

УДК 636.084

## РОЛЬ ОВЕРЭКСПРЕССИИ НОГГИНА В КЕРАТИНОЦИТАХ НАРУЖНОГО КОРНЕВОГО ВЛАГАЛИЩА В ОБРАЗОВАНИИ ОПУХОЛЕЙ ВОЛОСЯНОГО ФолликуЛА

А.Н. Мардарьев<sup>1)</sup>, Н.В. Мардарьева<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Брэдфордский университет

BD7 1DP, Ричмод Роад, Брэдфорд, Великобритания

<sup>2)</sup>Чувашская государственная сельскохозяйственная академия  
428003, Чебоксары, Российская Федерация

**Аннотация.** Изучение нарушений эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, влияющих на развитие ряда патологических процессов, таких как нарушение процесса заживления ран, канцерогенез и клеточное старение является одним из приоритетных направлений биомедицинских исследований. В данной работе была исследована туморсупрессивная роль BMP (bone morphogenetic proteins, костные морфогенетические протеины) сигнала в наружном корневом влагалище волосяного фолликула и описаны молекулярные изменения, обусловленная канцерогенезом кожи. Для этого была использована трансгенная линия мышей K14-Noggin, оверэкспрессирующая внеклеточный BMP антагонист ноггин под контролем промотора кератина 14 в кератиноцитах наружного корневого влагалища волосяного фолликула. Значительное увеличение синтеза мРНК и белка ноггина подтверждает оверэкспрессию ноггина у данных трансгенных мышей. В то же время снижение экспрессии активных форм pSmad1/5/8 в эпидермисе и волосяных фолликулах K14-Noggin свидетельствует об ингибировании передачи внеклеточного BMP сигнала внутрь клетки при оверэкспрессии ноггина. Таким образом, фенотип K14-Noggin мышей обусловлен, по крайней мере, ингибированием канонического BMP-Smad сигнального пути. У K14-Noggin мышей активность K14 промотора также приводит к атопической экспрессии трансгенного ноггина в базальном слое эпидермиса, что проявляется в виде значительных гиперпластических изменений в межфолликулярном эпидермисе. В основе гиперпластических изменений эпидермиса лежит повышение пролиферативной активности эпидермальных кератиноцитов базального слоя, о чем свидетельствует двукратное увеличение количества Ki67-экспрессирующих клеток в эпидермисе трансгенных мышей по сравнению с контрольной группой. В супрабазальных слоях эпидермиса трансгенных мышей также были выявлены пролиферирующие Ki67-позитивные клетки, которых не было у животных контрольной группы.

**Ключевые слова:** волосяные фолликулы, трансгенная линия мышей K14-Noggin, оверэкспрессия ноггина.

**Введение.** В коже BMP сигнал подавляет пролиферацию и способствует дифференцировке кератиноцитов [16]. Трансгенная оверэкспрессия BMP4 и BMP6 в эпидермисе мышей повышает резистентность к формированию опухолей в процессе химического канцерогенеза [11], [25]. Кроме того, в химически индуцированных опухолях кожи обнаружено снижение белков Smad1 и Smad5, внутриклеточных эффекторов BMP сигнальной системы [24]. Вышесказанное утверждение позволяет предположить, что туморсупрессивная функция BMP сигнального пути играет большую роль при формировании опухолей в эпидермисе кожи. Однако молекулярные механизмы, опосредующие туморсупрессивную роль BMP сигнала, остаются плохо изученными.

BMP сигнальный путь вовлечен в регуляцию большого количества биологических функций, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, определение клеточной судьбы и апоптоз в различных типах клеток и тканях в ходе эмбрионального и постнатального развития [12].

Волосяные фолликулы представляют собой уникальный миниорган, реагирующий на быстро сменяющиеся фазы активного роста, регрессии и покоя в течение всей жизни организма, что требует точно скоординированной многоуровневой регуляции [21], [22]. BMP сигнал в комплексе с другими сигнальными молекулами играет важную роль в этом процессе, регулируя такие клеточные события, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз [20].

Целью данного исследования является изучение влияния активности BMP сигнала на увеличение пролиферативного потенциала кератиноцитов наружного корневого влагалища волосяного фолликула мышей.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на мышах линии C57BL/6 по протоколам, утвержденным Университетом Брэдфорда и Чувашской государственной сельскохозяйственной академией. Мыши содержались в условиях 12-часового дневного цикла при температуре воздуха 21±1°C и влажности – 40-60 %. C57BL/6 мыши были приобретены у компании Charles River (Великобритания).

