

УДК [572.524.11+572.524.23]:57.017.645

ОЧАГОВАЯ АЛОПЕЦИЯ У ПОТОМСТВА МЫШЕЙ КАК СЛЕДСТВИЕ АКТИВАЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МАТЕРИНСКОГО ОРГАНИЗМА НА РАННИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

Обернихин С.С., Яглова Н.В.

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва, e-mail: ober@mail.ru

Целью исследования было изучить последствия стимуляции иммунитета матери на ранних сроках беременности на развитие кожи и ее придатков у потомства. На 17-е сутки постнатального развития у потомства начиналось очаговое выпадение волос. Утрата волосяного покрова происходила от спины к брюху. На голове, конечностях и у основания хвоста волосяной покров сохранялся. Гистологическое исследование кожи выявило меньшее количество волосяных фолликулов и сальных желез, дефицит межклеточного вещества в дерме. Перед выпадением волос в коже уменьшалось количество выявляемых тучных клеток и снижалась их дегрануляция. Общее количество клеток в дерме также уменьшалось, среди них преобладали нейтрофилы. К пубертатному периоду волосяной покров восстанавливался. Полученные данные свидетельствуют, что стимуляция материнской иммунной системы на ранних сроках беременности приводит к нарушению пре- и постнатального развития кожи потомства, нарушению цикла роста волос и развитию очаговой алопеции.

Ключевые слова: очаговая алопеция, пренатальное воздействие, конканавалин А, кожа, волосяные фолликулы

SPONTANEOUS ALOPECIA AREATA IN OFFSPRING OF MURINE DAMS EXPOSED TO IMMUNOSTIMULATION IN EARLY PREGNANCY

Obernikhin S.S., Yaglova N.V.

Federal budgetary state institution «Scientific research Institute of Human Morphology» of the Russian Academy of Medical Science, Moscow, e-mail: ober@mail.ru

The objective was to investigate the effect of stimulation of maternal immunity in early pregnancy on development of skin and appendages in mice. Hair loss in litters began spontaneously on 17th day after birth. Hair shedding developed gradually on dorsal and later on ventral part of the skin. Hairs of head, limbs, and base of the tail were resistant to shedding. Histological examination of the skin found decreased number of hair follicles and sebaceous glands and deficit of dermal intercellular matrix. Prior to hair shedding decreased number mast cells and attenuation of their degranulation were found in the skin. Quantification of dermal cells revealed reduction of total cell number and prevalence of neutrophil granulocytes at the onset of hair loss. The mice restored hair covering until puberty. The data obtained suggest that stimulation of maternal immunity in early pregnancy might change pre- and postnatal morphogenesis of the fetal skin, alters hair growth cycle and cause alopecia areata in litter pups.

Keywords: alopecia areata, prenatal exposure, concanavalin A, skin, hair follicles

Одной из актуальных проблем как фундаментальной, так и клинической медицины является связь между воздействием стрессорных факторов на материнский организм во время беременности и изменениями постнатального функционирования органов и систем потомства. Известно, что последствием такого воздействия на организм матери могут быть изменения функционирования регулирующих и интегрирующих систем плода [4]. Наименее изученным аспектом являются последствия действия стрессорных факторов на материнский организм на ранних сроках беременности. Иммунная система матери зачастую играет ключевую роль в патогенезе патологического течения беременности и может приводить к недоразвитию и даже гибели плода [2, 8]. Однако воздействие на иммунную систему матери даже при нормальном завершении беременности, когда патология плода в постнатальном периоде не выявляется, может иметь отдалённые последствия [1]. **Целью исследования** было изучение постнатального морфогенеза кожи потом-

