

© С. А. Жучков, Т. А. Белоусова, В. И. Ноздрин, 2012
УДК 611.771:599.323.4

С. А. Жучков, Т. А. Белоусова и В. И. Ноздрин

ТОЛЩИНА ЭПИДЕРМИСА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЕРАТИНОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ НАКОЖНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНА D₃

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. В. И. Ноздрин), Медицинский институт, Орловский государственный университет; научный отдел (руков. — канд. биол. наук О. И. Лаврик), Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», Москва

Методом световой микроскопии с применением морфометрии и иммуногистохимии изучен эпидермис кожи 72 самцов и самок крыс через 1 сут и 1 мес после окончания ежедневных накожных аппликаций композиции с витамином D₃, проводимых в течение 2 нед. Установлено, что витамин D₃ вызывает статистически значимое уменьшение толщины интерфолликулярного эпидермиса и числа Ki-67-позитивных кератиноцитов. Выявленные эффекты сохраняются в течение 1 мес после последнего нанесения препарата. Модифицирующее влияние витамина D₃ на морфогенетические процессы в эпидермисе, проявляющиеся, в частности, снижением пролиферативной активности кератиноцитов, обсуждается в свете данных о возможности образования его активного метаболита — кальцитриола — непосредственно в коже.

Ключевые слова: эпидермис, пролиферация, кератиноциты, витамин D₃, кальцитриол

Витамин D имеет две формы — витамин D₂ (эргокальциферол) и витамин D₃ (холекальциферол); к их активному метаболиту (кальцитриолу) у клеток многих тканей и органов есть ядерные рецепторы [6]. Кальцитриол рассматривается в качестве аналога стероидных гормонов [5], способного генерировать биологические реакции в тканях-мишенях, в том числе в коже, оказывая влияние на морфогенез её структурных компонентов и, прежде всего, — кератиноцитов [6]. Морфологические аспекты дерматотропных эффектов витамина D₃ изучали в основном на примере синтетических аналогов его активных метаболитов — кальцитриола (дайвонекс, дайвобет), таккальцитола (куратодерм); при этом авторы, как правило, отмечают, что эти соединения тормозят пролиферацию кератиноцитов и ускоряют их дифференцировку [11, 13]. Однако встречаются сообщения, что производные витамина D₃ усиливают пролиферацию кератиноцитов [10]. Морфологические проявления воздействия на кожу в условиях наружного нанесения самого холекальциферола, а не его активных метаболитов, в литературе практически не освещены. Сведений о том, являются ли дерматотропные фармакологические эффекты воздействия витамина D₃ и его активных метаболитов пролонгированными, и если да, то как долго после окончания аппликаций сохраняются морфологические про-

явления этих эффектов, мы также не встретили. В связи с изложенным представляется актуальным экспериментальное изучение морфогенетических процессов, происходящих в эпидермисе в условиях накожного воздействия витамина D₃ и длительности существования достигнутых при этом фармакологических эффектов.

Цель настоящего исследования — изучение особенностей строения эпидермиса и его толщины, а также пролиферативной активности кератиноцитов в условиях накожного нанесения композиции, содержащей витамин D₃.

Материал и методы. Исследование проводили на самках и самцах половозрелых беспородных крыс в возрасте 1,5–2 мес, полученных из филиала ГУ НЦ биомедицинских технологий РАМН «Столбовая» и выдержанных в карантине в течение 2 нед. Опыты поставлены в условиях вивария ЗАО «Ретиноиды» в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Все параметры содержания животных (температура в помещении, влажность, освещённость, корм, вода и др.) были стандартизированы и соответствовали санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Животные были разделены на 3 группы по 24 особи в каждой: 1-я контрольная группа — интактные животные; 2-я контрольная группа — животные, получавшие аппликации эмульсионной (эмульсия вазелинового масла в воде) основы; 3-я группа — экспериментальные животные, получавшие аппликации композиции с витамином D₃ (DSM Nutritional Products Ltd., Швейцария)

Сведения об авторах:

Жучков Сергей Александрович (e-mail: orelhistret@orl.ru), *Белоусова Татьяна Александровна* (e-mail: belousova@retinoids.ru), *Ноздрин Владимир Иванович* (e-mail: science@retinoids.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Медицинский институт, Орловский государственный университет, 302028 Орел, ул. Октябрьская, 25

на той же основе. Аппликации проводили на предварительно выстриженный участок кожи межлопаточной области спины размером 2×2 см в вечерние часы на протяжении 14 сут (без повторной стрижки); количество ежедневно наносимой композиции составило 0,125 мг/см² (0,5 г на животное в сутки, в пересчёте на чистый витамин D₃ — 125 мг/кг массы тела). Образцы кожи из зоны аппликаций брали через 1 и 30 сут после окончания аппликаций. Эвтаназию крыс осуществляли парами хлороформа.

