

АНАЛИЗ ЦИТОКИНОВ И АТФ В ЭПИЛИРОВАННЫХ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛАХ

Е.В.Михальчик¹, О.В.Морозова¹, Т.В.Цимбаленко², З.Ф.Хараева³,
Н.Г.Балабушевич⁴, В.А.Липатова⁵, А.Г.Гаджигорова²

¹ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва; ²ГБУЗ МНПЦДК ДЗ г. Москвы, Москва, РФ; ³ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М.Бербекова, Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, РФ; ⁴Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ; ⁵ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России, Москва

В экстрактах эпилированных вручную волосяных фолликулов здоровых добровольцев (норма) и пациентов с андрогенетической алопецией измеряли концентрацию АТФ и ИЛ-6 и ИЛ-10 и рассчитывали их содержание в каждом фолликуле. За исключением ИЛ-6, величина показателей была прямо пропорциональна длине волосяного фолликула. Концентрация АТФ в экстрактах коррелировала с активностью ЛДГ, что указывало на повреждение клеток. По сравнению с нормой при алопеции в фолликулах длиной до 1 мм увеличивалось содержание ИЛ-10, а при длине от 2 мм — содержание АТФ. Содержание ИЛ-6 и ИЛ-10 по данным ИФА было сопоставимо с результатами измерения мРНК методом ОТ-ПЦР, что свидетельствует о невысоком уровне экспрессии генов цитокинов. Содержание АТФ и ИЛ-10, но не ИЛ-6, зависит от длины эпилированного волосяного фолликула и от патогенетических факторов, влияющих на рост волос.

Ключевые слова: волосяные фолликулы; АТФ; интерлейкин-6; интерлейкин-10; морфометрия

Функционирование волосяных фолликулов (ВФ) характеризуется генетически запрограммированной цикличностью: за стадией развития и активной продукции стержня волоса (анаген) следует период затухания активности (катаген) и фаза покоя (телоген), затем волос выпадает (экзоген). При нарушении этого цикла под действием гормонов-андрогенов, в первую очередь дигидротестостерона, развивается андрогенетическая алопеция (АГА) [1]. К числу медиаторов, участвующих в межклеточной коммуникации на разных стадиях развития волоса, относятся факторы роста [9], а также цитокины [13] и АТФ [5]. Цитокины, продуцируемые клетками ВФ, участвуют в поддержании

барьерных функций кожи, стимулируя хемотаксис моноцитов — предшественников клеток Лангерганса (хемокины CCL2, CCL8, CCL20), в поддержании статуса иммунной привилегированности (ИЛ-10 и TGF- β) [9], в регуляции клеточной пролиферации и роста волоса (ИЛ-6) [10]. Молекулы АТФ, синтезируемые в ходе гликолиза и митохондриального дыхания, обеспечивают энергетические потребности клеток, а также служат источником аденозина при синтезе РНК. Под действием аденилатциклазы АТФ превращается в цАМФ, участвующий в передаче сигнала дигидротестостерона [14].

Низкий базовый уровень высвобождаемого кератиноцитами АТФ необходим для нормальной коммуникации между клетками в эпидермисе и поддержания гомеостаза [5]. Выделение АТФ увеличивается под действием внешних факторов — механической и термической

Адрес для корреспонденции: lemik2007@yandex.ru. Михальчик Е.В.

doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-9-286-289

травмы, низких рН, гипотонической среды, контакта с воздухом [4], а его эффекты реализуются через пуриnergические рецепторы, стимулируя образование ИЛ-6 [8] и хемокина CCL2 [12] кератиноцитами. Концентрация внутриклеточного цАМФ регулирует экспрессию мРНК ИЛ-6 и ИЛ-10 [7], а ИЛ-6, в свою очередь, нарушает пролиферацию клеток ВФ [10]. Оба цитокина, ИЛ-6 и ИЛ-10, выявляются в клетках ВФ иммуногистохимическими методами [3]. Таким образом, АТФ может влиять на синтез цитокинов различными путями — через изменение внеклеточного пула и пуриnergические рецепторы и/или через образование цАМФ, а цитокины участвуют в регуляции функциональной активности клеток.

Цель данной работы — анализ содержания АТФ, ИЛ-6 и ИЛ-10 в единичных эпилированных ВФ и их связи с длиной ВФ и действием андрогенов как патогенетического фактора.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для приготовления буферных растворов использовали соли производства Sigma-Aldrich; лизирующие растворы для выделения нуклеиновых кислот (из набора "Проба-НК") — от компании "ДНК-технология".