ства самок мышей, подвергшихся на раннем сроке беременности однократному иммуностимулирующему воздействию.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на 20 самцах мышей C57/BL6. Самцы опытной группы ($n = 10$) получены от самок, которым на 7-е сутки после оплодотворения в качестве стимулятора иммунной системы был однократно введён митоген конканавалин А (Кон А) в орбитальный синус в дозе 5 мг/кг. Контрольная группа была представлена самцами мышей C57/BL6 ($n = 10$), родившимися от интактных самок. Контрольные и опытные животные не отличались по темпам развития. Мышей выводили из эксперимента на 17-е сутки и через 1,5 месяца после рождения передозировкой диэтилового эфира. Забор кожи производили со спины, у мышей опытной группы брали соседние участки с сохранившимся волосяным покровом и без волосяного покрова. После стандартной гистологической проводки изготавливали парафиновые срезы органа, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином, для исследования тучных клеток по Н.В. Ягловой [3] – толуидиновым синим. Исследование препаратов проводили методом световой микроскопии и компьютерной морфометрии с помощью программы «Image Scope» («Leica Microsystems GmbH», Австрия). Для

статистической обработки данных использовали программу Statistica 7.0 («Statsoft», США). Статистически значимыми различия считали при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На 17 день постэмбрионального развития у мышей контрольной группы волосяной покров был полностью сформирован. В гистологических препаратах кожи спины различались три хорошо выраженных слоя: эпидермис, дерма и подкожно-жировая клетчатка. Эпидермис был относительно тонок (табл. 1). Мальпигиев слой состоял из 1–2 слоёв клеток. Кератиноциты имели ядра овальной формы, ориентированные как горизонтально, так вертикально, и умеренно базофильную цитоплазму. Встречались единичные делящиеся кератиноциты. Дерма была представлена коллагеновыми и эластическими волокнами со слабой окси-

фильной окраской и основным веществом. В коже находилось большое количество сальных желёз и волосяных фолликулов, большинство из которых содержало пуховые волосы. Приблизительно треть волосяных фолликулов имела связь с выводными протоками сальных желёз. В дерме выявлялось большое количество клеток: фибробластов и фиброцитов, макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток, единичных нейтрофилов. Тучные клетки располагались в различных слоях дермы и гиподерме. Большинство из них характеризовалась высоким содержанием секреторного материала. Около половины тучных клеток выделяло небольшое количество секреторных гранул (табл. 2). Клетки с низким содержанием гранул локализовались преимущественно субэпидермально. Подкожно-жировая клетчатка была слабо развита. Отмечалось неравномерное кровенаполнение сосудов.

Таблица 1

Возрастная динамика гистофизиологических характеристик кожи мышей контрольной и опытной групп ($M \pm m$)

Показатели	Возраст	17 суток	1,5 месяца
Толщина мальпигиева слоя, мкм			
Контрольная группа		12,60 ± 1,06	19,69 ± 0,64#
Опытная группа		17,48 ± 0,45*	16,17 ± 1,07*
Толщина дермы, мкм			
Контрольная группа		211,47 ± 7,24	501,92 ± 13,46#
Опытная группа		222,45 ± 6,11	383,45 ± 16,52*#
Количество волосяных фолликулов в мм ² кожи			
Контрольная группа		255,58 ± 6,13	130,49 ± 11,93#
Опытная группа		163,58 ± 13,42*	92,92 ± 11,61*#
Количество сальных желёз в мм ² кожи			
Контрольная группа		92,92 ± 5,74	45,13 ± 3,11#
Опытная группа		64,13 ± 7,89*	46,95 ± 7,50#
Доля волосяных фолликулов с сальными железами, %			
Контрольная группа		36,37 ± 2,13	34,58 ± 3,43
Опытная группа		39,26 ± 4,79	50,63 ± 1,00*#
Доля волосяных фолликулов, содержащих пуховые волосы, %			
Контрольная группа		65,72 ± 4,20	86,67 ± 7,31#
Опытная группа		3,72 ± 0,64*	96,00 ± 2,64#
Количество клеток в мм ² среза дермы			
Контрольная группа		7049,51 ± 1005,25	2353,33 ± 801,44#
Опытная группа		4272,67 ± 293,55*	2930,0 ± 250,0#

Примечание. * статистически значимые отличия от контрольной группы, # статистически значимые отличия показателей в возрасте 1,5 мес. от возраста 17 сут.

