

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МИЛИАЦИНА НА ЦИКЛ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АЛОПЕЦИИ

Башмалух Н.В., Николаева Т.В., Полякова В.С., Николаев А.Д., Ермолаева А.А.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России», Оренбург, e-mail: office@orgma.ru

Цель исследования – провести сравнительный анализ влияния на цикл волосяного фолликула при местном применении состава с милиацином и 2%-ного лосьона миноксидила в экспериментальной модели андрогенетической алопеции. Эксперимент длился 28 дней и включал тридцать самцов мышей линии C57BL/6. Животные были разделены на контрольную и четыре опытные группы по шесть мышей в каждой. Для индукции анагена у всех групп мышей была проведена депиляция волос на коже спины. Мышиную модель андрогенетической алопеции создавали у всех опытных групп, ежедневно нанося на область депиляции 1%-ный гель тестостерона. Во второй опытной группе на кожу области депиляции наносили 2%-ный раствор миноксидила, в третьей группе – состав с милиацином, растворенным в полиоксиэтилированном (20) сорбитаноолеате с концентрацией 30 мг/мл, а в четвертой группе использовали полиоксиэтилированный (20) сорбитаноолеат в качестве плацебо. Образцы депилированной кожи фиксировали в забуференном нейтральном формалине и исследовали с помощью световой микроскопии, морфометрии и статистического анализа. Определяли стадии цикла, рассчитывали удельный вес волосяных фолликулов в каждой фазе цикла, а также индекс цикла волосяных фолликулов. Топическое применение состава с милиацином увеличивает продолжительность фазы анагена. Об этом свидетельствуют индекс цикла волосяных фолликулов животных, получавших милиацин, – переход волосяных фолликулов из стадии среднего анагена в стадию позднего анагена, и, таким образом, продление стадии анагена, в отличие от волосяных фолликулов кожи мышей других групп.

Ключевые слова: волосяной фолликул, мыши C57BL/6, милиацин, миноксидил, андрогенетическая алопеция, цикл волосяного фолликула, эксперимент.

EVALUATION OF THE EFFECT OF MILIACIN ON THE HAIR FOLLICLE CYCLE IN C57BL/6 MICE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ANDROGENETIC ALOPECIA

Bashmalukh N.V., Nikolaeva T.V., Polyakova V.S., Nikolaev A.D., Ermolaeva A.A.

FGBU BO «Orenburg State Medical University of the Russian Ministry of Health», Orenburg, e-mail: office@orgma.ru

The aim of the study was to conduct a comparative analysis of the effects on the hair follicle cycle of a composition containing miliacin and a 2% minoxidil lotion when applied topically in an experimental model of androgenetic alopecia. The experiment lasted 28 days and involved thirty male C57BL/6 mice. The animals were divided into a control group and four experimental groups, each containing six mice. To induce the anagen phase, the hair shafts on the dorsal skin of mice in all groups were depilated. The mouse model of androgenetic alopecia was established in all experimental groups by daily application of 1% testosterone gel to the depilated area. The mice in the second experimental group were treated with a 2% minoxidil solution, while the third group received a composition containing miliacin dissolved in polyoxyethylated (20) sorbitanooleate at a concentration of 30 mg/mL. The fourth group was treated with polyoxyethylated (20) sorbitanooleate as a placebo. The depilated skin samples were fixed in buffered neutral formalin and examined using light microscopy, morphometry, and statistical methods. The stages of the hair follicle cycle were determined, and the proportion of hair follicles in each phase and the hair follicle cycle index were calculated. Topical application of the composition with miliacin increases the duration of the anagen phase. This is evidenced by the cycle index of hair follicles of animals treated with miliacin - transition of hair follicles from the middle anagen stage to the late anagen stage, and thus, prolongation of the anagen stage, in contrast to hair follicles of skin of mice of other groups.

Keywords: hair follicle, C57BL/6 mice, miliacin, minoxidil, androgenetic alopecia, hair follicle cycle, experiment.