Мыши были анестезированы внутрибрюшинной инъекцией смеси кетамин/ксилазин в дозе 100 мг/10 мг на кг веса. Раны (5 мм в диаметре) были нанесены 8-недельным самкам мышей на кожу спины пункционной биопсийной иглой. Образцы кожи были собраны на 0, 1, 3 и 5 дни после ранения и заморожены в жидком азоте для последующего хранения в холодильнике при температуре - 80° С.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Гистологическое исследование кожи новорожденных мышей не выявило отличий у TG и контрольной групп животных. Как у контрольных, так и TG мышей волосяные фолликулы синхронно достигли стадии позднего анагена; плотность волосяных фолликулов, а также

их пространственное взаиморасположение достоверно не отличались в обеих группах (рисунок 1А, 1В). Однако начиная с третьей недели (P14) постнатальной жизни у TG животных визуально появлялись первые признаки потери волос на коже спины. При этом у TG животных было выявлено заметное увеличение волосяных фолликулов с выраженным утолщением клеточных слоев НКВ и увеличением их количества по сравнению с контрольной группой (рисунок 1С, 1D). Более того, начиная уже с 14 дня у некоторых волосяных фолликулов были обнаружены эпителиальные выросты, растущие из НКВ и располагающиеся обычно ниже уровня сальных желез (Рисунок 1D, стрелка).

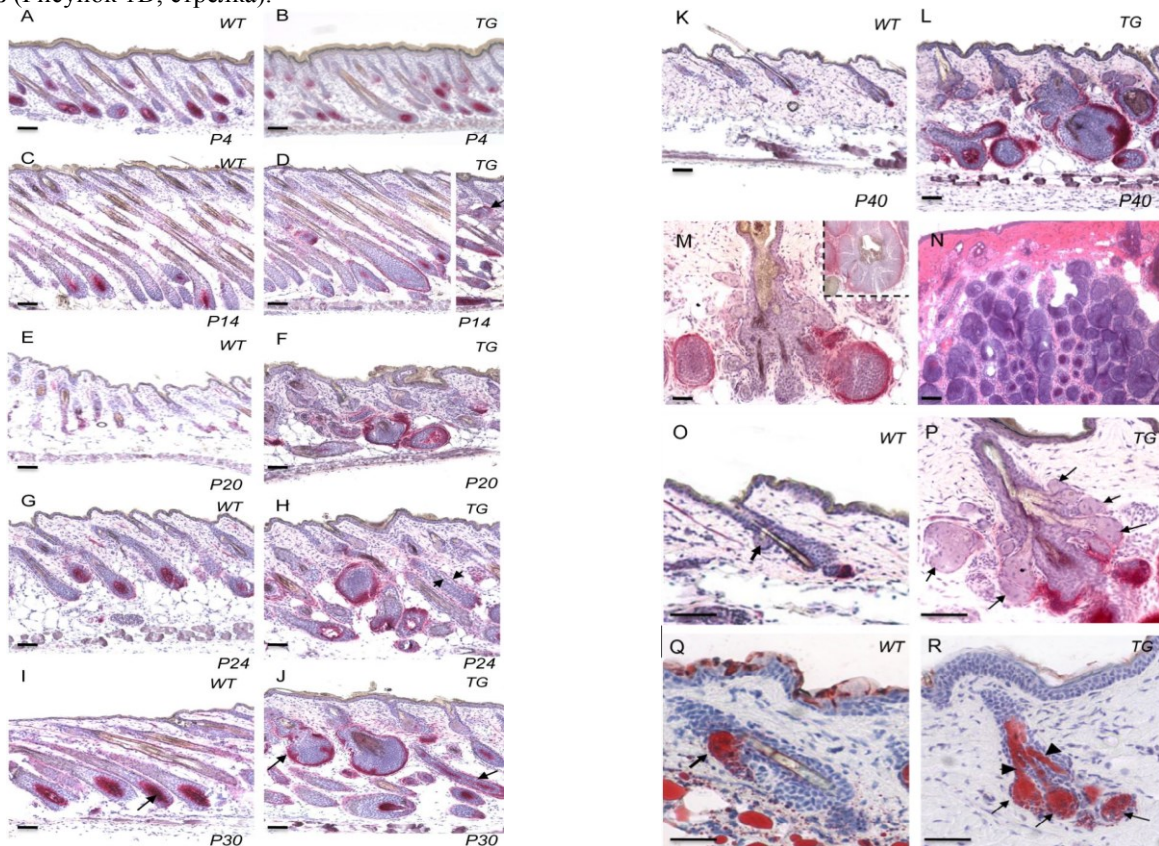


Рис. 1. Образование опухолей волосяного фолликула у K14-Noggin мышей

(Гистологические срезы кожи контрольных и TG мышей, окрашенных на щелочную фосфатазу (А-М) гематоксиленом-эозином (N) и Oil Red-O (Q-R)). У контрольных (WT) мышей волос циклирует: анаген (А, G, I), катаген (С), телоген (К). У TG мышей волосяные фолликулы находятся в продолжительной стадии анагена (В, D, F, H, L), проводящей к формированию трихфолликулома-подобной опухоли (M, N). (O-P) гиперплазия сальных желез у TG мышей (Q-R). Накопление липидов в увеличенных сальных железах у TG мышей (стрелки указывают на дольки, наконечники указывают на протоки). Шкала – 50 мкм.)

