

УДК 591.477.32:599.323.4

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ САЛЬНЫХ (МЕЙБОМИЕВЫХ) ЖЕЛЕЗ ВЕКА КРЫСЫ С ИНТЕГРИРОВАННЫМ ГЕНОМ ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

¹Кинжибулатова Р.Ж., ²Дыбан П.А.¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: kinro501@mail.ru;²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

У самцов крыс с интегрированным геном гормона роста человека обнаружена патология сальных (мейбомиевых) желез века. В таких железах происходит увеличение расширенных выводных протоков, выстланных многослойным плоским ороговевающим эпителием. Во-вторых, железистая часть желез представлена ацинусами: 1) интактными ($96,5 \pm 9,1\%$) – пролиферирующие и дифференцирующиеся себоциты на разных стадиях жирового перерождения; 2) не содержащие ($1,5 \pm 0,5\%$) дифференцированные себоциты. Количество митотически делящихся клеток достоверно превышает число пролиферирующих клеток интактных ацинусов ($27,8 \pm 2,6\%$ и $11,1 \pm 2,0\%$ соответственно, $p < 0,05$); 3) промежуточная группа ($2,0\% \pm 1,0\%$), которая наряду с клетками базального слоя в своем составе имеет незначительное число клеток дифференцирующихся себоцитов. Полученные нами результаты о трех группах ацинусов (и их клеточном составе) в мейбомиевой железе трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста обсуждаются с учетом литературных данных о стволовых герминативных клетках себоцитов, мультипатентных клетках и метаплазии.

Ключевые слова: трансгенные крысы, ген гормона роста человека, патология сальных (мейбомиевых) желез, себоциты, митотически делящиеся клетки

THE MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE SEBACEOUS (MEIBOMIAN) GLANDS OF EYELID RATS WITH INTEGRATED OF HUMAN GROWTH HORMONE GENE

¹Kinzhibulatova R.Zh., ²Dyban P.A.¹St. Petersburg State Pediatric Medical University MH RF, St. Petersburg, e-mail: kinro501@mail.ru;²Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

The male rats with the integrated genome of human growth hormone discovered the pathology of the sebaceous (meibomian) eyelid glands. In these glands there is an increase in dilated excretory ducts lined with stratified squamous keratinizing epithelium. Second, the glandular portion of the acini of the glands are represented by: 1) intact ($96,5 \pm 9,1\%$) –proliferating and differentiated sebocyte in various stages of fatty degeneration; 2) not containing ($1,5 \pm 0,5\%$) differentiated sebocyte. The number of mitotically dividing cells significantly exceeds the number of proliferated basal cells in intact acini ($27,8 \pm 2,6\%$ and $11,1 \pm 2,0\%$, $p < 0,05$); 3) intermediate group ($2,0\% \pm 1,0\%$), with cells of the basal layer and a few cells differentiated. Our results on three groups of acini (and of their cellular composition) in meibomian gland of transgenic rats with the integrated genome of human growth hormone are discussed taking into account literature data on germ stem cells sebocytes, multipotent cells and metaplasia.

Keywords: transgenic rats, a gene for human growth hormone, pathology of the sebaceous (meibomian) glands, sebocyte, mitotically dividing cells

Первые лабораторные млекопитающие (мыши) с интегрированным геном гормона роста человека были получены в 1982 году в лаборатории Пальмитера [1], что явилось стартовым толчком для многочисленных исследований в разных странах мира. В нашей стране были не только воспроизведены эти исследования, но и впервые в мире были получены трансгенные крысы с интегрированным геном гормона роста человека [2]. За прошедшие годы на этой модели были получены фундаментальные данные не только об особенностях механизмов раннего развития, имеющие принципиальное значение для теоретической биологии, но и созданы подходы для практического применения трансгенных животных для получения тех или иных биопродуктов.

Основная часть этих работ выполнена с использованием молекулярно-генетических методов и лишь в единичных работах производился гистологический анализ органов у трансгенных животных. Необходимо отметить, что изучение сальных желез в экспериментах по морфологическому исследованию трансгенных животных представляет значительный интерес в связи с тем, что сальные железы являются тканями-мишенями к определенным гормонам. При этом уровень секреции себоцитами сальных желез может колебаться в значительных пределах.

Сальные железы – железы секретирующие по голокриновому типу, представлены двумя группами: связанные и не связанные с волосом. Не связанные с волосом (сво-

бодные) железы крыс располагаются в наружном слуховом проходе (цимбаловская), в тарзальной пластинке века (мейбомиева), около сосков и т.д. Мейбомиева железа века представлена выводным протоком и концевыми отделами – железистой частью, состоящей из ацинусов, клетки которых (себоциты) выделяют секрет, защищающий глазное яблоко от повреждения.