Введение

Среди заболеваний, связанных с выпадением и поредением волос, андрогенетическая алопеция (АГА) является одним из распространенных, вызывает не только психологический

стресс, но и социальную дезадаптацию пациентов. Возможности лечения АГА остаются ограниченными, в связи с чем актуальным является поиск эффективных и безопасных лекарственных средств [1]. При разработке новых препаратов для лечения андрогенетической алопеции следует учитывать их влияние на основные нарушения цикла волосяных фолликулов (ВФ). Основными признаками таких нарушений при АГА являются сокращение продолжительности фазы анагена и наличие фазы кеногена, характеризующейся задержкой перехода телогеновых ВФ в новую стадию роста [2]. Пентациклические тритерпеноиды проявляют разнообразную биологическую и фармакологическую активность [3]. В число пентациклических тритерпеноидов входит милиацин (МЛ), имеющий в своей химической формуле 3- β -метокси- Δ 18-олеанен; он выделяется из шелухи проса. В ходе ряда экспериментов были подтверждены его мембранопротекторная, антиоксидантная, антимуtagenная и антиапоптогическая активность, способность регулировать экспрессию генов, которые отвечают за редокс-баланс клеток, а также способность повышать терапевтическое действие противоопухолевых препаратов, таких как метотрексат. Кроме того, было обнаружено, что это вещество обладает низкой токсичностью [4]. Исследования на культуре кератиноцитов также выявили, что экстракт проса значительно повышает пролиферативную и метаболическую активность человеческих кератиноцитов, что предполагает возможность стимуляции роста волосяных фолликулов [5].

Цель исследования – провести сравнительный анализ влияния на цикл ВФ состава с МЛ и 2%-ного лосьона миноксидила (МН) при их топическом применении в экспериментальной модели андрогенетической алопеции.

Материалы и методы исследования. Предметом исследования явилась инбредная линия мышей C57BL/6. Для проведения эксперимента животные были случайным образом разделены на пять групп по шесть мышей в каждой. С целью индукции синхронного анагена под эфирным наркозом мышам всех групп была проведена депиляция стержней волос. Депиляцию проводили в межлопаточной области, паравертебрально, начиная от линии, соединяющей основания лопаток животных, с использованием коммерческих восковых полосок. За нулевой день эксперимента был принят день индукции анагена. Мыши группы контроля были интактны, так как воспроизведение АГА не проводилось. Для моделирования АГА животным опытных групп ежедневно в течение 28 дней на область депиляции наносили 1%-ный гель тестостерона (ТС) в дозировке 5 мг/кг, что обеспечивало постоянную концентрацию ТС на протяжении суток после одного нанесения [6]. Для оценки воздействия МЛ на цикл ВФ в модели АГА был подготовлен состав [7], состоящий из двух компонентов: основы из полиоксиэтилированного (20) сорбитаноолеата, которая способствовала проникновению действующего вещества – милиацина. Кристаллический МЛ был получен

стандартным методом [8]. В первую опытную группу были отнесены животные, которые получали 1%-ный гель ТС 5 мг/кг топически (экспериментальная модель андрогенетической алопеции). Мышам из второй, третьей и четвертой экспериментальных групп через час после нанесения на кожу депилированной области 1%-ного геля ТС наносили следующие составы: во второй группе (положительный контроль) – лосьон с 2%-ным МН, в третьей группе – смесь, содержащую МЛ в концентрации 30 мг/мл и основу на основе полиоксиэтилированного (20) сорбитаноолеата, а в четвертой группе – только полиоксиэтилированный (20) сорбитаноолеат (плацебо). На 28-й день после индукции анагена животных подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков под эфирным наркозом. Исследование было проведено в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, установленными Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях, а также Федеральным законом от 27 декабря 2018 года № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» (ред. от 27.12.2019). Исследуемым материалом явились образцы кожи животных всех групп, взятых из области депиляции. Образцы кожи помещали в 10%-ный нейтральный формалин с буфером и фиксировали при комнатной температуре в течение 24 часов. Выполняли стандартную гистологическую обработку материала и заливали его в парафиновые блоки. Полученные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином, после чего проводили морфологическое исследование препаратов под световым микроскопом. Стадии цикла ВФ определяли по критериям, описанным S. Müller-Röver и соавторами [9]. Волосяные фолликулы в стадии анагена I и II относили к раннему анагену, IIIa, IIIb и IIIc – к среднему анагену, IV, V и VI – к позднему анагену. В стадии катагена I, II и III определяли как ранний катаген, IV и V – как средний катаген, а VI, VII и VIII – как поздний катаген [10]. В каждой исследуемой группе рассчитывали удельный вес ВФ в каждой фазе их цикла и индекс цикла ВФ, как представлено в работе M. Maurer и соавторов [11]. При этом использовалась следующая шкала: стадия раннего анагена = 1, стадия среднего анагена = 2, стадия позднего анагена = 3, стадия катагена = 4, стадия телогена = 5.