Образцы кожи фиксировали в расплавленном состоянии в 10% забуференном формалине (рН 7,4). Проводку, заливку образцов в парафин и изготовление срезов проводили по стандартным методикам. Просмотр окрашенных гематоксилином—эозином срезов и морфометрические исследования осуществляли с помощью светового микроскопа AxioStar (Carl Zeiss, Германия), а также — комплекса цифрового микроскопического Микмед-2-1600-3 (Россия) и свободно распространяемого программного обеспечения Image Tool. Измеряли толщину эпидермиса от базальной мембраны до рогового слоя, а также суммарную толщину базального и шиповатого слоёв.

Для изучения пролиферативной активности кератиноцитов использовали антитела к Ki-67 (Clone SP-6, Cell Marque, США). Иммуногистологическое окрашивание осуществляли согласно рекомендациям фирмы-производителя. Экспрессию Ki-67 оценивали, рассчитывая индекс Ki-67 (I_{Ki-67}), как долю (%) меченых ядер по отношению к общему числу ядер в базальном и шиповатом слоях в поле зрения микроскопа. Исследовали по одному срезу кожи от каждого животного. Подсчёты делали при об. 100, ок. 15 в 20–23 полях зрения среза. Статистическую обработку проводили с помощью параметрических методов вариационной статистики (вычисление наименьших квадратов разностей и t-критерия Стьюдента) с использованием программного обеспечения Microsoft Excel; статистически значимыми считали результаты с уровнем вероятности не менее 95%.

Результаты исследования. Через 1 сут после окончания аппликаций основы в сравнении с эпидермисом интактных животных наблюдается некоторое истончение зернистого и рогового

слоёв. При аппликациях композиции с витамином D₃ отмечалось неравномерное (более выраженное у самцов) уменьшение толщины клеточного эпидермиса, в основном за счёт базального и шиповатого слоёв (рисунок, а, б).

Через 30 сут эпидермис животных, получавших аппликации основы, практически не отличался от такового у интактных животных. У крыс, подвергнутых накожному воздействию композиции с витамином D₃, эпидермис выглядел истончённым за счёт всех слоёв клеточного эпидермиса (см. рисунок, в, г); при этом у самок этот эффект был выражен сильнее.

Визуальные наблюдения подтверждены данными морфометрического исследования (табл. 1).

Эффект при исследовании композиции с витамином D₃ является пролонгированным и сохраняется в течение 30 сут после окончания воздействия; при этом он более выражен, чем через 1 сут. Через 30 сут после окончания аппликаций как общая толщина клеточного эпидермиса, так и суммарная толщина его базального и шиповатого слоёв статистически значимо отличаются от показателей в обеих контрольных группах. Зернистый слой эпидермиса через 30 сут после окончания аппликаций в коже животных, подвергнутых воздействию витамина D₃, тоньше, чем у интактных животных (1,63 и 5,27 мкм у самок, 7,86 и 9,20 мкм у самцов соответственно), в то время как толщина зернистого слоя у крыс, получавших аппликации мазевой основы, через 30 сут после их окончания почти не отличалась от таковой у интактных животных (4,44 и 5,27 мкм у самок, 9,26 и 9,20 мкм у самцов соответственно).

