dm , значимо различаются ($p = 0,002$) (табл. 3). Из этого следует, что при увеличении диаметра фолликула диаметр внутреннего воло-

сяного влагалища прирастает приблизительно на 10% больше, чем диаметр стержня волоса, и приблизительно так же, как прирастает диаметр сердцевини волоса. Коэффициент наклона регрессий, связыва-

Таблица 3

Параметры линейных зависимостей, связывающих диаметры фолликула (Df), внутреннего волосяного влагалища (Di), стержня волоса (Dh) и сердцевини стержня волоса (Dm) в составе волосяных фолликулов

Сопоставляемые показатели (Y, X)	Ветви ломаной линии	Значения и стандартная ошибка коэффициентов уравнений $Y = aX + b$		
		a	b	R^2
Df, Di	1	$1,4 \pm 0,07$	$11,4 \pm 3,45^1$	0,777
	2	$0,5 \pm 0,22^2$	$110,1 \pm 26,46^3$	0,204
Df, Dh	1	$1,8 \pm 0,10$	$19,0 \pm 3,64$	0,848
	2	$0,3 \pm 0,24$	$142,9 \pm 23,96$	0,068
Df, Dm	1	$2,0 \pm 0,19$	$70,6 \pm 1,96$	0,451
	2	$0,3 \pm 0,17$	$146,8 \pm 13,11$	0,106
Di, Dh	—	$1,11 \pm 0,019$	$10,59 \pm 0,952$	0,957
Di, Dm	—	$0,99 \pm 0,031$	$42,71 \pm 0,999$	0,869
Dh, Dm	—	$0,91 \pm 0,019$	$28,87 \pm 0,626$	0,934

¹ $p = 0,001$; ² $p = 0,031$; ³ $p = 0,0004$. Курсивом выделены незначимые ($p > 0,05$) коэффициенты. Значимость не отмеченных каким-либо образом коэффициентов не превышает 0,0001.

ющих Dh и Dm , меньше 1 (верхний предел 99,9% доверительного интервала для коэффициента не достигает 1), из чего следует, что в ряду увеличивающихся фолликулов прирост диаметра сердцевинки волоса превышает прирост диаметра стержня волоса.

В соответствии с X-координатами точек перелома регрессий (рис. 1, *A, B, B*) фолликулы достигают максимального размера, значения которого варьируют (в соответствии с ошибками аппроксимации) в весьма широком диапазоне — от 105 до 220 мкм. Однако в таких фолликулах темпы прироста внутреннего влагалища, стержня и сердцевинки волоса сохраняются (рис. 1, *Г, Д, Е*).

Обсуждение

В образце кожи взрослой овцы мы обнаружили множество волосяных фолликулов диаметром менее или около 70 мкм, со стержнем волоса без сердцевинки. Фолликулы, содержащие только внутреннее волосяное влагалище, в коже взрослой овцы не обнаружены. Известно, что рост фолликула в период первичного развития или при регенерации (стадии I—V анагена) сопровождается усложнением его структуры. На начальных стадиях фолликул включает только конус внутреннего влагалища. Позже с ростом фолликулов в их составе появляются тонкий шиловидный кончик волоса без сердцевинки, а затем и волос с сердцевинкой. Представленный выше регрессионный анализ предсказывает, что внутреннее волосяное влагалище должно появляться в фолликулах с диаметром около 11 мкм, а стержень волоса без сердцевинки — в фолликулах с диаметром около 19 мкм.

Таким образом, прослеживается определенная связь увеличения размеров закладки (клеточной массы) волосяного фолликула с увеличением разнообразия дифференцировок при его развитии. Этот феномен является локальным отражением общей онто- и филогенетической корреляции клеточной массы эмбриональной закладки со степенью сложности производных этой закладки, многочисленные проявления которой были отмечены ранее [3]. В пользу таких корреляционных связей свидетельствует и, например, временное прекращение образования слоя сердцевинки при уменьшении диаметра луковицы и волоса у овец в зимний сезон с последующим восстановлением сердцевинки того же волоса при росте в более благоприятных условиях [4]. К тому же известно, что при дисплазии волосяной луковицы под влиянием цитостатиков наблюдается формирование внутреннего волосяного влагалища без стержня волоса.

Из представленного материала следует также, что в фолликулах разного размера изменяются соотношения размеров (подобия, пропорций) циркулярных структур за счет неравномерности прироста как целого фолликула, так и каждой из циркулярных структур в его составе. Данные регрессионного анализа положены в основу прогностической модели, позволяющей оценивать параметры слоев фолликула (и соответ-

ственно их соотношения) на основании единственного значения диаметра корня волоса. Эта программа может оказаться полезной для оценки качества шерстных волокон.

В фолликулах разного размера прирост диаметра наружного влагалища фактически равен приросту сердцевинки волоса и превышает прирост стержня волоса. Очевидно, что этот феномен следует трактовать как аллометрию фолликулов разного размера. Более того, закономерные нарушения линейных пропорций, характерные для мелких и средних фолликулов, нарушаются в крупных, достигших предельного размера фолликулах прежде всего за счет того, что неравномерный прирост диаметров внутренних циркулярных структур остается прежним.