Исследование срезов кожи спины в разные сроки постнатальной жизни выявило, что волосяные фолликулы животных контрольной группы на 16-18 дни после рождения перешли, как и ожидалось, а фазу первого физиологического катагена, представляющего собой процесс регрессии фолликулов (рисунок 1Е). Напротив, в указанные сроки у TG животных волосяной фолликул продолжал находиться в фазе анагена: проксимальный конец волосяных фолликулов залегал глубоко в подкожной клетчатке, имел луковичную форму, окружая со всех сторон дермальный сосочек (рисунок 1F). Позднее у контрольных животных четко прослеживались циклические изменения в волосяных фолликулах: на 24 день они переходили в стадию среднего анагена и выглядели удлиненными, растущими в толщу дермы (рисунок 1G). К 30-му дню после рождения волосяные фолликулы контрольных мышей достигали максимальной длины (поздний анаген) (рисунок 1I) с последующим развитием к 40 дню стадии катагена и телогена (стадии покоя) (рисунок 1K).

В отличие от животных контрольной группы, у TG мышей не было выявлено подобных циклических изменений: наоборот, было замечено прогрессивное увеличение размеров волосяных фолликулов с потерей нормальной структуры и формы, сопровождающееся нарушением стержня волоса (рисунок 1H, 1J, 2L).

Кроме того, во время первого постнатального цикла волос (P23-P40) были выявлены эпителиальные выросты (опухолевые плакнды), растущие из НКВ волосяных фолликулов TG мышей и впоследствии формирующие большие опухолеподобные структуры (рисунок 1J и 2L).

Интересно, что в соединительной ткани волосяного фолликула и в дермальных клетках, прилегающих к вновь образованным эпителиальным опухолевым плакндам, была обнаружена повышенная активность

щелочной фосфатазы (AP) (рисунок 1J, стрелки). В коже контрольных мышей активность щелочной фосфатазы была выявлена исключительно в фибробластах дермальных сосочков (Рисунок 1I, стрелка), что указывает на выраженное ремоделирование мезенхимальных компонентов волосяного фолликула в ответ на эпителиальное оверэкспрессирование *Noggin* у TG мышей.

К 3-6 месяцам постнатального развития фолликулоподобные структуры приобретали значительные размеры и становились видимыми на дорзальной и вентральной поверхностях. При гистологическом исследовании были выявлены дезориентированные, гиперпластические и плотно упакованные структуры с фолликулярной дифференцировкой. Впоследствии часть измененных волосяных фолликулов постепенно трансформировалась в кистозные структуры, содержавшие кератинизированный материал (рисунок 1M, 1N). Эти опухоли, содержащие гиперпластические матричные клетки и рудиментарные волосяные стержни, были окружены мезенхимальными клетками с сильной щелочной фосфатазной активностью и морфологически напоминали трихфолликулому человека. Нами был изучен ферментный статус различных продуктивных животных [5],[6],[7], [8], [9].

Гистологические исследования кожи мышей в разные сроки постнатального развития позволили выявить также гиперплазию сальных желез. К 12 месяцам постнатального развития сальные железы TG мышей становились значительно крупнее, чем у особей контрольных групп, увеличивалось также количество железистых долек, группировавшихся вокруг удлинённых выводных протоков (рисунок 1O, 1P, стрелки). Применение красителя Oil-red, обладающего высокой липидофильностью, позволило выявить депонирование липидов в гиперпластических сальных железах, а также наличие множественных разветвленных и расширенных выводных протоков этих желез (рисунок 1Q and 1R, стрелки и наконечники).