Эпилированные ВФ являются удобной моделью для неинвазивного исследования волос в норме и при патологии. Объектом исследования являлись эпилированные ВФ здоровых добровольцев ($N=4$) и пациентов с АГА ($N=3$), полученные на основании информированного согласия. Эпиляцию проводили вручную, извлекая ВФ в зоне темени. После морфометрии с помощью светового микроскопа образцы помещали в герметичные пластиковые пакеты или в пробирки с лизирующим раствором и хранили не более 7 сут при 4–8°C.

Для получения экстрактов единичные ВФ помещали в 0.25 мл 0.05 М калий-фосфатного буфера с 0.005 М $MgCl_2$ и инкубировали 30 мин при 25°C, затем интенсивно встряхивали. Содержание АТФ в экстрактах измеряли методом хемилюминесценции, добавляя к 0.2 мл экстрактов 5 мкл стандартного раствора люциферин-люциферазы («Люмтек») и регистрируя сигнал в режиме слежения с помощью хемилюцинометра Lum1200 ("ДиСофт"). Концентрацию цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-10) в экстрактах определяли методом ИФА, используя наборы ООО "Цитокин", активность ЛДГ в экстрактах — по изменению поглощения NADH с помощью наборов "Ольвекс". Нуклеиновые

кислоты выделяли с использованием набора "Проба-НК" ("ДНК-технология") в соответствии с инструкцией производителя, после чего проводили обратную транскрипцию с использованием набора "Реверта-L" ("АмплиСенс") с последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Количественную оценку проводили с использованием калибровочной прямой зависимости пороговых циклов флуоресценции от количества геном-эквивалентов анализируемых мРНК и уравнения Лукьянова—Матца.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.). Достоверность различий оценивали с использованием критерия Манна—Уитни при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфометрический анализ выявил значительную гетерогенность ВФ по длине с двумя максимумами, наблюдавшимися в норме и при АГА: доля ВФ длиной до 1 мм составляла 42 и 39%, от 2 до 3 мм — 38 и 39% соответственно. Содержание АТФ в единичных ВФ, рассчитанное на основании концентрации АТФ в экстрактах, было пропорционально их длине (рис. 1) и коррелировало с активностью ЛДГ в этих же экстрактах ($R=0.87$; $p < 0.01$). Измерение концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в экстрактах позволило оценить их содержание в ВФ известной длины. При этом содержание ИЛ-10 было пропорционально длине в норме и при АГА, а при длине до 1 мм — было выше при АГА, чем

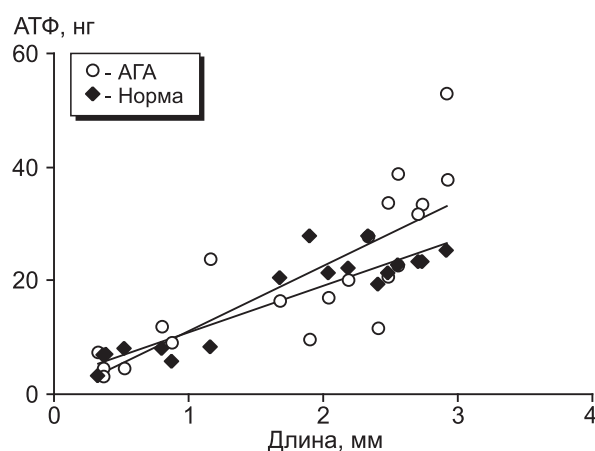


Рис. 1. Зависимость между содержанием АТФ в эпилированных ВФ и их длиной в норме и при АГА. Коэффициенты корреляции 0.96 (норма) и 0.85 (АГА) при $p < 0.01$.

в норме (0.11 ± 0.05 и 0.420 ± 0.015 пг на ВФ соответственно, $p < 0.05$) (рис. 2). Нам не удалось выявить зависимость между длиной ВФ и содержанием ИЛ-6 ни в норме, ни при АГА. Также ни в одной из фракций ВФ (до 1 мм и от 2 мм) не было достоверных различий по содержанию ИЛ-6 в норме и при АГА.

Как и в предыдущем исследовании, гомогенизация ВФ вместо экстракции или повторная экстракция свежей порцией буферного раствора не увеличивала выход АТФ [2], а также ИЛ-6 или ИЛ-10.

Содержание ИЛ-6 и ИЛ-10 в ВФ сопоставляли с величиной показателя, рассчитанного на основании оценки уровня экспрессии соответствующей мРНК. Для этого использовали ВФ длиной от 2.2 до 2.5 мм, часть которых подвергли экстракции ($n=8$), а другую использовали для выделения нуклеиновых кислот ($n=8$) (рис. 3).