На 17 день постэмбрионального развития у потомства самок, которым на 7-е сутки беременности вводили Кон А, появился очаг выпадения волос на спине. Зона «расшатанных волос» составляла весь волосяной покров спины. При гистологическом исследовании участка кожи спины, находящегося рядом с очагом выпадения волос и сохранив-

шем волосяной покров, были выявлены следующие отличия (табл. 1). Мальпигиев слой был утолщён и состоял из двух-трёх слоёв кератиноцитов с более оксифильной цитоплазмой. Толщина дермы практически не отличалась от значений контрольной группы. Отмечалось уменьшение количества основного вещества по всей толщине дермы,

благодаря чему она имела рыхлое сетчатое строение. Количество волосяных фолликулов в мм² среза кожи было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе. Основная часть волосяных фолликулов содержала направляющие и остевые волосы, количество пуховых волос было уменьшено. Некоторые волосяные фолликулы были деформированы, имели кистообразный вид и содержали неправильно ориентированные, изогнутые волосы с неравномерным распределением пигмента в стержне волоса. Отмечался отёк соединительной ткани, окружающей волосяные фолликулы. Аналогично отмечалось уменьшение количества сальных желёз, вследствие чего связь сальных желёз

с волосяными фолликулами сохранялась. В дерме общее количество клеток было уменьшено, в том числе и выявляемых тучных клеток (табл. 2). Большинство тучных клеток отличалось высокой насыщенностью секреторным материалом, но количество клеток с низким содержанием секреторных гранул увеличилось. Они располагались в основном субэпидермально. В целом интенсивность выделения секреторных гранул за пределы клеток была ниже, чем в контрольной группе. Изменилась и топография тучных клеток в дерме и гиподерме. Многие из них располагались вдоль волосяных фолликулов. Выраженных изменений сосудистого русла не наблюдалось.

Таблица 2

Возрастная динамика цитофизиологических характеристик тучных клеток кожи мышей контрольной и опытной групп (M ± m)

Показатели	Возраст	
	17 суток	1,5 месяца
Количество тучных клеток в мм ² среза дермы		
Контрольная группа	189,67 ± 15,60	124,42 ± 2,84
Опытная группа:		157,23 ± 17,74*
Участок с волосяным покровом	153,87 ± 14,21*	
Участок без волосяного покрова	190,43 ± 16,77	
Средний гистохимический коэффициент тучных клеток		
Контрольная группа	1,93 ± 0,02	
Опытная группа:		1,89 ± 0,06
Участок с волосяным покровом	1,89 ± 0,02	2,02 ± 0,02*
Участок без волосяного покрова	2,03 ± 0,02	
Индекс дегрануляции тучных клеток		
Контрольная группа	49,51 ± 5,09	28,98 ± 6,34
Опытная группа:		38,89 ± 5,97
Участок с волосяным покровом	30,56 ± 4,08*	
Участок без волосяного покрова	17,66 ± 1,89*	

Пр и м е ч а н и е . * статистически значимые отличия от контрольной группы, # статистически значимые отличия показателей в возрасте 1,5 мес. от возраста 17 сут.

При макроскопическом исследовании участка кожи с утраченным волосяным покровом отмечалось сохранение единичных направляющих волос и отсутствие пуховых волос. Кожа имела бледно-розовую окраску. При гистологическом исследовании кожа имела те же особенности строения эпидермиса и дермы, что и в пограничной зоне. Чаще встречались деформированные волосяные фолликулы, содержащие изломанные стержни волос с нарушенной структурой и дезорганизованным расположением пигментных включений. Общее количество клеток в дерме было меньше, чем в контрольной группе. Главным отличием клеточной популяции дермы было превалирование нейтрофильных гранулоцитов, которое не наблюдалось ни в пограничной зоне, ни в контрольной группе. Количество

выявляемых тучных клеток не отличалось от значений в контрольной группе (табл. 2). Их насыщенность секреторным материалом повысилась, а интенсивность дегрануляции снизилась. Сохранялась связь тучных клеток с волосяными фолликулами.