Почти у всех *K14-Noggin* мышей к 3-6 месяцам постнатальной жизни развиваются видимые макроскопические опухоли кожи. Однако первые признаки опухолевого роста становятся заметными при морфологическом исследовании уже на третью неделю постнатальной жизни. С этого же момента визуально появляются первые признаки потери волос на дорзальной коже. При гистологическом исследовании кожи трансгенных мышей были выявлены заметно увеличенные волосяные фолликулы, которые теряли способность к циклированию и регрессии. По мере нарастания гиперпластических изменений происходила потеря нормальной структуры и формы волосяных фолликулов, приводя к формированию опухолей. Эти опухоли гистологически имели много общего с трихофолликулярными опухолями человека. Эти данные свидетельствуют о вовлечении BMP сигнального пути в развитии данного типа неоплазий в структуре кожи человека. Однако остается определить, связано ли развитие трихофолликуломы у человека с мутациями в генах, кодирующих компоненты BMP сигнального пути, или, подобно *K14-Noggin* мышам, развитие этих опухолей регулируется биохимическими изменениями на уровнях экспрессии и/или активности BMP антагонистов.

Отражением гиперпластического характера изменений в волосяных фолликулах трансгенных мышей являлось усиление клеточной пролиферации. Об этом свидетельствует увеличение количества BrdU-позитивных клеток, а также клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki67-антиген, как в наружном корневом влагалище волосяных фолликулов, так и в новообразующихся фолликулоподобных опухолях.

Параллельно с этим у *K14-Noggin* мышей наблюдается нарушение процесса регрессии волосяных фолликулов — это проявляется в нарушении циклических изменений и отсутствии фазы катагена. О подавлении апоптотических процессов в измененных волосяных фолликулах TG мышей также свидетельствует отсутствие TUNEL-позитивных клеток. На молекулярном уровне нарушение процессов пролиферации и апоптоза в опухолях *K14-Noggin* мышей проявляется в усилении экспрессии циклинов (*cyclin D2*, *cyclin F*, *cyclin M3*) и некоторых антиапоптотических молекул (*Bcl6*, *Faim2*, *Bag3*), а также в снижении экспрессии эффекторной каспазы 7.

**Выводы.** Результаты полученных исследований позволяют предположить, что в основе туморсупрессорной функции BMP белков также лежит их способность поддерживать состояние покоя стволовых клеток в волосяном фолликуле. В пульс-чейз эксперименте с введением IdU и CldU, использованных для одновременного обнаружения LRC и пролиферирующих клеток, балджстволовые клетки теряли IdU метку через две недели после начала эксперимента. В то же время количество пролиферирующих клеток, меченных CldU, значительно увеличено у трансгенных мышей по сравнению с контрольным вариантом. Эти данные свидетельствуют об активации стволовых клеток, которые потеряли способность находиться в состоянии покоя. Активированные стволовые клетки сохраняют способность экспрессировать маркеры стволовых клеток, таких как *Lhx2* и *Sox9*. Кроме того, *Lhx2*- и *Sox9*-положительные клетки присутствуют не только в балдж области, но также появляются за пределами ниши стволовых клеток. Интересно, что *Lhx2*- и *Sox9*-позитивные клетки также присутствуют в опухолевых плакодах, растущих из наружного корневого влагалища волосяного фолликула. Данное наблюдение указывает на причастность стволовых клеток волосяного фолликула и/или их потомков к опухолевой инициации. Таким образом, специфическое ингибирование BMP в кератиноцитах у *K14-Noggin* мышей приводит к активации стволовых/прогениторных клеток с последующей их пролиферацией и образованием опухоли. Эти результаты подтверждают предыдущие работы, показавшие участия BMP в регуляции активности стволовых клеток волосяного фолликула [18], [19].

Все эти данные согласуются с предыдущими наблюдениями, демонстрирующими, что BMP сигнальный

путь оперирует как сильный туморсупрессор в эпидермисе и волосяном фолликуле [10]. В данной работе показано, что противоопухолевое действие ВМР в коже сильно зависит от локальных концентраций ВМР ингибиторов, таких как ноггин, который существенно воздействует на туморсупрессорную функцию ВМР.

Аналогичные эффекты ноггина также описаны в кишечном эпителии: в нем гиперэкспрессия ноггина приводит к формированию эктопических крипт и развития фенотипа, напоминающего ювенильный полипоз [15]. Интересно, что другой ВМР-антагонист, гремлин, широко экспрессируется в большом количестве различных форм рака, включая базальноклеточную карциному. Также он способен стимулировать пролиферацию опухолевых клеток, ингибированных ВМР [11]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что ВМР-антагонисты могут значительно влиять на анти-опухолевый потенциал кожи, а также их экспрессия и активность, по-видимому, имеют решающее значение для приобретения кератиноцитами неопластической судьбы.