Статистический анализ данных проводили с использованием таблиц Excel и программы Statistica 10.0. Количественные данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$), 95%-ные доверительные интервалы рассчитаны методом Уилсона. Для сравнения показателей нескольких независимых групп применяли критерий Краскела–Уоллиса, а для попарных сравнений использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. На 28-й день после индукции анагена в коже мышей контрольной (рис. 1) и первой опытной (рис. 2) группы (экспериментальная модель АГА) все ВФ находились в стадии телогена. Индекс цикла ВФ в этих группах составил $5,0 \pm 0,0$ балла (рис. 3).

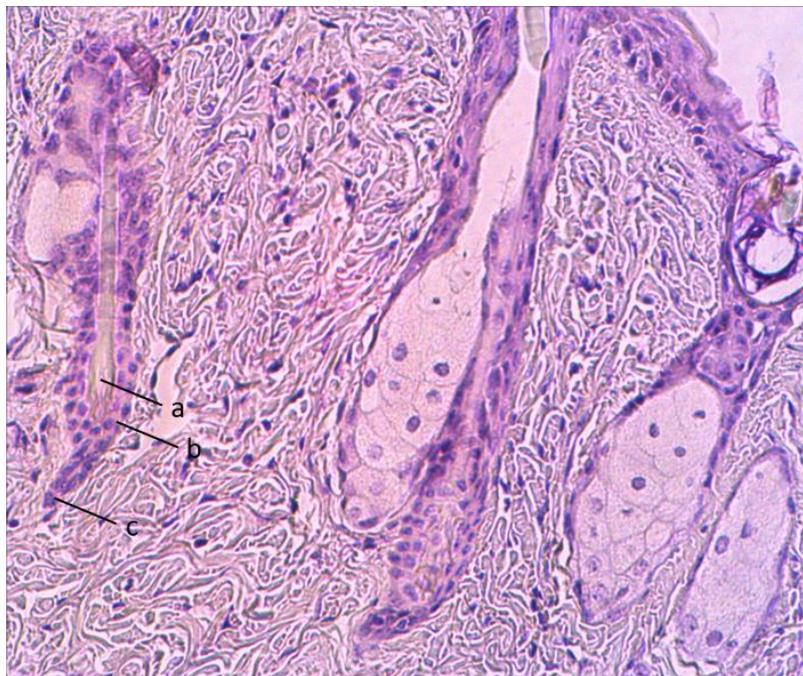
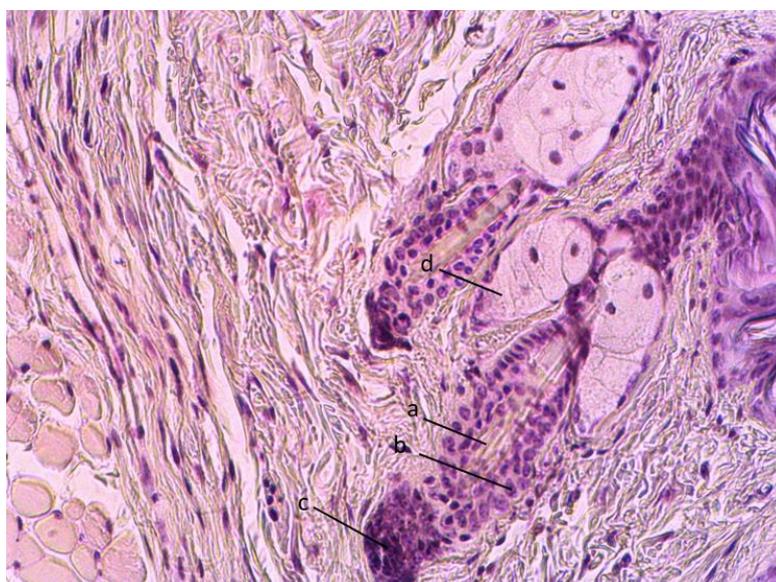