В течение последующих 2–3 суток отмечалась прогрессирующая утрата волосяного покрова спины и живота. Волосяной покров сохранялся на голове, лапах и у основания хвоста (рисунок). При гистологическом исследовании кожи головы отмечалось топографическое изменение структуры дермы. Фронтально расположенный участок кожи головы имел строение дермы, аналогичное дерме животных контрольной группы. По направлению к цервикальному отделу в дерме содержание аморфного компонента межклеточного вещества уменьшалось,

но было большим, чем в коже спины. Через 2 недели у животных началось восстановление волосяного покрова. Рост волос происходил в обратном порядке, то есть

в первичном очаге выпадения рост волос происходил в последнюю очередь. К 1,5 месячному возрасту волосяной покров полностью восстанавливался.



Потомство самок мышей C57BL/6, подвергшихся на раннем сроке беременности однократному иммуностимулирующему воздействию (слева) и самок контрольной группы (справа) на 20-е сутки постнатального развития

В возрасте 1,5 месяцев у мышей контрольной группы при гистологическом исследовании препаратов кожи спины отмечалось утолщение эпидермиса и дермы (табл.1). Толщина подкожно-жировой клетчатки не изменилась. Кератиноциты имели овальные ядра, ориентированные преимущественно вертикально и слабо базофильную цитоплазму. Митотически делящиеся кератиноциты встречались чаще, чем в предыдущем сроке исследования. Дерма состояла из коллагеновых и эластических волокон, расположенных параллельно поверхности кожи и петлеобразно. Количество волосяных фолликулов в мм² площади дермы уменьшилось вдвое по сравнению с предыдущим сроком исследования. Большинство волосяных фолликулов содержали пуховые волосы. Многие фолликулы содержали два-три волоса. Количество сальных желёз также уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования. Сальные железы активно функционировали. Отмечалось увеличение их размеров, цитоплазма себоцитов приобрела менее оксифильную окраску, в некоторых себоцитах наблюдалась пикнотизация ядер. Половина волосяных фолликулов имела связь с выводными протоками сальных желёз. Значительно уменьшился клеточный компонент дермы. Преобладали фибробласты и тучные клетки. Встречались единичные

макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты. Количество выявляемых тучных клеток в мм² дермы уменьшилось в 1,5 раза (табл. 2). Большинство из них имело высокую насыщенность секреторным материалом. Клетки с низким содержанием секреторных гранул располагались преимущественно субэпидермально. Интенсивность выделения секреторных гранул уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком исследования. Сосудистое русло было хорошо развито, отмечалось неравномерное кровенаполнение сосудов подкожно-жировой клетчатки, просветы венозных сосудов дермы были, как правило, свободны.

У мышей опытной группы увеличения толщины эпидермиса по сравнению с предыдущим сроком исследования не наблюдалось (табл. 1). Толщина мальпигиева слоя была меньше, чем в контрольной группе. Кератиноциты имели более оксифильную цитоплазму по сравнению с контрольными животными. Митотически делящиеся кератиноциты встречались реже, чем в контрольной группе. Толщина дермы увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования, но была меньше, чем у животных контрольной группы аналогичного возраста. Подкожно-жировая клетчатка была умеренно развита. В дерме значительно увеличилось количество основного вещества, благодаря чему дерма приобрела

