

УДК 57.085.23

Трехмерная модель мышиногo эпидермиса для лабораторных исследований псориаза

А. Г. Соболева, В. В. Соболев, А. С. Брускин, А. В. Мезенцев*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

*E-mail: mesentsev@vigg.ru

Поступила в редакцию 27.02.2013

РЕФЕРАТ Трехмерные модели кожи и эпидермиса позволяют получать достоверную информацию о таких заболеваниях, как псориаз, поскольку они точно имитируют структуру кожи. Из кератиноцитов новорожденных мышат нами получена трехмерная модель эпидермиса, которую обработали цитокинами. В представленной работе оценена пригодность этой трехмерной модели для изучения псориаза, описаны изменения в ее структуре и экспрессии генов после обработки провоспалительными цитокинами. Показано, что обработка трехмерной модели интерлейкином 17 или комбинацией фактора некроза опухолей и интерферона γ приводит к изменениям структуры, сходным с проявлениями акантоза при псориазе. Наблюдаемые изменения в экспрессии генов металлопротеиназ и других биомаркеров псориаза (*mki67*, *krt16* и *fosl1*) были сходны с изменениями в пораженной коже больных. Обработка модели интерфероном γ и фактором некроза опухолей приводит к более выраженным изменениям экспрессии генов, чем обработка интерлейкином 17. Напротив, обработка клеток HaCaT фактором некроза опухолей и интерфероном γ не влияла существенно на экспрессию *fosl1*, но снижала экспрессию *mki67*, интерлейкин 17 практически не влиял на экспрессию *krt16* и *mki67*, но снижал экспрессию *fosl1*. Результаты исследования подтверждают возможность использования трехмерной модели эпидермиса мыши для изучения псориаза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА акантоз, количественная ПЦР, корнификация, культивирование клеток, псориаз, трехмерное моделирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИЛ-1 – интерлейкин 1; ИЛ-17 – интерлейкин 17; ИФНГ – интерферон γ ; MMP1 – интерстициальная коллагеназа (interstitial collagenase [КФ 3.4.24.7]); ТММЭ – трехмерная модель мышиногo эпидермиса; ФНО – фактор некроза опухолей.

ВВЕДЕНИЕ

Трехмерные модели кожи и эпидермиса стали сравнительно широко использоваться в лабораторных испытаниях косметических продуктов, а также при ранениях и ожогах [1–3]. Практика применения трехмерных моделей соответствует законодательству Евросоюза, которое направлено на сокращение использования лабораторных животных и требует доказательств как экологической безопасности, так и эффективности экспериментальных процедур [4, 5]. Трехмерные модели кожи и эпидермиса интересны прежде всего тем, что позволяют одновременно тестировать множество лекарственных препаратов и учитывать при этом метаболические изменения, возникающие в ходе дифференцировки кератиноцитов. Таким образом, трехмерные клеточные модели можно использовать для изучения структурных изменений в тканях при различных патологиях.

В отличие от традиционного метода культивирования клеток в виде монослоя, при котором отдельные

клетки мало отличаются друг от друга, трехмерные лабораторные модели кожи и эпидермиса имитируют не только взаимодействие клеток с межклеточным матриксом и межклеточные контакты, но и изменения в экспрессии генов. Таким образом, трехмерные модели могут служить более достоверным источником информации о патологических изменениях в тканях, таких, как реструктуризация эпидермиса при псориазе. И это делает их незаменимым инструментом при экспериментальных исследованиях. Принимая во внимание ограниченный доступ научных учреждений к донорской коже, мы предполагаем разработать новый экспериментальный подход к оценке изменений в пролиферации и дифференцировке кератиноцитов, а также трансформации здоровой кожи в псориазической бляшке без использования клеток человека.

Предполагается, что появление и рост псориазических бляшек обусловлены секрецией провоспалительных цитокинов ФНО, ИФНГ и ИЛ-17 иммунны-

ми клетками, которые присутствуют в эпидермисе больного [6]. Эти цитокины в свою очередь активируют кератиноциты, внося изменения в программу их дифференцировки и увеличивая скорость их пролиферации. Руководствуясь этими представлениями, мы обрабатывали трехмерную модель эпидермиса мыши либо комбинацией ФНО и ИФНГ, либо ИЛ-17. Затем мы оценили вызванные цитокинами изменения в структуре модели и уровне генной экспрессии. Таким образом, в данной работе мы попытались проверить способность нашей модели воспроизводить некоторые характерные изменения в коже больных псориазом и оценить ее пригодность для дальнейшего изучения этого заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и обработка образцов кожи