В классической эмбриологии хорошо известно и убедительно документировано представление о “позиционной информации” как способе эпигеномной регуляции генной активности клеток в развитии организмов [5—7]. Согласно современным представлениям, морфотип и цитохимическая специализация клеток обеспечивается разнообразием наборов экспрессирующихся генов. Дифференциальная репрессия—дерепрессия генной активности в свою очередь индуцируется многочисленными транскрипционными факторами [5, 6]. Представляется вероятным, что эффект массы закладки предопределяется как массой камбиальных элементов (количеством стволовых клеток) в составе закладки, так и обратными влияниями дифференцированных структур, индуцирующих более разнообразные дифференцировки прогениторных клеток.

Каскад индукционных отношений между слоями волосяного фолликула возможно представить следующим образом (рис. 2). При стационарном росте волоса соединительно-тканый сосочек или группа клеток камбия волосяной луковицы (матрикс) выделяют некий химический агент — индуктор 1 (I_1), предопределяющий послойную дифференциацию пролиферирующих камбиальных клеток. Высокая концентрация I_1 ($P_1 > K > P_2$) в центре (вдоль оси) волосяного фолликула активирует “стартовый” набор транскрипционных факторов в клетках-мишенях и запускает каскад активации генов, обеспечивающих дифференцировку сердцевинки стержня волоса. Более низкая концентрация I_1 ($P_1 > K > P_2$) детерминирует кору и кутикулу волоса; концентрация I_1 , не превышающая порог P_2 , детерминирует морфотип клеток внутреннего влагалища.

Кутикула волоса, кутикула внутреннего влагалища и слой Генле внутреннего влагалища, в отличие от иных циркулярных структур фолликула, образованы единственным рядом клеток, которые граничат с клетками многоядных соседних слоев, отличающимися по морфологии и функциональным проявлениям. Соответственно для формирования морфотипов клеток слоя Генле и кутикулы внутреннего влагалища (в сравнении с клетками слоя Гексли), так же как кутикулы стержня волоса (в сравнении с корой

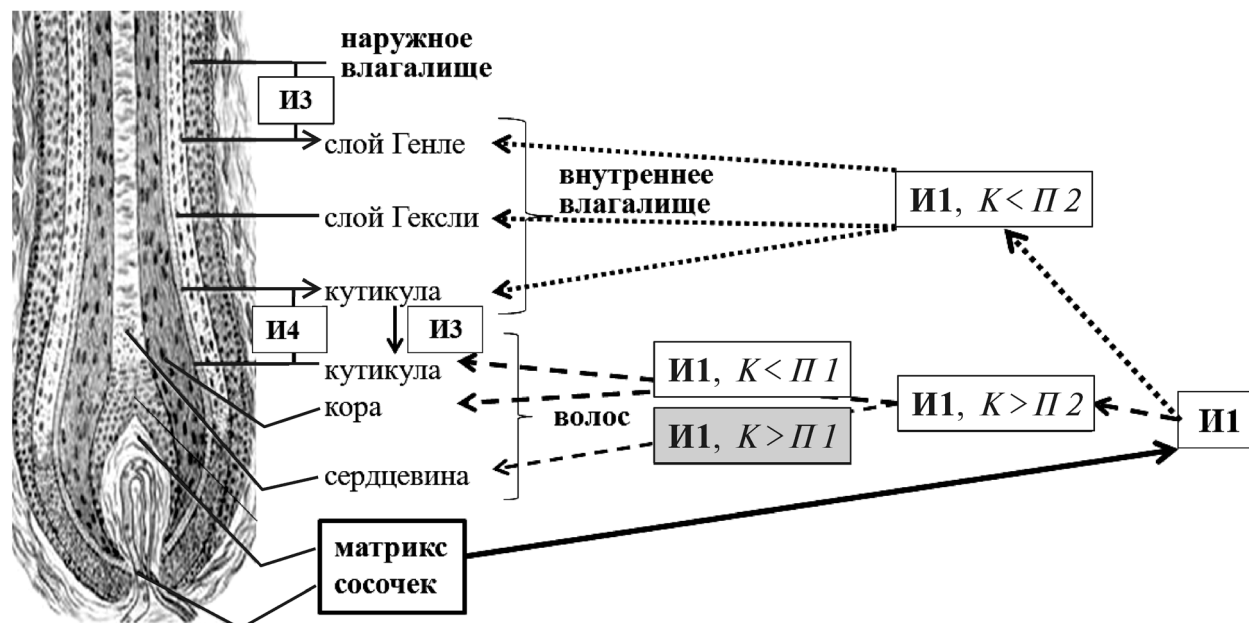


Рис. 2. Гипотетическая схема индукции слоев волосяного фолликула. И1-индуктор 1, выделяемый сосочком или матриксом; К — концентрация индуктора; П1, П2 — пороговые уровни концентрации по градиенту индуктора (П1 > П2); И2, И3 и И4 — дополнительные факторы индукции

волоса), вероятно, недостаточно воздействия единственного индуктора (И1). Для этих структур следует предполагать дополнительные индукционные, например контактные, взаимодействия соседних слоев: наружного влагалища (сопровождающего слоя) (И3) и кутикулы внутреннего влагалища (И2).