Рис. 1. Фрагмент кожи спины мыши из контрольной группы на 28-й день после индукции анагена. Волосной фолликул находится в стадии телогена (a – проксимальный конец волоса в виде «щеточки», b – капсула вторичного зародыша волоса, c – компактный дермальный сосочек). Окраска выполнена гематоксилином Майера и эозином, увеличение $\times 300$



*Рис. 2. Фрагмент
мышцы из первой*

кожи спины

экспериментальной группы на 28-й день после индукции анагена. Волосные фолликулы находятся в стадии телогена (*a* – стержень волоса, *b* – капсула вторичного зародыша волоса, *c* – дермальный сосочек, *d* – сальная железа). Окраска выполнена гематоксилином Майера и эозином, увеличение $\times 300$

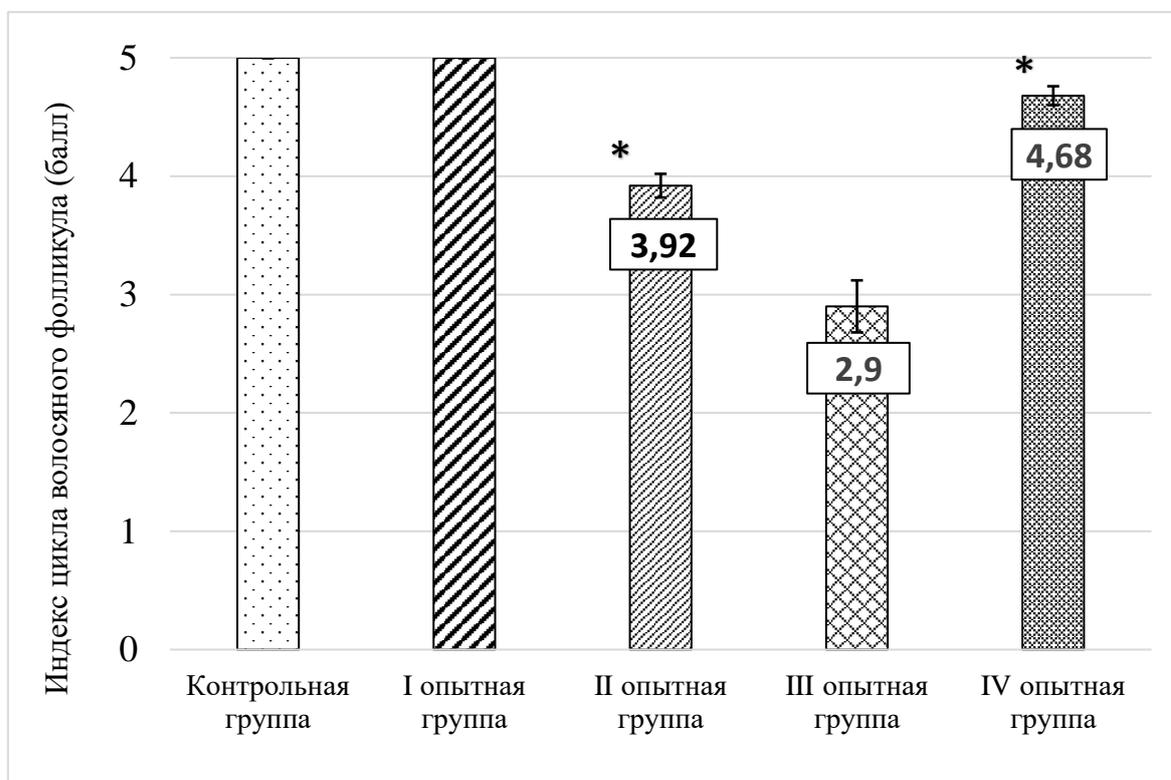


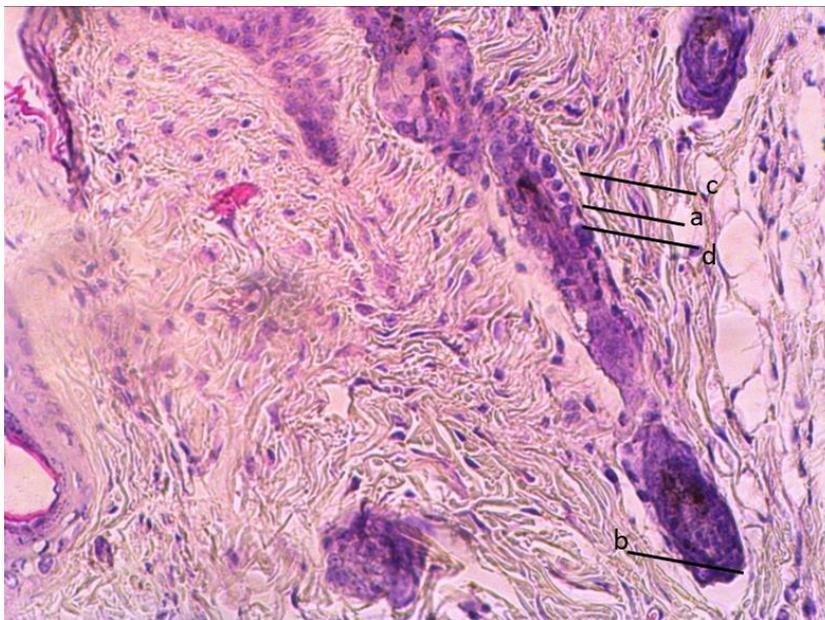
Рис. 3. Индексы цикла волосяных фолликулов в коже мышей группы контроля и опытных групп

Примечания. Планки погрешностей отражают стандартную ошибку среднего;

* – попарные различия с индексом цикла ВФ третьей опытной группы с аналогичными показателями второй и третьей опытных групп на уровне $p < 0,001$

В коже мышей из второй экспериментальной группы, получавших 2%-ный лосьон МН (группа положительного контроля), $62,64 \pm 3,37\%$ ВФ находились в стадии телогена, а $37,36 \pm 3,37\%$ – в стадии анагена. При детальном рассмотрении ВФ в стадии анагена выяснилось, что в коже этой группы мышей преимущественно были ВФ в стадии среднего анагена, составлявшие $66,22 \pm 10,3\%$. В стадиях раннего и позднего анагена находились $10,8 \pm 3,6\%$ и $22,9 \pm 9,05\%$ ВФ соответственно. Соотношение ВФ в стадиях анагена и телогена составило $0,61 \pm 0,09$. Индекс цикла ВФ у животных данной группы составил $3,92 \pm 0,1$ балла (95% ДИ 3,63–4,22).

