

Горелова М. В., Алексеев А. Г., Калинина О. В., Ноздрин В. И.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ Ki-67-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В ЭПИДЕРМИСЕ И САЛЬНО-ВОЛОСЯНОМ КОМПЛЕКСЕ КОЖИ ВИСОЧНОЙ ОБЛАСТИ У ЛИЦ МУЖСКОГО ПОЛА

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

Первое упоминание о возможности использования моноклональных антител для выявления ядерного белка Ki-67 было сделано в 1983 г. J. Gerdes и др., которые предложили использовать его в качестве маркера пролиферации [8]. Это предложение оказалось верным и в дальнейшем многократно подтверждалось [2, 6, 9, 13]. Одно из первых сообщений, в котором исследовались моноклональные антитела к Ki-67 в эпидермисе человека, опубликовано в 1994 г. Н. Е. Knaggs и др. [10]. Было установлено, что Ki-67 — это ядерный белок, выявляющийся в ядрышках и за их пределами в связанном состоянии с другими хроматиновыми белками [7, 11]. В обзоре О. В. Кирик и др. [3], посвящённом использованию маркеров пролиферации в гистологических исследованиях, отмечено, что белок Ki-67 присутствует в ядрах клеток в периодах G₁, S, G₂, во время митоза и не выявляется в интерфазных ядрах. Ряд авторов отмечают наличие в волосяном фолликуле утолщения — колбы, откуда берут своё начало клетки эпидермиса и его производных [4, 12].

В связи с этим в настоящей работе была поставлена цель: изучить локализацию пролиферирующих клеток в интерфолликулярном эпидермисе и сально-волосяном комплексе на примере кожи височной области лиц мужского пола.

Материалы и методы. Объектом исследования служила аутопсийная кожа височной области субъектов мужского пола. Участок кожи размером 1 × 1 см² забирали

по линии разреза тканей головы не позднее 12–14 часов после наступления смерти. Аутопсийные образцы не брали у лиц, страдавших при жизни, согласно данным протоколов судебно-медицинского и патологоанатомического вскрытия, заболеваниями кожи, сахарным диабетом и др. Кусочки фиксировали в забуференном 10 %-ном нейтральном формалине. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для выявления белка Ki-67 парафиновые срезы расправляли на водяной бане, помещали на предметные стекла с полилизинным покрытием и сушили в термостате при температуре 37 °С в течение 2–3 недель. Белок выявляли с помощью двойного непрямого метода окрашивания антител с использованием полимерной системы детекции. Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов проводили кипячением срезов в течение 10 минут под повышенным давлением в растворах Trilogy (Cell Marque, США). Применяли моноклональные антитела к Ki-67 клон SP6, выпускаемые той же фирмой, которые наносили на срезы в разведении 1:500 с последующей инкубацией во влажной камере в термостате при 37 °С в течение 1 часа. Визуализацию Ki-67-позитивных клеток проводили с помощью полимерной системы Histofine Simple DAB-3S kit Multi и AEC Solutio 3-амино-9-этилкарбазол (Nichei biosciences, Япония). Срезы докрашивали гематоксилином Караччи и заключали в канадский бальзам. Качество проведённой реакции оценивали путём сравнения с позитивным контролем.

Результаты и их обсуждение. В современной литературе колбу в составе волосяного фолликула рассматривают в качестве структуры, в которой локализуются долгоживущие тканеспецифичные стволовые клетки, за счёт которых осуществляется физиологическая и репаративная регенерация эпидермиса, сальной железы и волосяного фолликула [1, 5]. Вместе с тем в этих работах, как правило, не дано описание утолщения эпителия волоса (колбы) как гистологической структуры. По имеющимся у нас микрофотографиям, две из которых представлены на рис. 1 и 2, *a*, колба может быть описана как структура, лежащая на базальной мембране и расположенная в области наружного корневого эпителиального влагалища ниже ацинусов сальной железы и ближе к месту прикрепления мышцы, поднимающей волос. Образующие её мелкие клетки овальной или слегка вытянутой формы без четких границ сливаются с клетками наружного корневого эпителиального влагалища.