Таким образом, **целью нашего исследования** являлось изучение морфологического строения сальной железы (мейбомиевой) века, не связанной с волосом, у трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста человека с обращением особого внимания на пролиферативные процессы базальных клеток ацинарной части органа.

Материалы и методы исследования

Работа была выполнена на сальных (мейбомиевых) железах 4 трансгенных и 10 интактных половозрелых самцов линии «Вистар. Трансгенные крысы были получены в Отделе эмбриологии ИЭМ посредством микроинъекции плазмиды с геном гормона роста человека и промоторов МТ-1 и ТАТ в мужской пронуклеус зиготы крысы¹. Животные были умерщвлены в 16 часов в марте. Биологический материал (верхние веки крыс) фиксировали в жидкости Буэна. На серийных гистологических срезах толщиной 7 мкм, ориентированных перпендикулярно продольной оси верхнего века, окрашенных гематоксилином, азаном по Гендентайну, железным гематоксилином по Ясвоину, определяли число ацинусов, количество находящихся в них себоцитов на разных стадиях дифференцировки и количество митотически делящихся клеток базального слоя. Подсчет количества митозов производили на 3000 клеток. Статистическую обработку полученных результатов производили по Фишеру – Стьюденту.

Результаты исследования и их обсуждение

Ацинарная часть сальных (мейбомиевых) желез века интактных крыс представлена многочисленными ацинусами, впадающими в выводной проток и содержащими себоциты, находящимися на различных этапах жизненного цикла. Базальные клетки ацинуса, прилегающие к базальной мембране, образуют периферический слой эпителиоцитов ацинарной части мейбомиевой железы. Подавляющее большинство этих клеток вытянуто параллельно базальной мембране, цитоплазма их интенсивно базофильна. Ядра небольших размеров, темные вытянутой формы. Пролиферативные процессы наблюдаются именно в этом слое клеток. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что количество митотически делящихся клеток составляет $11,0 \pm 2,0\%$. Себоциты, располагающиеся выше базального слоя, не пролиферируют, а в процессе дифференцировки значительно

увеличиваются в размерах, достигая максимальных параметров в месте соединения альвеолы с выводным протоком. В процессе жирового метаморфоза себоциты подвергаются гибели.

Анализ гистологических препаратов показал, что у трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста человека четко выражены патологические изменения сальных (мейбомиевых) желез века. Обращает на себя внимание в первую очередь большое количество кист, выстланных многослойным плоским ороговевающим эпителием. Анализ серийных препаратов показал, что такие кистообразно расположенные полости как сообщаются друг с другом, так и могут соединяться с наружной средой, т.е. являются частями своеобразно измененных расширенных выводных протоков. Необходимо отметить, что точно такие же морфологические изменения происходят и при патологических процессах в сальных железах: как и при возникновении акне [3], так и термическом поражении участков мейбомиевых желез крыс [4].

Анализ гистологических препаратов показал, что сальные (мейбомиевые) железы трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста человека представлены не одним как у интактных животных, а тремя типами ацинусов: 1) соответствующие интактным ацинусы ($96,5 \pm 9,1\%$) – один слой базальных клеток, дифференцирующиеся себоциты на разных стадиях жирового перерождения; 2) не содержащие ($1,5 \pm 0,5\%$) определяемые данными методами исследования морфологически идентифицируемые дифференцированные себоциты; 3) промежуточная группа ($2,0\% \pm 1,0\%$), которая наряду с клетками базального слоя в своем составе имеет несколько клеток дифференцирующихся в себоциты. Анализ основной группы ацинусов показал наличие себоцитов, находящихся в различных стадиях дифференцировки, а также на последовательных этапах жировой гибели. Подсчет количества митотически делящихся клеток базального слоя не выявил изменения пролиферативной активности по сравнению с базальными малодифференцированными себоцитами ацинусов мейбомиевых желез интактных крыс ($МК = 14,4 \pm 2,0\%$ и $11,1 \pm 2,0\%$ соответственно).