В коже мышей третьей опытной группы (рис. 3), получавших топически состав с МЛ, наблюдалось следующее распределение ВФ в соответствии с их морфологическими признаками: $21,72 \pm 2,57\%$ ВФ было в стадии телогена; $77,26 \pm 2,39\%$ ВФ находились в стадии анагена; $1,24 \pm 0,42\%$ ВФ – в стадии катагена.



*Рис. 3. Фрагмент кожи спины мыши из третьей экспериментальной группы на 28-й день после депиляции. Волосной фолликул находится в стадии среднего анагена (анаген IIIc), где *a* – внутреннее корневое влагалище, *b* – дермальный сосочек, *c* – наружное корневое влагалище, *d* – формирующийся стержень волоса. Окраска выполнена гематоксилином Майера и эозином, увеличение $\times 300$*

Отношение волосяных фолликулов в стадии анагена к волосяным фолликулам в стадии телогена составило $3,8 \pm 0,52$. Среди всей численности ВФ в стадии анагена $26,13 \pm 6,24\%$ показывали морфологические признаки раннего анагена, $20,45 \pm 1,95\%$ – среднего анагена и $53,42 \pm 6,47\%$ – позднего анагена. Индекс цикла ВФ в коже мышей данной группы был равен $2,9 \pm 0,04$ балла (95% ДИ 2,4–3,01).

В коже мышей из четвертой экспериментальной группы, получавших полиоксиэтилированный (20) сорбитанолеат (плацебо), волосяные фолликулы в стадии телогена составили $92,08 \pm 0,69\%$. Удельный вес волосяных фолликулов в стадии раннего анагена составил $7,92 \pm 0,69\%$. Отношение волосяных фолликулов в стадии анагена к волосяным фолликулам в стадии телогена было равно $0,09 \pm 0,01$. Индекс цикла ВФ у животных четвертой опытной группы составил $4,68 \pm 0,02$ балла (95% ДИ 4,6–4,8).

Согласно литературным данным, в коже мышей линии C57BL/6 на 28-е сутки после индукции анагена ВФ синхронизированы в стадии телогена [9]. Полученные в настоящем

исследовании результаты подтверждают эти данные: морфологические признаки ВФ кожи мышей группы контроля соответствовали стадии телогена.