структуру, аналогичную коже животных контрольной группы. По сравнению с контрольной группой коллагеновые и эластические волокна имели более оксифильную окраску. Пространственная ориентация волокон в коже не отличалась от контрольной группы. Количество волосяных фолликулов в мм² площади кожи снизилось по сравнению с предыдущим сроком исследования и было меньше, чем у мышей контрольной группы. Большинство волосяных фолликулов содержали пуховые волосы, но в отличие от контрольной группы фолликулов, содержащих два-три волоса, было крайне мало. Количество сальных желёз уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования. Половина волосяных фолликулов имела связь с сальными железами. Количество клеток в коже также уменьшилось и существенно не отличалось от контрольной группы. По сравнению с предыдущим сроком исследования количество нейтрофилов значительно уменьшилось. Численность популяции тучных клеток была относительно стабильна (табл. 2). Их цитологические характеристики не отличались от значений контрольной группы. Тучные клетки располагались не вдоль волосяных фолликулов, а распределялись в коже аналогично тучным клеткам кожи у животных контрольной группы. Сосудистое русло кожи было хорошо развито, просветы сосудов были свободны.

У мышей контрольной группы в возрасте 17 суток кожа и её придатки были полностью сформированы. Ярко выраженная базофилия цитоплазмы кератиноцитов и большое количество фибробластов и фиброцитов в коже свидетельствовали об интенсивных синтетических процессах. К 1,5-месячному возрасту усилилась пролиферация кератиноцитов, увеличилась толщина эпидермиса и кожи. Вследствие активного роста животных происходило уменьшение численности волосяных фолликулов и сальных желёз в коже. Отмечалось появление волосяных фолликулов, содержащих несколько пуховых волос.

Постнатальный морфогенез кожи мышей опытной группы имел ряд отличий. Отмечался дисбаланс развития эпидермиса и кожи. Толщина мальпигиева слоя эпидермиса была больше, а кожа была развита слабее. Выявлялось уменьшение численности клеточной популяции кожи и, как следствие, дефицит аморфного компонента межклеточного вещества. Количество волосяных фолликулов и сальных желез, формирующихся в позднем эмбриональном периоде [5], было меньше. Происходило выпадение волос, преимущественно пуховых,

нарушение роста волоса. В коже наблюдался умеренный отёк. Несмотря на снижение общего количества клеток в коже, в ней присутствовало большое количество нейтрофилов. Сравнение на более позднем сроке строения кожи с сохранившимся волосяным покровом (кожа головы) показало, что в нём строение кожи соответствует контрольной группе животных, а дефицит основного компонента межклеточного вещества появляется в более каудально расположенном участке кожи головы, находящемся на границе с зоной выпадения волос. К 1,5 месяцам полностью восстановился волосяной покров. В коже значительно увеличилось количество аморфного вещества. Возрастная динамика морфофункционального состояния кожи соответствовала динамике у контрольных животных. Однако имелись существенные различия: митотически делящиеся кератиноциты встречались реже, несмотря на увеличение кожи, её толщина была меньше, волосяные фолликулы, содержащие два волоса, были единичными. Утрата волосяного покрова, наблюдаемая у потомства мышей, родившихся от самок, которым на 7 суток беременности вводили Кон А, начиналась на 17 суток с передней части спины и прогрессировала в течение 2 суток. Известно, что у грызунов синхронизация фолликулярного цикла происходит волнообразно в каудальном направлении [6]. Такая картина неравномерной потери волос с сохранением волосяного покрова на голове и конечностях возможно связана с различной чувствительностью волосяных фолликулов к медиаторам воспаления на различных стадиях цикла волос, в связи с тем, что длительность фолликулярного цикла варьируется в зависимости от локализации волоса [6]. Гистологические исследования показали, что фолликулы имели изогнутые и или сломанные волосы, в коже наблюдались нейтрофилы, мононуклеарные и тучные клетки. Фолликулярные изменения могут указывать, что выпадение волос является результатом аномального морфогенеза, который может быть связан с нарушениями фаз первого цикла роста волос, который у мышей начинается на 5-е сутки постнатального развития [5], а также с замедлением формирования кожи. Некоторые авторы указывают на увеличение числа тучных клеток вокруг волосяных фолликулов при алопеции [7]. Сравнение цитологических характеристик тучных клеток в очаге выпадения волос и в пограничной зоне выявило, что окружение тучными клетками волосяных фолликулов и выделение ими секреторного материала предшествуют выпадению волос.

