

*Алексеев А. Г., Горелова М. В., Ноздрин В. И.*

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ КАМБИАЛЬНЫХ МЕЛАНОЦИТОВ В ВОЛОСЯНОМ ФОЛЛИКУЛЕ КОЖИ МУЖЧИН

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (заведующий — проф. В. И. Ноздрин)  
медицинского института ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет»,  
Орёл, и научный отдел (руководитель — к. б. н. О. И. Лаврик) ЗАО «Ретиноиды»,  
Москва, e-mail: Sciense@retinoids.ru*

В предшествующем исследовании нами установлены возрастные изменения содержания меланоцитов в волосяных луковицах [3]. При этом за первые 15–20 лет постнатального онтогенеза количество пигментных клеток в эпителиально-клеточных структурах кожи возрастало. Возникает вопрос — из каких клеточных источников появляются новые меланоциты? В гистологической литературе остаются неосвещенными особенности развития этого клеточного дифферона в онтогенезе. Широко известен циклический характер роста волос, когда стадия анагена может длиться до 8 лет [13]. В следующем цикле появляется новый волосяной фолликул, в клеточной матрице волоса вновь идентифицируются меланоциты. Возникает всё тот же вопрос: какие клетки среди меланоцитов являются камбиальными и где они локализуются?

В связи с этим была поставлена цель: иммуногистохимическими методами установить локализацию малодифференцированных меланоцитов в волосяных фолликулах.

**Материал и методы.** Объектом исследования служила аутопсийная кожа височной области волосистой части головы от субъектов мужского пола с 20-й недели антенатального до 75 лет постнатального развития. Секционный материал получали из бюро судебно-медицинской экспертизы и городских патологоанатомических отделений. Участок кожи размером  $1 \times 1 \text{ см}^2$  забирали по линии разреза тканей головы не позднее 12–14 часов после наступления смерти. Кусочки фиксировали в забуференном 10 % нейтральном формалине. Всего изучено 80 образцов. Для достоверной идентификации меланоцитов в структурах волосяного фолликула применяли иммуногистохимические методы исследования. При выборе моноклональных антител (МКА) исходили из следующих критериев: высокая чувствительность и специфичность способа окраски, возможность работы с иммунопероксидазным методом. В результате были отобраны антитела к: тирозиназе (Тур) — меланосомальный антиген, служит ключевым ферментом в процессе биосинтеза меланина пигментными клетками, катализирует превращение тирозина в 3,4-дигидроксифенилаланин и другие реакции этого метаболического пути; Mitf (Microphthalmia-associated Transcription factor) — ядерному белку, продукту экспрессии одноимённого гена, ответственного за направление дифференцировки клеток по меланоцитарному типу, регулирующего экспрессию тирозиназы и дофахромтаутомеразы.

Для иммуногистохимического исследования изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм. С каждого образца получали по два среза и помещали их на обработанные полилизинном предметные стёкла. Срезы подсушивали в термостате

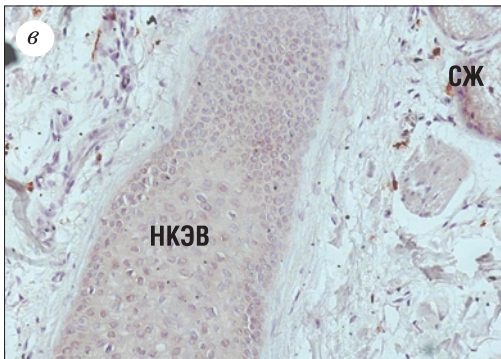
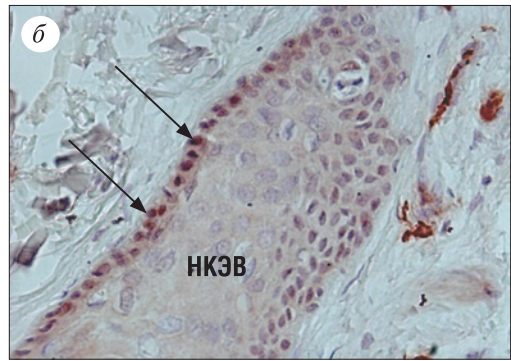
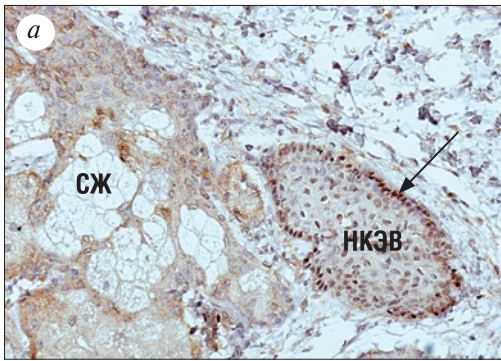
при температуре 37 °С в течение 3 суток, затем перекладывали на ночь в другой термостат при 58 °С. Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигена проводили одноэтапно с помощью высокотемпературной обработки под повышенным давлением в электрическом варочном автоклаве с реактивом Trilogy (Cell marque, США). Затем осуществляли горячее споласкивание предметных стёкол со срезами во втором растворе Trilogy с последующей промывкой в 4 растворах фосфатного буфера по 2 минуты в каждом. Эндогенную пероксидазу блокировали 3 %-ным раствором перекиси водорода в течение 10 минут.