Интересно, что недавно была создана другая трансгенная линия мышей, гиперэкспрессирующих ноггин под контролем промотора K14 [14]. Эти мыши были получены с использованием ноггина курицы, в то время как трансгенные мыши, о которых говорится в данной работе, созданы путем гиперэкспрессии мышшиной кДНК ноггина. В обоих трансгенных линиях наблюдается некоторое сходство в кожном фенотипе, например, отсутствие волос типа зигзаг и гиперплазия когтей [23]. Однако у этих мышей не наблюдалось образование каких-либо опухолей. Возможно, уровни экспрессии трансгена и различия в активности мышшиного и куриного ноггина могут дифференцированно влиять на способность ВМР-лигандов связывать ВМР-рецепторы и на пролиферацию/дифференцировку кератиноцитов и их клеточную судьбу.

Эти результаты согласуются с *in vitro* данными, которые показали, что ВМР ингибирует клеточную пролиферацию и способствует дифференцировке клеток [13]. Однако данные по *in vivo*, полученные в работе, показывают, что процессы терминальной дифференцировки, по-видимому, не нарушены при ноггин-индуцированном ингибировании ВМР сигнала. Об этом свидетельствует тот факт, что экспрессия маркера терминальной дифференцировки лорикрина в кератиноцитах как у трансгенных, так и контрольных мышей практически не отличается.

Несмотря на заметное увеличение пролиферации кератиноцитов и эпидермальной гиперплазии, у *K14-Noggin* мышей не обнаружено никаких явных признаков неопластического процесса в интерфолликулярном эпидермисе в течение длительного срока наблюдения (1,5 года и более). В то же время в эпидермисе трансгенных мышей были выявлены участки с элементами дисплазии низкой и средней степени в непосредственной близости от волосяных фолликулов.

Известно, что избыточная, бесконтрольная активация клеточной пролиферации является характерной чертой опухолевых клеток, что может привести к развитию опухолей в межфолликулярном эпидермисе у *K14-Noggin* мышей. Ранее полученные данные свидетельствуют о том, что поликомбные белки необходимы для поддержания клеточной пролиферации и способности к самовосстановлению эпителия кожи [1], [2], [3], [4].

Таким образом, гиперэкспрессия ноггина в коже под контролем промотора кератина 14 приводит к ингибированию ВМР сигнала через ВМР-Smad путь у *K14-Noggin* мышей. Подавление ВМР сигнала в волосяных фолликулах приводит к развитию трихофолликулома-подобных опухолей и гиперплазии сальных желез.

### Литература

1. Мардарьев, А. Н. Выявление молекулярных механизмов вовлечения сигнального пути ВМР в развитии опухолей кожи / А. Н. Мардарьев, Н. В. Мардарьева // Научно-образовательные и прикладные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции: материалы Международной научно-практической конференции. – Чебоксары: типография Чувашского госуниверситета, 2018. – С. 313-320.
2. Мардарьев, А. Н. Контроль поликомбного белка Сbx7 в пролиферации кератиноцитов в мышшиной коже / А. Н. Мардарьев, Н. В. Мардарьева // Биологизация земледелия – основа воспроизводства плодородия почвы: материалы Международной научно-практической конференции. – Чебоксары: типография Чувашского госуниверситета, 2018. – С. 171-178.
3. Мардарьев, А. Н. Роль Сbx4 в заживлении кожных ран у мышей / А. Н. Мардарьев, Н. В. Мардарьева // Научно-образовательная среда как основа развития агропромышленного комплекса и социальной инфраструктуры села: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА. – Чебоксары: ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА, 2016. – С. 305-310.
4. Мардарьев, А. Н. Роль Сbx7 в регуляции миграции кератиноцитов при заживлении кожных ран у мышей / А. Н. Мардарьев, Н. В. Мардарьева, Г. А. Ларионов // Вестник Чувашской государственной сельскохозяйственной академии. Чебоксары. – 2017. – № 3 (3). – С.56-62.
5. Мардарьева, Н. В. Активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы у тканях мышц у разновозрастных крольчат / Н. В. Мардарьева, О. П. Нестерова, М.Г. Терентьева // Вестник Сумского национального аграрного университета. – 2016. – № 5. – С. 187-190.
6. Мардарьева, Н. В. Амилазная активность в тканях мышц у растущих крольчат / Н. В. Мардарьева, О. П. Нестерова, Т. В. Кузнецова // Продовольственная безопасность и устойчивое развитие АПК: материалы Международной научно-практической конференции. – Чебоксары: ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА, 2015. – С. 441-444.