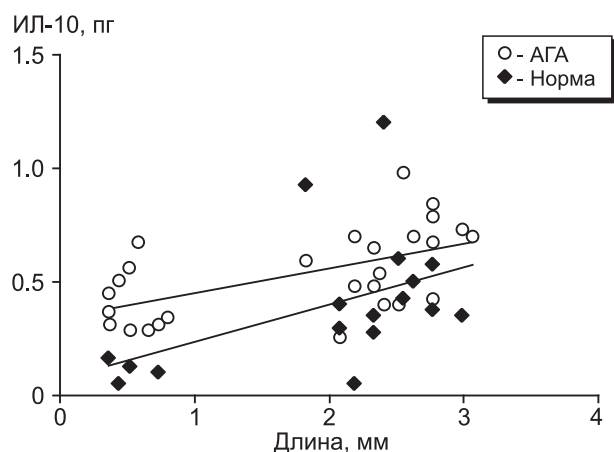
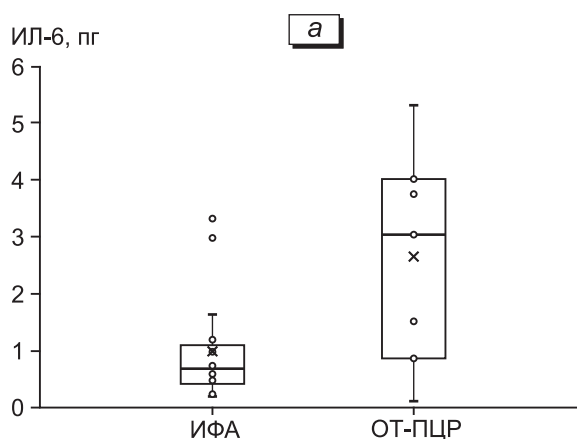


Рис. 2. Зависимость между содержанием ИЛ-10 в эпилированных ВФ и их длиной в норме и при АГА. Коэффициенты корреляции 0.47 (норма) и 0.52 (АГА) при $p < 0.05$.



Были получены близкие по значениям величины, т.е. регуляция синтеза ИЛ-6 и ИЛ-10 с большой вероятностью происходит на стадии транскрипции (а не трансляции).

По-видимому, в результате эпиляции и воздействия воздуха на оболочки ВФ происходит повреждение клеточных мембран наружного корневого влагалища (НКВ), отслоение которого в ходе экстракции было показано нами ранее [2], что подтверждается данными об активности ЛДГ в экстрактах. В отличие от внутреннего корневого влагалища, клетки НКВ не кератинизируются и сохраняют митохондриальную активность [11], что обуславливает пропорциональность между содержанием АТФ в ВФ и их длиной. Аналогичная зависимость между длиной ВФ и содержанием в нём ИЛ-10 показывает, что этот цитокин продуцируется кератиноцитами по всей длине НКВ, что может объясняться его участием в обеспечении иммунной привилегированности фолликулов. С практической точки зрения эти результаты означают, что при сравнительном анализе содержания АТФ и ИЛ-10 в ВФ в медико-биологических исследованиях необходимо учитывать их длину. Так, ВФ при АГА (т.е. подвергающиеся действию андрогенов) длиной от 2 мм содержали больше АТФ, чем в норме (от 30 нг на ВФ). Среди ВФ длиной от 2 мм доля ВФ, содержащих более 0.6 пг ИЛ-10, составляла 15% в норме и 53% при АГА, а во фракции ВФ длиной до 1 мм эффект, связанный с действием андрогенов, становился достоверным. Повышение содержания АТФ под действием андрогенов может быть следствием ингибирования дигидротестостероном ферментативного превращения АТФ в цАМФ [6]. Рост внутриклеточной концентрации АТФ может приводить к

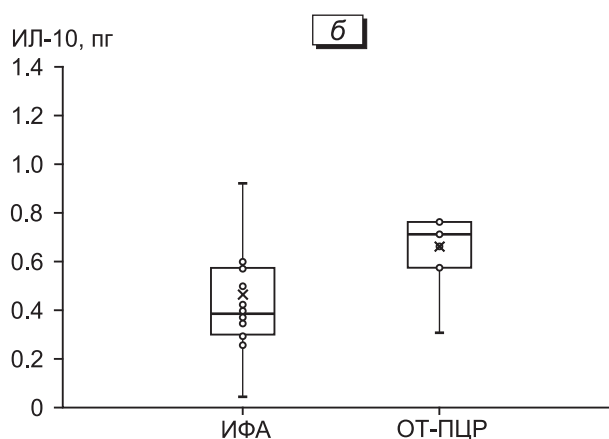


Рис. 3. Содержание ИЛ-6 (а) и ИЛ-10 (б) в эпилированных ВФ по данным ИФА и по данным оценки мРНК с помощью ОТ-ПЦР. Поперечные линии — медианы, крестики — средние значения.