Наибольший интерес представляют собой выявленные нами ацинусы мейбомиевой железы, в которых нет видимых дифференцирующихся себоцитов, ацинусы выстланные реактивно измененными базальными клетками. Базальный слой таких ацинусов представлен 1–3 слоями уплощенных клеток. В таких ацинусах по сравне-

нию с контролем статистически достоверно возрастает количество митотически делящихся клеток ($27,8 \pm 2,6\%$ и $11,1 \pm 2,0\%$ соответственно, $p < 0,05$). Анализ препаратов окрашенных по Ясвоину свидетельствует о появляющейся многослойности исследуемых структур. Аналогичные процессы наблюдаются и в реактивно измененных базальных клетках при термическом повреждении мейбомиевой железы, где в дальнейшем в ацинусах происходит формирование многослойного плоского, а в ряде случаев и многослойного плоского ороговевающего эпителия [4].

Необходимо отметить, что морфологическая перестройка саленных желез, в том числе и пролиферативная активность себоцитов и влияние гормонов на эти процессы, довольно подробно описаны у человека и лабораторных млекопитающих не только в различные периоды постнатального развития, но и при патологических процессах [3, 5–8]. Так, при определенных гормональных нарушениях происходит гиперпродукция себоцитами секрета, изменяется состав секрета, возможно и присоединение инфекции, наблюдается гиперкератоз эпителия выводных протоков с интенсивным отслаиванием чешуек. Все это может привести к нарушению функционирования саленных желез вплоть до закупорки протока и за счет увеличившейся его полости, частично происходит и увеличение самой железы и формированию акне [3]. Морфологическая перестройка саленных желез и их функционирование при гормональной патологии является не только моделью для изучения механизмов гомеостаза данных органов, но, к сожалению, и причиной возникновения заболеваний у дерматологических больных.

Сравнительный анализ морфологического строения мейбомиевых желез у трансгенных животных с интегрированным геном гормона роста затруднен в связи с незначительным количеством литературных сведений. Так гормон роста в условиях *in vitro* усиливает секрецию себоцитов при сохраненном числе синтезирующих ДНК клеток, а также увеличения их количества при действии инсулиноподобного фактора роста. Себоциты мейбомиевых желез трансгенных мышей с геном гормона роста быка в условиях *in vivo* также увеличивают свою секрецию. В этой единственной работе по изучению строения мейбомиевой железы трансгенной мыши с избытком гормона роста быка приведены сведения об особенностях строения железы, в частности увеличении размера органа, в отличие от мышей с нокаутом GHR (-/-). В последнем случае наблюдается уменьшение раз-

меров мейбомиевой железы, гиперкератоз выводных протоков, ацинусов и замедленная дифференцировка себоцитов [9]. Обнаруженный нами факт наличия в саленной (мейбомиевой) железе века трансгенной крысы гетерогенной популяции ацинусов: 1) интактных ($96,5 \pm 9,1\%$); 2) содержащих только 1–3 слоя уплощенных «базальных» ($1,5 \pm 0,5\%$) со статистически достоверным увеличением количества митотически делящихся клеток; 3) промежуточных ($2,0\% \pm 1,0\%$), т.е. содержащих не только базальные клетки, но и частично дифференцирующиеся, в настоящее время не может быть однозначно интерпретирован. Не исключено, что данные о гетерогенных ацинусах свидетельствуют о том, что в их составе есть две популяции себоцитов с разной чувствительностью к гормону роста человека. Для ответа на данный вопрос необходимо проведение дальнейших исследований.

Интерпретация собственных и литературных данных о выявленном нами стереотипном ответе саленных желез на различного рода воздействия, в частности, невозможна без привлечения сведений о становлении специализированных саленных клеток как в филогенезе, так и эмбриогенезе, а также с учетом представлений об иерархическом статусе стволовых клеток.

Известно, что саленные железы, отсутствуя у рыб, амфибий и рептилий, впервые появляются у позвоночных – у птиц в виде парной копчиковой железы. Таким образом, специализированные клетки саленных желез в филогенетическом ряду появляются гораздо позже, чем многослойный плоский эпителий.

Сроки становления саленных (мейбомиевых) желез века в онтогенезе были подробно описаны как для человека [3, 6–8], так и лабораторных животных (крыс [10] и мышей [11]). Установлено, что у человека закладка мейбомиевых желез наблюдается на четвертом месяце эмбрионального развития в виде выпячивания базального слоя эпителия – спаивающей эпителиальной пластинки века. К 14 неделе эмбриональная железа представлена тяжом, в котором возникают многочисленные боковые выпячивания – будущие секреторные альвеолы [3, 6, 7]. Становление саленных (мейбомиевых) желез века постадийно описано и у крысы [10]. Было показано, что у 2-суточных крысят обнаруживается начало формирования мейбомиевой железы. Проявляется это в том, что из боковой стенки сомкнутых век вглубь века растут тяжи клеток, которые через 6 суток дают выросты-аналоги альвеолярных частей мейбомиевой железы. У 8-суточных крысят появляются и первые себоциты.