Для индукции кутикулы волоса дополнительно требуется контактный индуктор И2, поступающий из внутреннего влагалища. Для индукции слоя Генле требуется контактный индуктор И3, поступающий из наружного влагалища. Для индукции слоя кутикулы внутреннего влагалища требуется контактный индуктор И4, поступающий из кутикулы волоса.

Выводы

1. Нормальная изменчивость диаметров волос в пределах одного и того же участка кожи сопровож-

дается нарушением пропорций толщины слоев волосяного фолликула, причем в фолликулах с более толстыми волосами доля осевых слоев (сердцевина, волос в целом) выше, а более периферических слоев (внутреннее влагалище) ниже.

2. Предложена модель индукции разных слоев волосяного фолликула в ходе устойчивого роста волоса, включающая индукцию многорядных слоев (сердцевина, кора волоса и слой Гексли) на основе разных уровней концентрации паракринного агента в градиенте концентрации от оси фолликула к его периферии, а также дополнительную контактную индукцию одnorядных слоев (слой Генле и кутикулы волоса и внутреннего влагалища).

3. На определяющий пропорции слоев паттерн градиента концентрации индуктора (индукторов) слоев в камбии должен влиять абсолютный объем камбия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всеволодов Э.Б., Голиченков В.А. Достоинства волосяного фолликула как модели для биологии развития // Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция (К 135-летию со дня рождения П.П. Иванова) / Под ред. А.А. Заварзина. СПб.: Изд-во ВВМ, 2013. С. 48—50.
2. Rogers G.E. Hair follicle differentiation and regulation // Int. J. Dev. Biol. 2004. Vol. 48. N 2—3. P. 163—170.
3. Голиченков В.А., Никерясова Е.Н., Попов Д.В. Значение массы клеток для становления и эволюции онтогенеза // Современная эволюционная морфология / Под ред. Э.И. Воробьевой. Киев: Наукова думка, 1991. С. 130—139.
4. Всеволодов Э.Б., Латыпов И.Ф., Сарсекеева Г.Ж., Жапбасов Р., Мусаева А.С. Изменчивость динамики дисплазии волос как возможного показателя уровня адаптации овец к условиям разведения // Вестник КазНУ. Сер. биол. 2012. № 2 (54). С. 37—41.
5. Gilbert S.F. Developmental biology. Ninth edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc., 2010. 711 p.
6. Нуртазин С.Т., Всеволодов Э.Б. Биология индивидуального развития. 2-е изд. Алматы: Казахский университет, 2011. 260 с.
7. Wolpert L., Tickle Ch. Principles of development. Oxford: Oxford Univ. Press, 2011. 616 p.

THE ESTIMATION OF EVENTS OF HAIR FOLLICLE LAYERS DIFFERENTIATION

E.B. Vsevolodov, V.A. Golichenkov, I.F. Latipov, Yu.K. Doronin, A.S. Musaeva

For better understanding the hair growth histophysiology and to improve the possibility of using hair follicles as a model for the developmental biology correlation and regression analysis of the hair cross section diameter and corresponding parameters of other hair follicle layers were carried out. Basing on these data hair follicle computer model "Hair follicle layer proportions" was elaborated which after interpolating hair cross section diameter or area allowed to count corresponding parameters of other hair follicle layers and their proportions.

The model of different hair follicle layers induction in the stable hair growth phase (anagen VI) is suggested. It includes induction of the layers by different concentration ranges of the main induc-tor, arranged as concentration gradient from follicle axis towards its periphery. The main induc-tor is supposed to be produced by connective tissue papilla or cambium itself. Beside the main induc-tor there must exist three additional contact inductive actions of the neighboring layers: 1) outer sheath → Henle layer; 2) inner sheath → hair cuticle; 3) hair cuticle → inner sheath cuticle.

Key words: *hair, hair follicle, induction, mass of rudiment.*

Сведения об авторах

Всеволодов Эдуард Борисович — докт. биол. наук, проф., глав. науч. сотр. лаборатории генетики и цитогенетики животных Института общей генетики и цитологии КН МОН Республики Казахстан. Тел.: 8-727-269-46-16; e-mail: eduardvsevolodov@mail.ru

Голиченков Владимир Александрович — докт. биол. наук, проф. кафедры эмбриологии биологическо-го факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-62; e-mail: burlakovao@mail.ru

Латыпов Игорь Фалихович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетики и цитогенетики Института общей генетики и цитологии КН МОН Республики Казахстан. Тел.: 8-727-269-45-88; e-mail: iggc@mail.ru

Доронин Юрий Константинович — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-62; e-mail: ljh_rjusp@mail.ru

Мусаева Айжан Сеилкановна — канд. биол. наук, зав. лабораторией генетики и цитогенетики жи-вотных Института общей генетики и цитологии КН МОН Республики Казахстан. Тел.: 8-727-269-46-16; e-mail: iggc@mail.ru