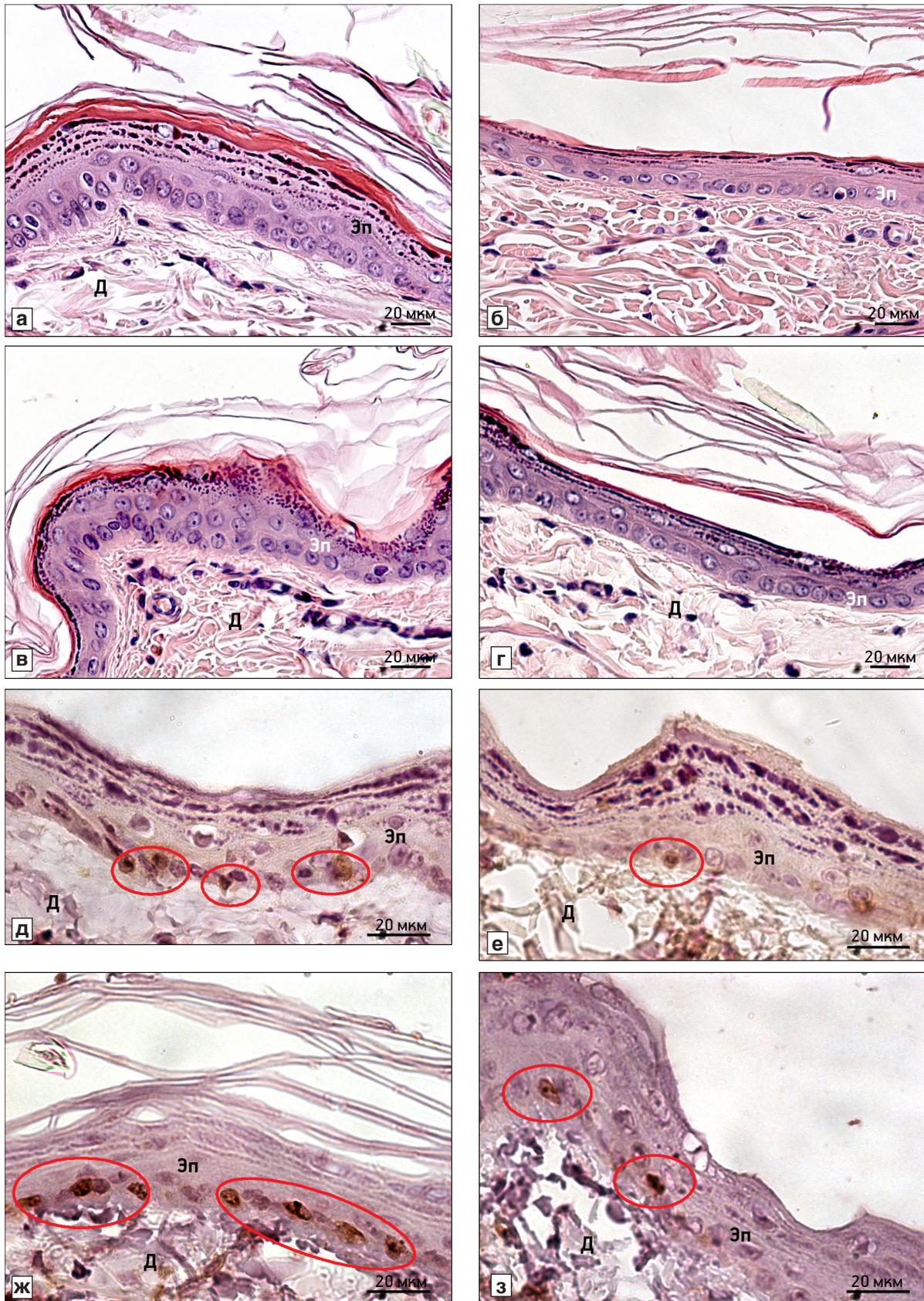
При изучении срезов, окрашенных с помощью моноклональных антител к маркеру пролифера-

Таблица 1

Толщина интерфолликулярного эпидермиса у контрольных крыс и после ежедневных накожных аппликаций композиции с витамином D₃ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм)

Срок после окончания аппликаций, сут	Группы животных	Толщина эпидермиса, мкм			
		от базальной мембраны до рогового слоя		от базальной мембраны до зернистого слоя	
		Самки	Самцы	Самки	Самцы
–	1-я контрольная (интактные)	22,4±0,4	33,6±0,6	17,9±0,3	21,1±0,3
1	2-я контрольная (аппликация основы композиции)	20,7±0,4*	30,0±0,4*	16,7±0,3	21,11±0,28
	Аппликация композиции с витамином D ₃	19,5±0,4*	29,8±0,4*	16,12±0,29*	18,95±0,24*†
30	1-я контрольная (интактные)	24,1±0,4	32,1±0,6	18,8±0,3	22,9±0,4
	2-я контрольная (аппликация основы композиции)	22,3±0,4*	31,2±0,6	17,8±0,3	21,9±0,4
	Аппликация композиции с витамином D ₃	16,2±0,4*†	27,8±0,6*†	14,6±0,4*†	19,9±0,3*†

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — различия по сравнению с показателями у животных интактной группы; † — различия по сравнению с показателями у животных, получавших аппликации основы композиции, значимы при P≤0,05.



Фрагменты кожи межлопаточной области крыс-самцов — intactных (а, в, д, ж), через 1 сут (б, е) и через 30 сут (г, з) после окончания накожных в течение 2 нед аппликаций композиции с витамином D₃.