К 12–14 суткам происходит окончательное формирование железы с ее основными компонентами: альвеолами, содержащими себоциты, и открытым выводным протоком. О степени дифференцировки себоцитов, свидетельствуют как количество пролиферирующих клеток к 17 дню соответствующего контрольному уровню, так и в какой-то мере интенсивность окраски себоцитов у 17-суточных крысят, не отличающееся по окраске и размерам клеток от взрослых животных [10]. У 8-дневных мышат мейбомиева железа разделена на протоковую и ацинарную части [11]. Необходимо отметить, что вне зависимости от пре- (человек) – или постнатального (крыса) развития сальных (мейбомиевых) желез века, их аналоги – тяжи начинают расти из более ранней сформированной структуры – многослойного плоского эпителия. Таким образом, по нашему мнению, при сильных воздействиях на сальные железы происходит гибель дифференцированных себоцитов, происходит дедифференцировка клеток, а базальные клетки являются источником возникновения метапластических участков – многослойного плоского эпителия (филогенетически более раннего), из которого в свое время, т.е. в пре- или раннем постнатальном онтогенезе и дифференцировались себоциты.

Хорошо известно, что непрямая, истинная, пролиферативная или регенераторная метаплазия – нарушение тканевой дифференцировки, осуществляемая в результате митотического деления клеток исходной ткани с последующей дифференцировкой в другом направлении [12]. Явления метаплазии должны рассматриваться в свете принципа тканевой детерминации с точки зрения гистогенетической классификации тканей. Так, в свое время была сформулирована точка зрения о том, что при повреждении переходного эпителия мочевого пузыря, который является разновидностью тканевой эпидермального типа и находится на пути становления в новый тканевой тип, происходит образование участков многослойного плоского ороговевающего эпителия. Явления непрямой метаплазии также наблюдаются и при возникновении участков многослойного плоского (ороговевающего или неороговевающего) эпителия при повреждении многорядного мерцательного эпителия трахеи. При экспериментальных исследованиях бронхов, слюнных желез, тимусе, предстательной железы также формируется многослойный плоский эпителий. При дефиците витамина А наблюдается кератинизация слюнных желез, эпителия выстилающего носовую полость и т.д. Наблюдаемые

превращения происходят в пределах тканевых типов одной группы, в данном случае в пределах эпидермального (анизодермального) типа [12]. Аналогичные процессы могут происходить и с эпителием ацинусов сальных желез. В данном случае эпителиоциты ацинусов принимают участие в формировании многослойного эпителия.

Процессы, наблюдаемые при тех или иных нарушениях гомеостаза сальных желез, также могут быть объяснены с учетом современных данных о стволовых клетках – источниках возникновения эпидермоцитов и себоцитов [7, 13–15]. По мнению большинства авторов статей, в эпидермисе дефинитивной кожи находятся три независимые популяции стволовых клеток: 1) мультипотентные (hair-bulb), 2) коммитированные в направлении дифференцировки себоцитов, 3) коммитированные в направлении дифференцировки кератиноцитов интерфолликулярного эпителия [7, 13–15]. Количество же работ о стволовых клетках себоцитов сальных желез не связанных с волосом, в частности, мейбомиевых, весьма и весьма ограничено [15]. По мнению этих авторов, в базальном слое ацинусов мейбомиевых желез находятся лишь прогениторные ТА клетки с быстрым временем обновления и которые способны в дальнейшем проходить все стадии дифференцировки по липидному типу, но не являющиеся медленно обновляющимися. В качестве кандидата стволовой клетки (мультипотентной) были предложены объекты, находящиеся вне самого ацинуса – в его выводном протоке, – медленно обновляющиеся клетки, в составе которых находятся зерна кератогиалина [15]. Процесс же регенерации сальных желез в плане участия тех или иных линий стволовых клеток к настоящему времени остается до конца не выясненным. Согласно некоторым предположениям мультипотентные клетки, смещаясь из протока в ацинарную часть железы, могут быть в дальнейшем источником линии себоцитов. Иными словами, по мнению ряда исследователей, восстановление коммитированной линии себоцитов, вероятно, происходит из мультипотентных стволовых клеток, находящихся вне ацинарной части мейбомиевой железы. Это сходно с процессами, наблюдаемыми при гибели себоцитов в железах, связанных с волосом – новая генерация клеток может образовываться из мультипотентных клеток, находящейся в утолщенной зоне волосяного фолликула, и коммитирующихся в прогениторную линию себоцитов [7, 13, 14].