Выводы

1. Активация иммунной системы материнского организма на ранних сроках беременности приводит к нарушению эмбрионального и постнатального морфогенеза кожи, проявляющегося закладкой меньшего количества волосяных фолликулов и сальных желез в эмбриональном периоде у потомства и замедлением формирования соединительнотканного компонента кожи в постнатальном периоде.

2. В коже в конце второй недели постнатального развития начинаются процессы, приводящие к выпадению волос (отёк дермы, инфильтрация дермы нейтрофилами, окружение тучными клетками волосяных фолликулов и выделение секреторного материала). Рост новых волос нарушается из-за патологических изменений волосяных фолликулов и стержней волос. Несформированность дермы является одним из факторов выпадения волос, так как восстановление волосяного покрова происходит параллельно с увеличением основного вещества в дерме.

Список литературы

1. Обернихин С.С. Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на состояние противоопухолевого иммунитета потомства // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.156, no. 7. – С. 78–81.
2. Щербаков В.И. Апоптоз в трофобласте и его роль при патологии беременности // Успехи современной биологии. – 2011. – Т.131, no. 2. – С. 145–158.
3. Яглова Н.В., Яглов В.В. Биология секреции тучных клеток // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – no. 4. – С. 4–10.
4. Merlot, E., Couret, D., and Otten, W. Prenatal stress, fetal imprinting, and immunity // *Brain Behav. Immunity.* – 2007. Vol. 22. – P. 42–51.
5. Peters E. Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice // *J. Comp. Neurol.* – 2002. – Vol. 448. – P. 28–52.

6. Stenn K., Paus R. Controls of hair follicle cycling // *Physiol Rev.* – 2001. – Vol. 81. – P. 449–494.

7. Vanderford D. Alopecia in IL-10-deficient mouse pups is c-Kit-dependent and can be triggered by iron deficiency // *Exp. Dermatol.* – 2010. – Vol. 19, № 6. – P. 518–526.

8. Zhu B. Development of selective immune tolerance towards the allogeneic fetus during pregnancy: Role of tryptophan catabolites (Review). // *Int. J. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 25, no. 6. – P. 831–835.

References

1. Merlot, E., Couret, D., and Otten, W. Prenatal stress, fetal imprinting, and immunity // *Brain Behav. Immunity.* 2007. Vol. 22. pp. 42–51.

2. Obernihina S.S. Vliyanie aktivacii immunnoj sistemy materinskogo organizma v rannie sroki beremennosti na sostojanie protivopuholevogo immuniteta potomstva // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2013. T.156, no. 7. pp. 78–81.

3. Peters E. Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice // *J. Comp. Neurol.* 2002. Vol. 448. pp. 28–52.

4. Shherbakov V.I. Apoptoz v trofoblaste i ego rol' pri patologii beremennosti // *Uspehi sovremennoj biologii.* 2011. T.131, no. 2. pp. 145–158.

5. Stenn K., Paus R. Controls of hair follicle cycling // *Physiol Rev.* – 2001. Vol.81. P. 449–494.

6. Vanderford D. Alopecia in IL-10-deficient mouse pups is c-Kit-dependent and can be triggered by iron deficiency // *Exp. Dermatol.* 2010. Vol. 19, № 6. pp. 518–526.

7. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Biologija sekrecii tuchnyh kletok // *Klinicheskaja i jeksperimental'naja morfologija.* 2012. no. 4. pp. 4–10.

8. Zhu B. Development of selective immune tolerance towards the allogeneic fetus during pregnancy: Role of tryptophan catabolites (Review) // *Int. J. Mol. Med.* 2010. Vol. 25, no. 6. pp. 831–835.

Рецензенты:

Благонаров М.Л., д.м.н., профессор кафедры общей патологии и патофизиологии, ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», г. Москва.

Макарова О.В., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 25.12.2013.