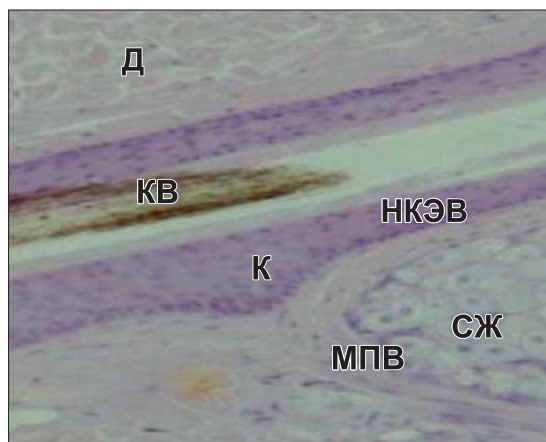


Рис. 1. Колба в составе наружного корневого эпителиального влагалища волосяного фолликула кожи височной области мужчины 25 лет.

Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10, ок. 10. Д — дерма; К — колба; НКЭВ — наружное корневое эпителиальное влагалище; СЖ — сальная железа; МПВ — мышца, поднимающая волос; КВ — мозговое вещество корня волоса

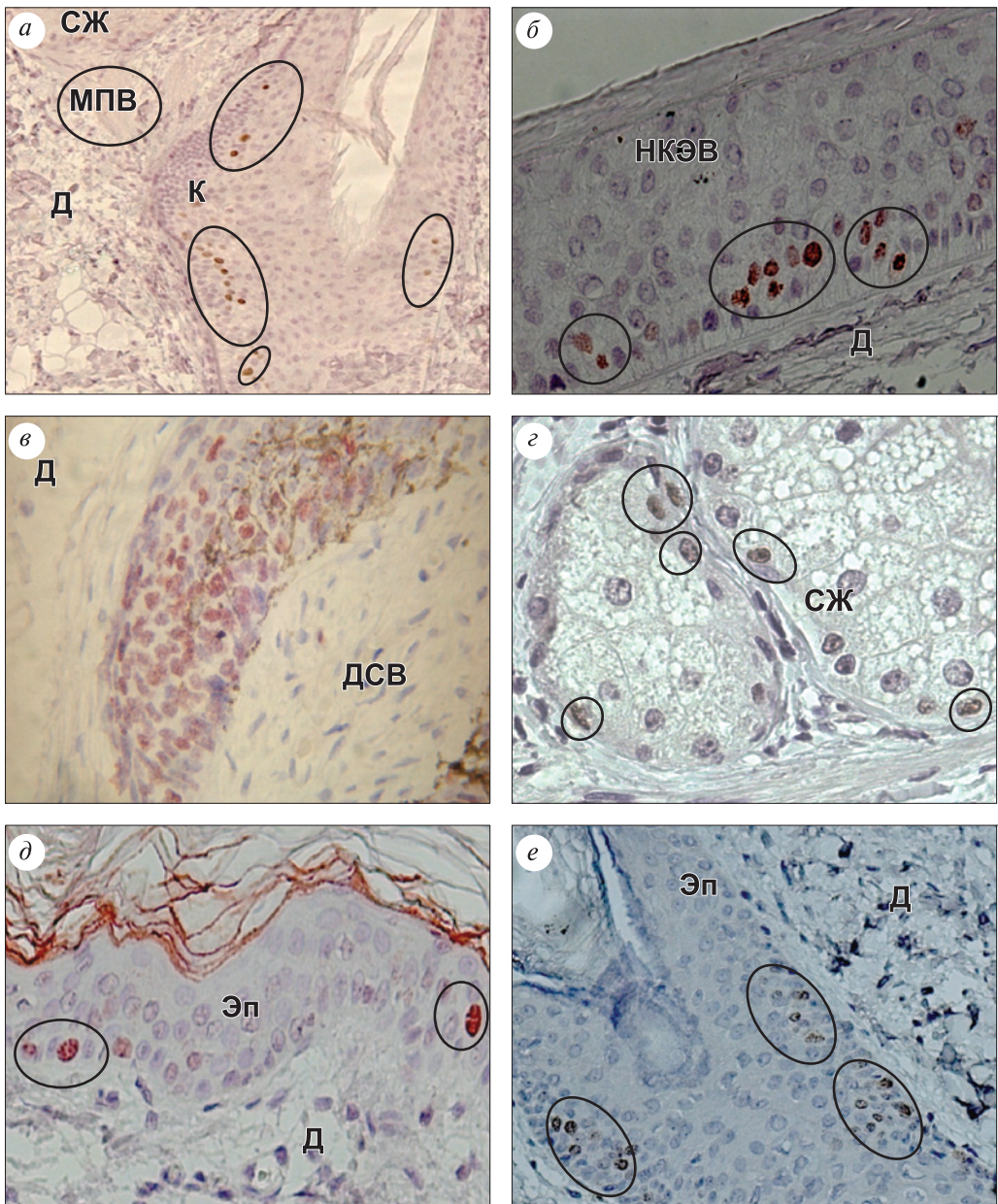


Рис. 2. Ki-67-позитивные клетки (в овалах) в области колбы (а), в наружном корневом эпителиальном влаглище (б) и матрице волосяной луковицы (в), в сальной железе (г), в интерфолликулярном эпидермисе (д) и в волосяной воронке (е) кожи височной области лиц мужского пола в возрасте 20 лет, 21 года, 36 лет, 21 года, 7 месяцев и 13 лет соответственно.

Окраска — МКА к Ki-67 и гематоксилин. Об. 10, ок. 10 (а), об. 20 ок. 10 (б, в, г), об. 40 ок. 10 (д, е). Эп — эпидермис; Д — дерма; К — колба; НКЭВ — наружное корневое эпителиальное влаглище; ДСВ — сосочек волоса; СЖ — сальная железа; МПВ — мышца, поднимающая волос

В волосяном фолликуле Ki-67-позитивные клетки локализовались под колбой (но не в ней) (рис. 2, *a*), в базальном и чаще супрабазальном слоях наружного корневого эпителиального влагалища (рис. 2, *b*) и в большом количестве — среди клеток волосяной матрицы (рис. 2, *в*). В сальных железах они визуализировались преимущественно среди клеток базального слоя и чуть выше него (рис. 2, *г*). Ki-67-позитивные клетки встречались также в базальном и шиповатом слоях межфолликулярного эпидермиса (рис. 2, *д*) и эпителии волосяной воронки (рис. 2, *е*). У людей молодого возраста этих клеток было больше, затем их количество снижалось.

Можно полагать, что процессы старения эпидермиса и его производных в коже височной области у мужчин связаны с возрастным истощением запаса Ki-67-позитивных клеток. Факт базально-супрабазального их расположения может отражать наличие у клеток асимметричных митозов, когда одна клетка остается в базальном слое, а другая, в последующем дифференцирующаяся, мигрирует вверх.