Заключение

При тех или иных воздействиях на саллярные железы не связанные с волосом (влияние гормонов, термические воздействия), происходят стереотипные патологические изменения выводной части мейбомиевой железы, выражающиеся в гиперкератозе выводных протоков, утолщении стенок, увеличении полости и таким образом псевдоувеличением органа, не всегда обусловленным гиперсекрецией. Нами получены данные о том, что у трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста человека выявлены три группы ацинусов: 1) интактные; 2) содержащие 1–3 слоя уплотненных клеток ($1,5 \pm 0,5\%$) при отсутствии дифференцирующихся себоцитов; 3) промежуточные ($2,0\% \pm 1,0\%$), где наряду с клетками базального слоя обнаруживается и незначительное количество дифференцирующиеся себоцитов. Полученные нами результаты о трех группах ацинусов (и их клеточном составе) в мейбомиевой железе трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста обсуждаются с учетом литературных данных о стволовых герминативных клетках себоцитов, мультипатентных клетках и метаплазии.

Авторы приносят искреннюю благодарность С.И. Городецкому, Б.Л. Вайсману, Г.Ф. Голинскому, Т.В. Игнатевой, проф. А.П. Дыбану.

Список литературы

1. Palmiter R., Brinster R., Hammer R., Trumbauer M., Rosenfeld M., Brinberg M., Evans R. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes // *Nature*. – 1982. – V.300. – P. 611–615.
2. Дыбан А.П., Городецкий С.И. Интродукция в геном млекопитающих чужеродных генов. Пути и перспективы. Молекулярные и клеточные основы биотехнологии / ред. С.Г. Инге-Вечтомов. – Ленинград: Наука, 1986. – С. 82–97.
3. Zouboulis C., Picardo M., Ju J., Kurokawa I., Torocsik D., Bóro T., Schneider M.. Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2016. – Vol. 17. – P. 319–334.
4. Кинжибулатова Р.Ж. Материалы к изучению физиологической и репаративной регенерации саллярных желез: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ленинград, 1975. – 22 с.
5. Butovich I.A. Meibomian glands, Meibum and meibogenesis // *Exp. Eye Res.* – 2017. – Vol. 217. – P.2–16.
6. Lipids and Skin Health/ Ed. A.Pappas – New York: Springer Science +Business Media, 2015 – 359 p.
7. Niemann C., Horsley V. Development and homeostasis of the sebaceous gland // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2012. – V. 23, 8. – P. 928–936.
8. Knop E., Knop N., Millar Th., Obata H., Sullivan D.A. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy, Physiology and Pathophysiology of the Meibomian Gland // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2011. – Vol.52. – P.1938–1978.
9. Liu Y., Knop E., Knop N., Sullivan D.A., List E., Korchik J.J., Kam W.R., Ding J. Growth Hormone Influence on the Morphology and Size of the Mouse Meibomian Gland // *Journal of Ophthalmology*. – 2016. – Volume 2016 Article. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5728071>.
10. Дыбан П.А., Кинжибулатова Р.Ж. Становление саллярных (мейбомиевых) желез крыс в раннем постнатальном онтогенезе // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2014. – № 12–1. – С. 71–73.
11. Nien Ch.Y., Massei S., Lin G., Liu H., Paugh J.R., Chia-Yang Liu, Kao W.Wh.-Y., Brown D.J., and Jester J. V. The development of meibomian glands in mice // *Mol. Vis.* – 2010. – V 16. – P. 1132–1140.
12. Михайлов В.П. Классификация тканей и явления метаплазии в свете принципа тканевой детерминации // *Архив анатомии, гистологии, эмбриологии*. – 1972. – Т. 62, № 6. – С.12–33.
13. Zouboulis Ch., Adjaye J., Akamatsu H., Behrens G., Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process // *Exp.Gerontology*. – 2008. – Vol.43. – P.986–997.
14. Blanpain E., Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin // *Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.* – 2009. – V.10 № 3. – P. 207–217.
15. Parfitt G., Xie Y., Geyfman M., Brown D.J., Yester J.V. Absence of ductal hyper-keratinization in Mouse age-related meibomian gland dysfunction (ARMGD) // *Impact Journal of Aging*. – 2013. – V.5, № 11. – P.825–834.