В коже животных, получавших 1%-ный гель ТС (экспериментальная модель АГА), также все ВФ находились в стадии телогена. В коже животных из четвертой экспериментальной группы, получавших плацебо, результаты были аналогичны первой экспериментальной группе: $92,08 \pm 0,69\%$ ВФ находились в стадии телогена. Индекс цикла ВФ в этой группе, равный $4,68 \pm 0,02$ балла, указывает на катаген-телогеновую трансформацию. Однако в коже мышей, получавших плацебо, также присутствовали ВФ в стадии раннего анагена – $7,92 \pm 0,69\%$.

Результаты предыдущих клинико-морфологических исследований показывают, что при андрогенетической алопеции изменяется соотношение волосяных фолликулов на стадиях анагена и телогена, что сопровождается сокращением продолжительности стадии анагена [12]. Топическое применение препаратов МН может модифицировать патоморфологические изменения, свойственные АГА, продлевая стадию анагена или сокращая продолжительность стадии телогена [13]. Косвенным доказательством этого служат данные о том, что местное применение 3%-ного МН у пациентов с АГА увеличивало количество ВФ в стадии анагена и уменьшало количество ВФ в стадии телогена [14]. Вместе с тем, на примере экспериментальной крысиной модели было показано, что применение 3%-ного и 5%-ного раствора МН не приводило к продлению стадии анагена, но сокращало продолжительность стадии телогена, т.е. способствовало ранней трансформации ВФ из стадии телогена в стадию анагена [13]. Данные, полученные в настоящем исследовании, показали, что в коже животных, получавших 2%-ный лосьон МН, более трети ВФ соответствовали стадии анагена. Тем не менее, выявлено преобладание ВФ в стадии телогена, удельный вес которых был в 1,6 раза больше, чем ВФ в стадии анагена.

Напротив, в коже животных, получавших состав с МЛ, было установлено преобладание ВФ в стадии анагена, количество которых было в 3,6 раза больше, чем в ВФ в стадии телогена. Эти данные позволили предположить, что состав с МЛ может способствовать телоген-анагеновой трансформации, приводя к увеличению количества ВФ в стадии анагена.

Также установлено, что применение 2%-ного лосьона миноксидила и состава с милиацином оказывает различное влияние на соотношение волосяных фолликулов на разных стадиях анагена. В коже животных, получавших 2%-ный лосьон миноксидила, соотношение удельного веса волосяных фолликулов на стадиях раннего, среднего и позднего анагена было 1:6,1:2,1 соответственно, при этом преобладали волосяные фолликулы в стадии среднего анагена. В коже мышей, получавших состав с МЛ, указанное соотношение составляло 1,3:1:2,6

соответственно, с преобладанием ВФ в позднем анагене. Выявленные отличия могут объясняться разными механизмами действия используемых в эксперименте соединений.

Расчет индекса цикла ВФ позволяет определять среднюю стадию цикла ВФ и проводить сравнительную оценку результатов фармакологически индуцированных отклонений в динамике цикла ВФ между экспериментальными группами [9]. Максимальное значение индекса ВФ, равное 5,0, которое соответствовало стадии телогена ВФ, наблюдалось в коже мышей контрольной группы и первой опытной группы.

Согласно данным данного исследования, топические препараты оказывают различное влияние на цикл волосяных фолликулов в экспериментальных группах. У мышей, получавших 2%-ный лосьон МН, индекс цикла ВФ составил $3,92 \pm 0,1$ балла, что указывает на анаген-катагеновую трансформацию волосяных фолликулов и завершение стадии анагена в коже животных второй экспериментальной группы. При этом индекс цикла ВФ кожи мышей третьей опытной группы составил $2,9 \pm 0,04$ балла, что указывало на переход ВФ из стадии среднего анагена в стадию позднего анагена и продление стадии анагена. Различия между указанными экспериментальными группами по индексу цикла ВФ были статистически значимыми ($p < 0,01$). Полученные данные позволяют предположить, что топическое применение состава с МЛ может продлевать стадию анагена, модифицируя нарушенный цикл ВФ в модели андрогенетической алопеции.