7. Терентьева, М. Г. Активность аспартаминотрансферазы в тканях двенадцатиперстной кишки у крольчат в разные фазы постнатального онтогенеза / М. Г. Терентьева, Н. В. Мардарьева // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016. – № 2. – С. 75-78.
8. Терентьева, М. Г. Амилазная и фосфатазная активность в тканях слепой кишки у растущих чистопородных и помесных поросят / М. Г. Терентьева, Н. В. Мардарьева, Т. В. Кузнецова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2013. – № 3. – С. 53-59.
9. Терентьева, М. Г. Возрастные изменения активности  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в тканях мышц конечностей у крольчат / М. Г. Терентьева, Н. В. Мардарьева // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016. – № 2. – С. 83-86.
10. Blessing, M. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions / M. Blessing, P. Schirmacher, S. Kaiser // J Cell Biol. – 1996. – 135:227-39.
11. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumour cell proliferation / J. B. Sneddon [et al] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – 103:14842-7.
12. Botchkarev, V. A. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology / V. A. Botchkarev // J Invest Dermatol. – 2003. – 120:36-47.
13. Ca<sup>2+</sup> and BMP-6 signalling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation / S. J. D'Souza [et al] // J Biol Chem. – 2001. – 276:23531-8.
14. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration / M.V. Plikus [et al] // Nature. – 2008. – 451:340-4.
15. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine / A.P. Haramis [et al] // Science. 2004. – 303:1684-6.
16. Drosdoff, V. Expression and growth inhibitory effect of decapentaplegic Vg-related protein 6: evidence for a regulatory role in keratinocyte differentiation / V. Drosdoff, N. A. Wall, W. J. Pledger // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – 91:5528-32.
17. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development / T. Andl [et al] // Development. – 2004. – 131:2257-68.
18. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signalling / K. Kobiela [et al] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – 104:10063-68.
19. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells / V. Horsley [et al] // Cell. – 2008. – 132:299-310.
20. Noggin is a mesenchymally-derived stimulator of hair follicle induction / V. A. Botchkarev [et al]. – Nature Cell Biol. – 1999. – 1:158-64.
21. Paus, R. Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders // Curr Opin Dermatol. – 1996. – 3:248-58.
22. Paus, R. In search of the «hair cycle clock»: a guided tour / R. Paus, K. Foitzik // Differentiation. – 2004. – 72:489-511.
23. Polakis, P. The oncogenic activation of beta-catenin / P. Polakis // Curr Opin Genet Dev. – 1999. – 9:15-21.
24. Smads mediate signalling of the TGF $\beta$  superfamily in normal keratinocytes but are lost during skin chemical carcinogenesis / W. He [et al] // Oncogene. – 2001. – 20:471-83.
25. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in murine epidermis suppresses skin tumour formation by induction of apoptosis and downregulation of fos/jun family members / S. Wach // Oncogene. – 2001. – 20:7761-9.

#### *Сведения об авторах*

1. **Мардарьев Андрей Николаевич**, доктор биологии и медицины, Брэдфордский Университет; Брэдфорд, BD7 1DP, Великобритания; e-mail: a.mardaryev@bradford.ac.uk, тел.+44-1274237432;
2. **Мардарьева Наталья Валерьевна**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции, Чувашская государственная сельскохозяйственная академия; 428003, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, 29; e-mail: volga480@yandex.ru, тел. 8-927-841-12-21.

#### **THE ROLE OF NOGGIN OVEREXPRESSION IN THE KERATINOCYTES OF ROOT SHEATH IN THE FORMATION OF HAIR FOLLICLE TUMORS**

**A.N. Mardaryev<sup>1</sup>, N.V. Mardaryeva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>University of Bradford

Bradford, BD7 1DP, United Kingdom

<sup>2</sup>Chuvash State Agricultural Academy  
428003, Cheboksary, Russian Federation



**Abstract.** *The study of violations of epigenetic mechanisms of regulation of gene expression in the development of a number of pathological processes such as wound healing, carcinogenesis and cellular aging is one of the priorities of biomedical research. In this study, the tumor suppressive role of BMP (bone morphogenetic proteins) signal in the outer root sheath of the hair follicle was investigated and molecular changes associated with skin carcinogenesis were described. To do this, we used a transgenic line of mice, K14-Noggin, overexpressing extracellular BMP antagonist noggin under the control of the keratin 14 promoter in keratinocytes of the outer root sheath of the hair follicle. A significant increase in mRNA synthesis and noggin protein confirm overexpression of noggin in these transgenic mice. At the same time, the decrease in the expression of the active form of pSmad1/5/8 in the epidermis and hair follicles of K14-Noggin indicates the inhibition of the transmission of extracellular BMP signal into the cell by overexpression of noggin. Thus, the K14-Noggin phenotype of mice is due at least to inhibition of the canonical BMP-Smad signaling pathway. In K14-Noggin mice, the activity of the K14 promoter also leads to atopic expression of transgenic Noggin in the basal layer of the epidermis, which manifests itself as significant hyperplastic changes in the interfollicular epidermis. The basis of hyperplastic changes in the epidermis is the increase in proliferative activity of epidermal keratinocytes of the basal layer, as evidenced by a twofold increase in the number of Ki67-expressing cells in the epidermis of transgenic mice compared to the control group. In the suprabasal layers of the epidermis of transgenic mice, proliferating Ki67-positive cells were also found, which were not present in the control group of animals.*