Использовали первичные МКА: к Tgr, клон T311, разведение 1:500 и к Mitf, клон C5/D5, разведение 1:50 (Cell marque, США). Реакцию проводили методом двойного непрямого иммуномечения. Локализацию первичных антител определяли с помощью иммунопероксидазного метода (Histofine Simple Stain, MAX PO Multi, Япония). В качестве хромогена использовали 3-амино-9-этилкарбазол — метку красного цвета с последующим докрашиванием гематоксилином Караччи. После гематоксилина срезы промывали в водопроводной воде и заключали в UltraMount Plus (LabVision, США).

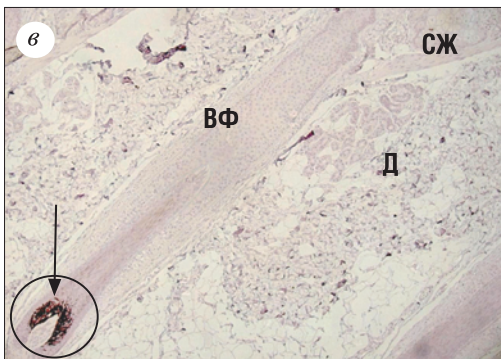
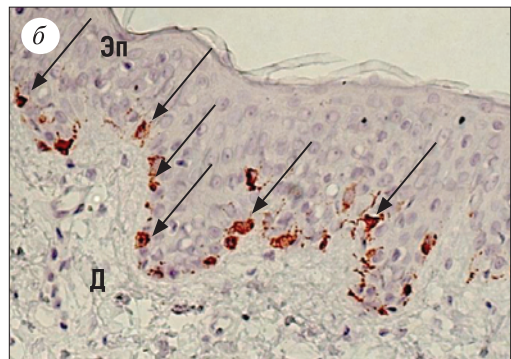
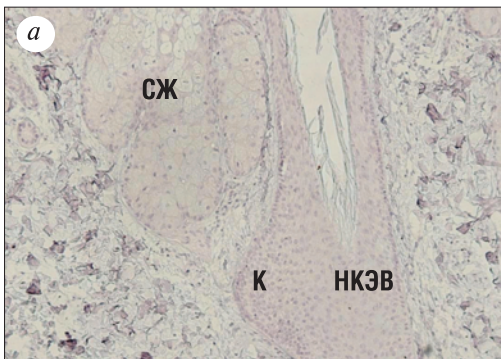
**Результаты и их обсуждение.** Пигментные клетки имеют нейроэктодермальное происхождение. Их предшественники мигрируют сначала в дерму (70–80-е сут гестации), а затем в эпидермис (на 10–15-й неделях антенатального онтогенеза) [2, 5]. Остаётся ли тканеспецифичный камбиальный резерв меланоцитов в коже и где он локализуется? В настоящем исследовании получены некоторые данные, которые частично позволяют ответить на эти вопросы.

С помощью МКА к Mitf можно выявить весь дифферон меланоцитов [4, 14], но прежде всего — малодифференцированные клетки-предшественники, практически не содержащие гранул меланина. Mitf-позитивные клетки удалось обнаружить в межфолликулярном эпидермисе и наружном корневом эпителиальном влагалище. Основываясь на общих представлениях о структуре частично дифференцированных тканеспецифичных камбиальных клеток [1, 11], предполагаем, что клетка-предшественник меланоцитов вырабатывает специфические белки, не содержит гранул меланина и не образует дендритов. Такая клетка должна сохранять способность к делению [6–8]. Клетки-предшественники меланоцитов, по всей вероятности, не экспрессируют ферменты меланосом.