Таким образом, пролиферирующие (Ki-67-позитивные) клетки в коже височной области у мужчин располагаются в базальном и шиповатом слоях эпидермиса, базально-супрабазальных участках сальных желез и наружном корневом эпителиальном влагалище. В колбе они не выявлены.

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. *Газизов И. М.* Изменение микроархитектоники печени и активация в ней стволовых клеток после частичной гепатэктомии у крыс: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Казань, 2009.
3. *Кирик О. В., Безнин Г. В., Коржевский Д. Э.* Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях // Морфология. 2009. Т. 136. № 6. С. 95–100.
4. *Кузнецов С. Л., Горячкина В. Л., Цомартова Д. А.* Сальные и потовые железы, волосы, ногти // Ретиноиды. М.: Изд. ЗАО «Ретиноиды». 2007. Вып. 27. С. 53–75.
5. *Пальцев М. А., Терских В. В., Васильев А. В.* Что есть стволовая клетка // Биология стволовых клеток и клеточные технологии / Под ред. М. А. Пальцева. М.: Изд. Медицина, Шико, 2009. Т. 1. С. 13–30.
6. *Casasco A., Casasco M., Icaro Cornaglia A. et al.* Cell kinetics in a model of artificial skin. An immunohistochemical and flow cytometric analysis // *Europ. J. Histochem.* 2001. V. 45. P. 125–130.
7. *Endl E., Gerdes J.* The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 257. № 2. P. 231–237.
8. *Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H.* The production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation // *Int. J. Cancer.* 1983. V. 31. P. 13–20.

9. Greig A. V., Linge C., Cambrey A., Burnstock G. Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation and apoptosis in human fetal epidermis // *J. Invest. Dermatol.* 2003. V. 121. P. 1145–1149.
10. Knaggs H. E., Holland D. B., Morris C. et al. Quantification of cellular proliferation in acne using the monoclonal antibody Ki-67 // *J. Invest. Dermatol.* 1998. V. 197. № 2. P. 123–126.
11. Kreitz S., Fackelmayer F. O., Gerdes J., Knippers R. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 261. № 1. P. 284–292.
12. 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. Chapt. 3. P. 17–28.
13. Ross W., Hall P. A. Ki-67: from antibody to molecule to understanding? // *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.* 1995. V. 48. P. 113–117.