Образцы кожи больных псориазом (*psoriasis vulgaris*, псориаз бляшечного типа) получали с помощью дерматологического пробойника (4 мм) под местной анестезией. Образцы кожи получали от больных, не проходивших курса какой-либо системной или PUVA/UV-терапии в течение 1 месяца до взятия биопсии. Биопсии непораженной кожи для проведения сравнительного анализа забирали на расстоянии не менее 3–4 см от очага поражения. Образцы, предназначенные для выделения РНК, быстро замораживали в жидком азоте и перевозили в лабораторию. Пробы взвешивали и измельчали в ступке, не допуская размораживания образца. Из образцов выделяли РНК и проводили количественную ПЦР. Биопсии кожи, предназначенные для гистологического анализа, фиксировали в формалине. Данный протокол одобрен комитетом по этике Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Этот протокол соответствует принципам, изложенным в Хельсинкской декларации, и российскому законодательству, регулирующему проведение научных исследований с донорской тканью.

Получение первичных кератиноцитов новорожденных мышат

Для получения культуры эпидермальных кератиноцитов трупы новорожденных мышат обеззараживали бетадином и последовательно промывали 70% этанолом, гентамицином и изотоническим фосфатным буферным раствором (PBS). Снятую кожу разравнивали на доньшке пластиковой чашки и инкубировали в 0.25% растворе трипсина («ПанЭко», Россия) в течение 14–16 ч. На следующий день эпидермис отделяли от дермы, измельчали ножницами и инкубировали в среде KSFМ (Life Technologies, США) при 37°C в течение 30 мин. Полученную суспензию клеток филь-

тровали через капроновое сито с диаметром ячеек 70 мкм (Sigma-Aldrich, США). Клетки осаждали центрифугированием (250 g; 5 мин), считали и культивировали в среде KSFМ с добавкой набора реагентов S7 (Life Technologies, США), 1.1×10^4 клеток/см² в флаконах T25. Клетки высевали во флаконы, покрытые коллагеном (Sigma-Aldrich, США). Дифференцировку клеток предотвращали, поддерживая концентрацию ионов кальция в среде не более 60 мкМ. Неприкрепившиеся клетки удаляли на следующий день после посева. Данный протокол одобрен комитетом по этике Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Применяемый протокол соответствует российскому законодательству, регулирующему проведение научных исследований с использованием лабораторных животных.

Культивирование клеток

Клетки NaCaT культивировали в среде DMEM, обогащенной L-глутамином, содержавшей 10% эмбриональной сыворотки теленка («ПанЭко», Россия) и 1% раствора антибиотика – антимикотика (Life Technologies, США).

Получение трехмерной модели кожи мыши

Трехмерную модель эпидермиса мыши получали с использованием лишенной клеток дермы и первичных кератиноцитов мыши. Для приготовления дермальной основы образцы кожи животных подвергали термообработке в PBS (56°C, 10 мин), после чего отделяли эпидермис от дермы [7]. Для создания изолированных отсеков для роста клеток на внешнюю поверхность полученных препаратов устанавливали стеклянные кольца, которые вдавливали в дерму. Клетки пересевали из расчета 3×10^5 клеток/см². Клетки культивировали в свежеприготовленной смеси DMEM и F12 в соотношении 3 : 1. Помимо этого в среду для культивирования добавляли эмбриональную сыворотку теленка (5% от общего объема среды), раствор антимикотика (1%), L-глутамин (4 мМ, «ПанЭко», Россия), аденин (25 мкг/мл), аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), трийодтиронин (1 мкг/мл), гидрокортизон (1 мкМ, Sigma-Aldrich, США) и рекомбинантный инсулин мыши (0.2 мкМ, R&D Systems, США). Среду заменяли каждый второй день. Через 24 ч в среду добавляли эпидермальный фактор роста (10 нг/мл, R&D Systems, США). На третий день после начала эксперимента кольца удаляли, а образцы погружали в среду. На шестой день культивирование продолжали на границе фаз, т.е. таким образом, чтобы верхняя поверхность образцов находилась в контакте с воздухом. Для последующего культивирования в среду дополнительно добавляли L-серин (1 мг/мл), L-карнитин (2 мкг/мл), ара-