**Key words:** *hair follicles, K14-Noggin transgenic line of mice, Noggin overexpression.*

### References

1. Mardar'ev, A. N. Vyyavlenie molekulyarnykh mekhanizmov vovlecheniya signal'nogo puti BMP v razvitiy opukholey kozhi / A. N. Mardar'ev, N. V. Mardar'eva // Nauchno-obrazovatel'nye i prikladnye aspekty proizvodstva i pererabotki sel'skokhozyaystvennoy produktsii: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. – CHEboksary: tipografiya CHuvashskogo gosuniversiteta, 2018. – S. 313-320.
2. Mardar'ev, A. N. Kontrol' polikombnogo belka Cbx7 v proliferatsii keratinotsitov v myshinoy kozhe / A. N. Mardar'ev, N. V. Mardar'eva // Biologizatsiya zemledeliya – osnova vosproizvodstva plodorodiya pochvy: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. – CHEboksary: tipografiya CHuvashskogo gosuniversiteta, 2018. – S. 171-178.
3. Mardar'ev, A. N. Rol' Cbkh4 v zazhivlenii kozhnykh ran u myshey / A. N. Mardar'ev, N. V. Mardar'eva // Nauchno-obrazovatel'naya sreda kak osnova razvitiya agropromyshlennogo kompleksa i sotsial'noy infrastruktury sela: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 85-letiyu FGBOU VO CHuvashskaya GSKHA. – CHEboksary: FGBOU VO CHuvashskaya GSKHA, 2016. – S. 305-310.
4. Mardar'ev, A. N. Rol' Cbx7 v regulyatsii migratsii keratinotsitov pri zazhivlenii kozhnykh ran u myshey / A. N. Mardar'ev, N. V. Mardar'eva, G. A. Larionov // Vestnik CHuvashskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. CHEboksary. – 2017. – № 3 (3). – S.56-62.
5. Mardar'eva, N. V. Aktivnost'  $\gamma$ -glutamyltransferazy u tkanyakh myshts u raznovozrastnykh krol'chat / N. V. Mardar'eva, O. P. Nesterova, M.G. Terent'eva // Vestnik Sumskogo natsional'nogo agrarnogo universiteta. – 2016. – № 5. – S. 187-190.
6. Mardar'eva, N. V. Amilaznaya aktivnost' v tkanyakh myshts u rastushchikh krol'chat / N. V. Mardar'eva, O. P. Nesterova, T. V. Kuznetsova // Prodoval'stvennaya bezopasnost' i ustoychivoe razvitie APK: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. – CHEboksary: FGBOU VO CHuvashskaya GSKHA, 2015. – S. 441-444.
7. Terent'eva, M. G. Aktivnost' aspartataminotransferazy v tkanyakh dvenadtsatiperstnoy kishki u krol'chat v raznye fazy postnatal'nogo ontogeneza / M. G. Terent'eva, N. V. Mardar'eva // Izvestiya Samarskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. – 2016. – № 2. – S. 75-78.
8. Terent'eva, M. G. Amilaznaya i fosfataznaya aktivnost' v tkanyakh slepoy kishki u rastushchikh chistoporodnykh i pomesnykh porosyat / M. G. Terent'eva, N. V. Mardar'eva, T. V. Kuznetsova // Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo. – 2013. – № 3. – S. 53-59.
9. Terent'eva, M. G. Vozrastnye izmeneniya aktivnosti  $\gamma$ -glutamyltransferazy v tkanyakh myshts konechnostey u krol'chat / M. G. Terent'eva, N. V. Mardar'eva // Izvestiya Samarskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii. – 2016. – № 2. – S. 83-86.
10. Blessing, M. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions / M. Blessing, P. Schirmacher, S. Kaiser // J Cell Biol. – 1996. – 135:227-39.
11. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumour cell proliferation / J. B. Sneddon [et al] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – 103:14842-7.
12. Botchkarev, V. A. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology / V. A. Botchkarev // J Invest Dermatol. – 2003. – 120:36-47.
13. Ca<sup>2+</sup> and BMP-6 signalling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation / S. J. D'Souza [et al] // J Biol Chem. – 2001. – 276:23531-8.
14. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration / M.V. Plikus [et al] // Nature. – 2008. – 451:340-4.

15. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine / A.P. Haramis [et al] // Science. 2004. – 303:1684-6.
16. Drosdoff, V. Expression and growth inhibitory effect of decapentaplegic Vg-related protein 6: evidence for a regulatory role in keratinocyte differentiation / V. Drosdoff, N. A. Wall, W. J. Pledger // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – 91:5528-32.
17. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development / T. Andl [et al] // Development. – 2004. – 131:2257-68.
18. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signalling / K. Kobiela [et al] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – 104:10063-68.
19. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells / V. Horsley [et al] // Cell. – 2008. – 132:299-310.
20. Noggin is a mesenchymally-derived stimulator of hair follicle induction / V. A. Botchkarev [et al]. – Nature Cell Biol. – 1999. – 1:158-64.
21. Paus, R. Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders // Curr Opin Dermatol. – 1996. – 3:248-58.
22. Paus, R. In search of the «hair cycle clock»: a guided tour / R. Paus, K. Foitzik // Differentiation. – 2004. – 72:489-511.
23. Polakis, P. The oncogenic activation of beta-catenin / P. Polakis // Curr Opin Genet Dev. – 1999. – 9:15-21.
24. Smads mediate signalling of the TGF $\beta$  superfamily in normal keratinocytes but are lost during skin chemical carcinogenesis / W. He [et al] // Oncogene. – 2001. – 20:471-83.
25. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in murine epidermis suppresses skin tumour formation by induction of apoptosis and downregulation of fos/jun family members / S. Wach // Oncogene. – 2001. – 20:7761-9.

#### **Information about authors**

1. **Mardaryev Andrei Nikolaevich**, PhD in Medical Biosciences, University of Bradford, Bradford, BD7 1 DP, UK, e-mail: a.mardaryev@bradford.ac.uk, tel. +44-1274234732.

2. **Mardaryeva Natalia Valerevna**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Department of Biotechnology and Processing of Agricultural Products, Chuvash State Agricultural Academy, 428003, Chuvash Republic, Cheboksary, 29, K. Marks str.; e-mail: volga480@yandex.ru, tel. 8-927-841-12-21.

УДК 636.084.413+636:612.1

#### **ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ БЫЧКОВ НА ФОНЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЖИРА В ИХ РАЦИОНАХ**

**О.Ю. Петров<sup>1)</sup>, В.Г. Семенов<sup>2)</sup>, Д.А. Никитин<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Марийский государственный университет  
424000, Йошкар-Ола, Российская Федерация

<sup>2)</sup>Чувашская государственная сельскохозяйственная академия  
428003, Чебоксары, Российская Федерация

**Аннотация.** Оптимизация липидного питания молодняка крупного рогатого скота дает возможность направлять их обмен веществ в сторону более полной конверсии энергии и питательных веществ кормов в продукцию более высокого качества. В этой связи изменение уровня жира в рационах бычков оказывает определенное влияние на биохимические показатели крови бычков. Сравнивался рацион коров при наличии в них 3,0, 4,0 и 5,0 % уровней жира в расчете на сухое вещество. Повышение уровня жира осуществлялось путем эквивалентной замены части концентрированных кормов и пиленых отрубей рапсовым жмыхом с повышенным содержанием жира в соответствии с показателями количества энергии и протеина. С увеличением концентрации жира в сухом веществе возрастает содержание белка в сыворотке крови животных, в том числе альбуминовой и глобулиновой фракций, что свидетельствует об ускорении процессов синтеза белка в печени, обусловленного достоверным улучшением показателей переваримости протеина, присутствующего в кормах, и находящейся в прямой зависимости от концентрации белка сыворотке крови, а также степенью удержания в теле азота. Увеличение в общем белке альбуминов свидетельствует об усилении ассимиляционных процессов, обеспечивающих более интенсивную абсолютную и относительную скорость роста бычков опытных групп, а повышение белкового индекса является показателем более эффективного использования азота и достоверно указывает на усиление процессов биосинтеза белка. Было установлено, что в связи с повышением уровня жира в рационах бычков в их крови достоверно возрастает концентрация глюкозы, что является объективным показателем повышения уровня метаболизма углеводов. На содержание общего кальция в сыворотке крови повышение концентрации жира достоверного влияния не оказывает, но способствует увеличению содержания в крови животных неорганического фосфора. Повышение уровня жира в рационах откормочного молодняка не оказывает влияния на показатели щелочного резерва крови, что свидетельствует об отсутствии нарушений в ее гомеостазе. Исследованиями было установлено, что наиболее полное