повышению его внеклеточной концентрации, в том числе за счёт пассивной диффузии. Через стимуляцию пуринергических рецепторов по паракринным и аутокринным механизмам может происходить запуск провоспалительной реакции клеток, и увеличение синтеза ИЛ-10 может рассматриваться как компенсаторный противовоспалительный ответ.

Содержание ИЛ-6 не зависело от их длины ни в норме, ни при АГА. Можно было ожидать повышение содержания ИЛ-6 у пациентов за счёт стимуляции пуринергических рецепторов [12], но мы не обнаружили отличий от нормы даже на уровне тенденции. Эффекторные функции ИЛ-6 связывают с непосредственной регуляцией пролиферации клеток [10], и выяснение механизмов контроля экспрессии ИЛ-6 в ВФ требует дальнейших исследований.

Таким образом, проведённое исследование показало, что оболочки эпилированных ВФ в норме и при воздействии андрогенов содержали ИЛ-6 и ИЛ-10, как и АТФ. Содержание АТФ и ИЛ-10, но не ИЛ-6, зависело от длины ВФ и от патогенетических факторов. При анализе этих показателей необходимо учитывать размеры (длину) ВФ, поскольку усреднение показателей в выборке ВФ без предварительной морфометрии может дать большую погрешность, в том числе при сравнении здоровых добровольцев и пациентов с алопецией.

Работа выполнена при поддержке РНФ в рамках научного проекта № 17-75-30064.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаджигороева А.Г. Клиническая трихология. Москва, 2014.
2. Михальчик Е.В., Сунрун М.В., Федоркова М.В., Ибрагимова Г.А., Дмитриева Е.И., Лунатова В.А., Куцев С.И. Оценка содержания аденозинтрифосфата в луковицах волос кожи головы человека // Бюл. экспер. биол. 2014. Т. 157, № 1. С. 125-128.
3. Ahmed A.A., Nordlind K., Schultzberg M., Brakenhoff J., Bristulf J., Novick D., Svenson S.B., Azizi M., Lidén S. Immunohistochemical studies of proinflammatory cytokines and their receptors in hair follicles of normal human skin // Acta Derm. Venerol. 1996. Vol. 76, N 5. P. 348-352.
4. Barr T.P., Albrecht P.J., Hou Q., Mongin A.A., Strichartz G.R., Rice F.L. Air-stimulated ATP release from keratinocytes occurs through connexin hemichannels // PLoS One. 2013. Vol. 8, N 2. ID e56744. doi: 10.1371/journal.pone.0056744
5. Burrell H.E., Wlodarski B., Foster B.J., Buckley K.A., Sharpe G.R., Quayle J.M., Simpson A.W., Gallagher J.A. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, N 33. P. 29 667-29 676.
6. Gazzani G., Roncoroni S., Corsi M., Falchi M., Ferrero M.E. Increased cAMP levels in human hair follicles due to local treatment with trichoriboside // Int. J. Tissue React. 1994. Vol. 16, N 2. P. 73-77.
7. Grandjean-Laquerriere A., Le Naour R., Gangloff S.C., Guenounou M. Differential regulation of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in UVB-irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway // Cytokine. 2003. Vol. 23, N 4-5. P. 138-149.
8. Inoue K., Hosoi J., Denda M. Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2007. Vol. 127, N 2. P. 362-371.
9. Kabashima K., Honda T., Ginhoux F., Egawa G. The immunological anatomy of the skin // Nat. Rev. Immunol. 2019. Vol. 19, N 1. P. 19-30.
10. Kwack M.H., Ahn J.S., Kim M.K., Kim J.C., Sung Y.K. Dihydrotestosterone-inducible IL-6 inhibits elongation of human hair shafts by suppressing matrix cell proliferation and promotes regression of hair follicles in mice // J. Invest. Dermatol. 2012. Vol. 132, N 1. P. 43-49.
11. Niderla-Bielinska J., Jankowska-Steifer E., Moskalewski S. Keratinization of outer root sheath cells is prevented by contact with inner root sheath of rat hair follicles // Arch. Dermatol. Res. 2009. Vol. 301, N 5. P. 337-345.
12. Pastore S., Mascia F., Gulinelli S., Forchap S., Dattilo C., Adinolfi E., Girolomoni G., Di Virgilio F., Ferrari D. Stimulation of purinergic receptors modulates chemokine expression in human keratinocytes // J. Invest. Dermatol. 2007. Vol. 127, N 3. P. 660-667.
13. Paus R., Christoph T., Müller-Röver S. Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita // J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 1999. Vol. 4, N 3. P. 226-234.
14. Swerdloff R.S., Dudley R.E., Page S.T., Wang C., Sallameh W.A. Dihydrotestosterone: biochemistry, physiology, and clinical implications of elevated blood levels // Endocr. Rev. 2017. Vol. 38, N 3. P. 220-254.

Получено 16.06.20