Описанным выше критериям соответствовали лишь Mitf-позитивные клетки, локализующиеся в наружном корневом эпителиальном влагалище. Эти клетки визуализировались, начиная с 30-й недели антенатального периода (рис. 1, *a*), их было много у юношей (рис. 1, *b*), и почти исчезали в пожилом возрасте (рис. 1, *в*). Такие клетки имели округлую форму, экспрессировали Mitf и не содержали гранул меланина. Поскольку на препаратах, окрашенных МКА к тирозиназе, Tgr-позитивные клетки в наружном корневом эпителиальном влагалище не визуализировались (рис. 2, *a–в*), полагаем, что выявленные Mitf-позитивные клетки — это клетки-предшественники меланоцитов. Наиболее сопоставимы с нашими данными результаты исследования Е. К. Nishimura et al. [9, 10], которые описали Mitf-позитивные клетки в области утолщения эпителия волоса (колбы) кожи головы у субъектов 20–30 лет. Однако, на наш взгляд, в этих



*Рис. 1.* Mitf-позитивные клетки (стрелки) в наружном корневом эпителиальном влагалище кожи височной области у плода мужского пола 30 недель гестации (а), мужчин 21 (б) и 60 (в) лет. Об. 10, ок. 10 (а); об. 40, ок. 10 (б); об. 20, ок. 10 (в). НКЭВ — наружное корневое эпителиальное влагалище; СЖ — сальная железа



*Рис. 2.* Туг-позитивные клетки (стрелки) в эпителиально-клеточных структурах кожи височной области у мужчин 20 (а, б) и 36 (в) лет. Об. 10, ок. 10 (а); об. 40, ок. 10 (б); об. 5, ок. 10 (в). НКЭВ — наружное корневое эпителиальное влагалище; СЖ — сальная железа; Эп — эпидермис; Д — дерма; ВФ — волосяной фолликул; К — колба; волосяная луковица и волосяной сосочек выделены окружностью

работах убедительных морфологических доказательств, что в коже человека клетки меланоцитарного дифферона можно выявить в колбе, представлено недостаточно. Микрофотографии малодифференцированных меланоцитов, локализованных в наружном корневом эпителиальном влагалище, показаны также в работе D. J. Tobin [12]. Клетки идентифицировались с помощью МКА к пре-меланосомальному антигену gp100.

Таким образом, получены аргументы в пользу того, что тканеспецифичные малодифференцированные клетки-предшественники меланоцитарного дифферона присутствуют в волосяных фолликулах в антенатальном и постнатальном онтогенезе и локализуются в области наружного корневого эпителиального влагалища. С возрастом наблюдается тенденция к уменьшению их количества. Получить доказательства того, что Mitf-позитивные меланоциты содержатся среди клеток колбы, нам не удалось.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Воротеляк Е. А., Терских В. В.* Стволовые клетки эпителиальных тканей // Биология стволовых клеток и клеточные технологии / Под ред. М. А. Пальцева. М.: Изд. Медицина, Шико, 2009. Т. 2. С. 53–76.
2. *Клишов А. А.* Пигментные клетки // Больш. мед. энцикл., 3-е изд. М.: Изд. Сов. энциклопед. 1982. Т. 19. С. 193–194.
3. *Ноздрин В. И., Алексеев А. Г., Белоусова Т. А.* Возрастные особенности представительства меланоцитов в волосяных фолликулах кожи височной области головы у мужчин // Морфология. 2011. Т. 139. № 3. С. 67–72.
4. *Cheli Y., Ohanna M., Balotti R. et al.* Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes // Pigment Cell and Melanoma Res. 2009. V. 23. P. 27–40.
5. *Fein H., Nordlund J.* Neonatal pigmentation: structure and function. — In: Neonatal Skin, ed. Hoath S. B., Maibach H. I. — NY-Bazel: Marcel Dekker, 2003. Chapt. 5. P. 89–107.
6. *Grichnik J. M.* Melanoma, neovogenesis, and stem cell biology // J. Invest. Dermatol. 2008. V. 128. P. 2365–2380.
7. *Grichnik J. M., Burch J. A., Schulteis R. D. et al.* Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? // J. Invest. Dermatol. 2006. V. 126. P. 142–153.
8. *Haass N. K., Herlyn M.* Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma // J. Invest. Dermatol. 2005. V. 111. P. 233–238.
9. *Nishimura E. K.* Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation // Pigment Cell and Melanoma Res. 2011. V. 24. P. 401–410.
10. *Nishimura E. K., Granter S. R., Fisher D. E.* Mechanisms of Hair Graying: Incomplete Melanocyte Stem Cell Maintenance in the Niche // Science. 2005. V. 307. P. 720–724.
11. *Potten C. S., Wilson J. W.* The development of epithelial stem cell concepts // Essentials of stem cell biology, ed. Lanza R. 2th ed. New York: Academic Press, 2009. Part I. P. 17–28.

12. *Tobin D. J.* The ageing hair follicle pigmentary unit // *Hair Science and Technology* Van Neste (ed.). Skinterface srl. Tournai, Belgium, 2003. P. 155–168.
13. *Tobin D. J.* The melanocyte subpopulation in the human skin and hair follicle // *Human Trichology*. 2010. V. 1. P. 1–5.
14. *White R. M., Zon L. I.* Melanocytes in development, regeneration and cancer // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 11. P. 242–252.