Эп — эпидермис; Д — дерма; Ki-67-позитивные клетки обведены овалами, продукт реакции — коричневого цвета. а-г — окраска гематоксилином—эозином; д-з — иммуногистохимическая реакция с использованием моноклональных антител к Ki-67 и докраской ядер гематоксилином

Таблица 2

**Экспрессия Ki-67 кератиноцитами интерфолликулярного эпидермиса у контрольных крыс
и после ежедневных накожных аппликаций композиции с витамином D₃**

Срок после окончания аппликаций, сут	Группы животных	Индекс Ki-67	
		Самки	Самцы
– 1	1-я контрольная (интактные)	14,1±0,5	15,5±0,6
	2-я контрольная (аппликация основы композиции)	13,5±0,4	14,7±0,5
	Аппликация композиции с витамином D ₃	12,9±0,4	13,4±0,3*
– 30	1-я контрольная (интактные)	16,9±0,4	21,5±0,5
	2-я контрольная (аппликация основы композиции)	16,1±0,6	20,1±0,5
	Аппликация композиции с витамином D ₃	13,0±0,6*†	18,2±0,4*†

ции Ki-67, обнаружено, что у интактных животных меченые ядра кератиноцитов располагаются только в базальном слое интерфолликулярного эпидермиса, группами по 2–4 клетки. Эпидермис животных 2-й контрольной группы визуально не отличался от эпидермиса интактных животных по интенсивности мечения кератиноцитов антителами. Ежедневные в течение 2 нед накожные аппликации композиции с витамином D₃ привели к снижению числа кератиноцитов, экспрессирующих Ki-67 (см. рисунок, д–з). Подсчёты подтвердили эти наблюдения (табл. 2).

Через 30 сут после прекращения аппликаций композиции с витамином D₃ количество меченых ядер в интерфолликулярном эпидермисе у крыс продолжает оставаться сниженным (см. рисунок, ж, з, табл. 2); у самок этот эффект выражен несколько сильнее.

Таким образом, ежедневные, в течение 14 сут аппликации композиции с витамином D₃ на кожу межлопаточной области спины у крыс приводят к снижению экспрессии Ki-67 кератиноцитами интерфолликулярного эпидермиса, что проявляется уменьшением соответствующего индекса и свидетельствует о падении уровня их пролиферативной активности. Через 30 сут после окончания нанесения композиции с витамином D₃ индекс Ki-67 в эпидермисе значимо меньше, чем у контрольных животных обоего пола.

Обсуждение полученных данных. Проведённое исследование выявило, что строение интерфолликулярного эпидермиса кожи интактных крыс соответствует известной видовой норме с учётом половых особенностей [2]. Ежедневные в течение 14 сут накожные аппликации основы композиции вызывают у крыс уменьшение толщины клеточного эпидермиса (до рогового слоя), но не суммарной толщины его базального и шиповатого слоёв, что, возможно, связано с механическим воздействием шпателя на верхние слои кожи, способствующим десквамации части роговых чешуек и зернистых кератиноцитов, а также — с вяжу-

щим, дубящим воздействием на ткани этилового спирта, входящего в состав основы композиции.

Аппликации на кожу композиции с витамином D₃ приводят к статистически значимому истончению интерфолликулярного эпидермиса и снижению в нём числа кератиноцитов, экспрессирующих Ki-67; ранее было показано, что эти показатели друг с другом коррелируют [3]. Таким образом, витамин D₃ в условиях накожного воздействия модифицирует морфогенетические процессы в эпидермисе, уменьшая пролиферативную активность кератиноцитов. Объяснить возникновение этих эффектов в результате накожного нанесения нативного витамина D₃ можно, учитывая появившиеся в последние годы сообщения, что кальцитриол может образовываться из холекальциферола непосредственно в коже с участием дендритных клеток и Т-лимфоцитов [9, 12] и кератиноцитов [8]. Локально концентрируясь, этот метаболит, подобно стероидным гормонам, воздействует на эпидермис, приводя к его истончению в результате снижения пролиферативной активности кератиноцитов. Ферментные системы клеток кожи, обеспечивающие превращение витамина D с образованием кальцитриола, работают и в отношении витамина D₂, хотя и менее эффективно [12]. Сохранность и даже некоторое усиление фармакологического эффекта композиции с витамином D₃, выявленные через 30 сут после окончания аппликаций, могут быть связаны с воздействием кальцитриола на иммунокомпетентные клетки и выработку ими цитокинов, способных влиять на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток-мишеней с формированием паракринных цитокиновых сетей [4]. Так, известно, что кальцитриол вызывает миграцию Т-лимфоцитов по направлению к эпидермису (эпидермотропизм) [9, 12], возможно, с целью уничтожения дефектных клеток, образующихся при воздействии повреждающих факторов, а также ограничивает антиген-представляющую функцию клеток Лангерганса, синтезирующих