Вывод. Таким образом, проведенный сравнительный анализ влияния на цикл ВФ состава с МЛ и 2%-ного лосьона МН при их топическом применении в экспериментальной модели АГА выявил, что оба топических препарата способствуют телоген-анагеновой трансформации волосяных фолликулов. Установлено, что использование МЛ приводит к увеличению удельного веса волосяных фолликулов в стадии анагена, повышению соотношения волосяных фолликулов на стадии анагена к волосяным фолликулам на стадии телогена и удлинению продолжительности стадии анагена.

Список литературы

1. Katzer T., Leite Junior A., Beck R., da Silva C. Physiopathology and current treatments of androgenetic alopecia: Going beyond androgens and anti-androgens // *Dermatologic Therapy*. 2019. Vol. 32. Is. 5. DOI: 10.1111/dth.13059.
2. Ramos P.M., Miot H.A. Female Pattern Hair Loss: a clinical and pathophysiological review // *An Bras Dermatol*. 2015. Vol. 90. Is. 4. P. 529-543. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20153370.

3. Cheng Z., Li Y., Zhu X., Wang K., Ali Y., Shu W., Zhang T., Zhu L., Murray M., Zhou F. The Potential Application of Pentacyclic Triterpenoids in the Prevention and Treatment of Retinal Diseases // *Planta Med.* 2021. Vol. 87. DOI: 10.1055/a-1377-2596.
4. Сарычева Ю.А., Токарева А.А., Панфилова Т.В., Железнова А.Д., Штиль А.А., Красиков С.И., Фролов Б.А. Антимутагенное средство // Патент РФ № 2698204. Патентообладатель ФГБОУВО «ОрГМУ» МЗ РФ. 2019. Бюл. № 24.
5. Boudon S., Kurka P., Gnacke C., Zhang L., Meza S.M. Method and use of a composition for improving hair appearance // Patent EP № 3453381. Current Assignee Bayer Consumer Care AG 4052 Basel (CH). 2017. Bulletin № 11.
6. Винаров А.З. Влияние терапии тестостероном (1 % трансдермальный гель) на качество жизни мужчин с андрогенодефицитом в условиях рутинной клинической практики: 6-месячное наблюдательное исследование // *Андрология и генитальная хирургия.* 2016. Т. 17. № 4. С. 59-67.
7. Николаева Т.В., Полякова В.С., Гусева О.В., Шарাপова Н.В., Башмалух Н.В., Ким В.И., Николаев А.Д. Способ комплексной коррекции нерубцовых алопеций в эксперименте // Патент РФ № 2821779. Патентообладатель ФГБОУВО «ОрГМУ» МЗ РФ. 2023. Бюл. № 18.
8. Павлова М.М. Изучение влияния биологически активного стероида проса (3-β-метокси-Δ¹⁸-олеанена) при токсическом поражении печени четыреххлористым углеродом в эксперименте: автореф. дис. ... канд.биол.наук. Оренбург, 1984. 20 с.
9. Müller-Röver S., Handjiski B., van der Veen C., Eichmüller S., Foitzik K., McKay I.A., Stenn K.S., Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages // *J. Invest. Dermatol.* 2001. Vol. 117. Is. 1. P. 3-15.
10. Oh. H.S., Smart R.C. An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. Vol. 93. Is. 22. DOI: 10.1073 /pnas.93.22.12525.
11. Maurer M., Peters E.M., Botchkarev V.A., Paus R. Intact hair follicle innervation is not essential for anagen induction and development // *Arch Dermatol Res.* 1998. Vol. 290. P. 574-578. DOI: 10.1007/s004030050354.
12. Oiwoh S.O., Enitan A.O., Adegbosin O.T., Akinboro A.O., Onayemi E.O. Androgenetic Alopecia: A Review // *Nigerian Postgraduate Medical Journal.* 2024. Vol. 31. Is. 2. P. 85-92. DOI: 10.4103/npmj.npmj_47_24.
13. Gupta A.K., Talukder M., Venkataraman M., Bamimore M.A. Minoxidil: a comprehensive review // *Journal of Dermatological Treatment.* 2022. Vol. 33. Is. 4. P. 1896–1906. DOI: 10.1080/09546634.2021.1945527.

14. Navarro M., Asin M., Martinez M.A., Martinez A.M. Management of androgenetic alopecia: a comparative clinical study between plasma rich in growth factors and topical minoxidil // Eur. J. Plast Surg. 2016. Vol. 39. Is. 3. P. 173-180. DOI: 10.1007/s00238-015-1175-1.