факторы, регулирующие пролиферацию кератиноцитов [7]. В связи с обсуждаемым вопросом следует упомянуть также концепцию, согласно которой лимфоциты, как наиболее чувствительные акцепторы различной информации об изменениях внешней и внутренней среды, способны оказывать воздействие на морфогенетические процессы в тканях, в том числе на обеспечивающие физиологическую регенерацию [1].

Таким образом, витамин D₃ в составе мазевой композиции при ежедневном в течение 14 сут нанесении на неповрежденную, лишённую волосяного покрова кожу крыс вызывает уменьшение толщины клеточного эпидермиса, ингибируя пролиферативную активность кератиноцитов. Эффект является пролонгированным, сохраняясь по меньшей мере в течение 30 сут после окончания аппликаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаева А. Г., Геворкян Н. М. и Зотиков Е. А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Изд-во РАМН, 2009.
2. Ноздрин В. И., Белоусова Т. А., Альбанова В. И. и Лаврик О. И. Гистофармакологические исследования кожи. М., изд. ЗАО «Ретиноиды», 2006.
3. Ноздрин В. И., Горелова М. В. и Белоусова Т. А. Возрастные изменения эпидермиса кожи волосистой части головы у мужчин. Морфология, 2011, т. 139, вып. 1, с. 74–81.
4. Симбирцев А. С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление, 2002, № 1, с. 9–14.
5. Шварц Г. Я. Витамин D и D-гормон. М., Анахарсис, 2005.
6. Шварц Г. Я. Витамин D, D-гормон и альфакальцидол: медицинские, молекулярно-биологические и фармакологические аспекты. Украинск. ревматол. журн., 2009, т. 37, № 3, с. 63–69.
7. Bagot M., Charue J. D., Pamphile R. and Revuz J. Immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues calcipotriol on epidermal cells. Br. J. Dermatol., 1994, v. 130, p. 424–431.
8. Bilde D. D. Vitamin D metabolism and function in the skin. Mol. Cell Endocrinol., 2011, v. 347, № 1–2, p. 80–90.
9. Mora J. R., Iwata M. and von Andrian U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D takes centre stage. Nat. Rev. Immunol., 2008, v. 8, p. 685–698.
10. Rouqui Z., Pavlovitch J. and Rizk-Rabin M. In vivo effects of vitamin D on the proliferation and differentiation of rat keratinocytes. J. Cell Physiol., 1996, v. 168, № 2, p. 385–394.
11. Shirakata Y. Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. J. Dermatol. Sci., 2010, v. 59, № 2, p. 73–80.
12. Sigmundsdottir H., Pan J., Debes G. F. et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D₃ to «program» T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. Nat. Immunol., 2007, v. 8, № 3, p. 285–293.
13. Uroda I., Quatresooz P., Hermanns-Lê T. et al. Histometric assessment of psoriatic plaques treated by vitamin D₃ derivatives. Dermatology, 2003, v. 206, p. 366–369.

Поступила в редакцию 23.03.2012

Получена после доработки 05.07.2012

EPIDERMAL THICKNESS AND KERATINOCYTE PROLIFERATION AFTER CUTANEOUS APPLICATION OF VITAMIN D₃

S. A. Zhuchkov, T. A. Belousova and V. I. Nozdrin

Using light microscopy, morphometry and immunohistochemistry, the epidermis of 72 male and female rats was examined 1 day and 1 month after the completion of daily cutaneous applications of vitamin D₃-containing composition lasting for two weeks. It was found that vitamin D₃ causes a statistically significant reduction in the thickness of interfollicular epidermis and in the number of Ki-67 positive keratinocytes. The identified effects persisted for 1 month after the last application of the preparation. Modifying influence of vitamin D₃ on the morphogenetic processes in the epidermis, which were manifested, in particular, by a decreased proliferative activity of keratinocytes, is discussed in the light of the data on the possibility of the formation of its active metabolite – calcitriol – directly in the skin.

Key words: epidermis, proliferation, keratinocytes, vitamin D₃, calcitriol

Department of Histology, Cytology and Embryology, Medical Institute of Oryol State University, Scientific Department, «Retinoids» Pharmaceutical Scientific-Production Enterprise, Moscow