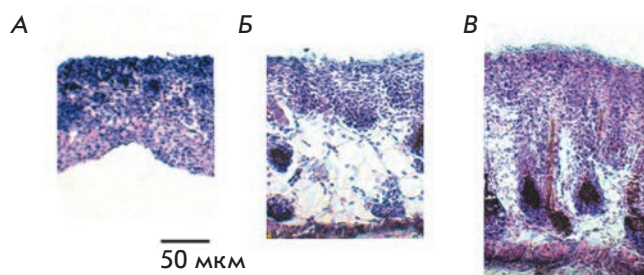


Рис. 1. Гистологический анализ наиболее репрезентативных образцов ТММЭ после их обработки провоспалительными цитокинами. Образцы ТММЭ культивировали в течение 2 недель и обрабатывали цитокинами после 9 полных дней культивирования. А – контрольный образец без обработки цитокинами; В – образец, обработанный комбинацией ФНО и ИФНГ; В – образец, обработанный ИЛ-17 ($n = 6$). Образцы использовали для приготовления парафиновых блоков и последующего окрашивания гематоксилином и эозином. Детальное описание процедур представлено в разделе «Экспериментальная часть»

хидоновую (7 мкМ) и линолевую кислоты (15 мкМ, Sigma-Aldrich, США). Витамин Е (Sigma-Aldrich, США) в количестве 0.5 мкг/мл добавляли непосредственно перед сменой среды. Образцы обрабатывали провоспалительными цитокинами, начиная с десятого дня культивирования, каждый второй день, в течение четырех дней. Для работы использовали следующие цитокины: ФНО (25 нг/мл), ИФНГ (25 нг/мл) и ИЛ-17А (50 нг/мл) производства R&D Systems (США).

Выделение РНК

РНК выделяли тризольным методом как описано ранее [8]. Если соотношение поглощений водных растворов хотя бы одного препарата при длинах волн 260 и 280 нм не превышало 2.0, все препараты данной серии очищали с использованием набора реагентов RNeasy (Qiagen, Германия). Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле в неденатурирующих условиях.

Проведение количественной ПЦР

Полученные образцы РНК были использованы для синтеза кДНК с применением набора реагентов MMLV RT («Евроген», Россия). Амплификацию проводили методом количественной ПЦР с использованием специфических флуоресцентных зондов (Life Technologies, США) на установке Eco (Illumina, США). Результаты анализировали при помощи программного продукта Eco, предоставленного производителем прибора.

Проведение гистологического анализа

Для проведения гистологического анализа получали парафиновые блоки. Срезы ткани окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистический анализ

Статистическую значимость полученных результатов проверяли методом дисперсионного анализа, а также с применением t -теста. Значимыми считали различия при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Трехмерная модель мышинного эпидермиса (ТММЭ), полученная в нашей лаборатории (рис. 1А), слабо структурирована. В отличие от нормального эпидермиса человека, в ней отсутствует гранулярный слой клеток и слабо выражена разница между базальным и супрабазальными слоями. Корнификация также выражена слабо и представлена 2–3 верхними слоями клеток. В полученных биопсиях в незатронутой болезнью коже (рис. 2А), напротив, хорошо заметен базальный слой кератиноцитов, который непосредственно примыкает к базальной мембране. Обычно это единственный слой клеток эпидермиса, где клетки могут делиться. В супрабазальных слоях кожи кератиноциты постепенно меняют форму и начинают последовательно синтезировать маркеры терминальной дифференцировки. Гранулярный слой отделяет ороговевшие клетки, лишенные ядер, от живых клеток супрабазального слоя (рис. 2В). В псориазных бляшках (рис. 2В) эпидермис существенно утолщен, поскольку пролиферация клеток распространяется на супрабазальный слой и меняется сама программа дифференцировки кератиноцитов. Например, изменениям подвергается синтез специфичных биомаркеров, образование в цитоплазме кератогиалиновых гранул, а также деградация клеточных ядер и десмосом. Примечательно, что полученная нами экспериментальная модель изначально (до обработки провоспалительными цитокинами) по своей структуре напоминает скорее эпидермис больного псориазом, чем эпидермис здоровой кожи.

Сравнение профилей экспрессии эпидермальных цитокератинов и маркеров конечной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов в образцах ТММЭ и кожи новорожденных мышат позволяет говорить о сопоставимом уровне экспрессии *krt1*, *krt5*, *krt14* (рис. 3). Напротив, уровень экспрессии *krt10* и *krt18* снижен в ТММЭ, а уровень экспрессии *krt16* – в коже мышат. Помимо этого, в ТММЭ повышен уровень экспрессии *ivl*, а уровень экспрессии *lor* меняется незначительно.

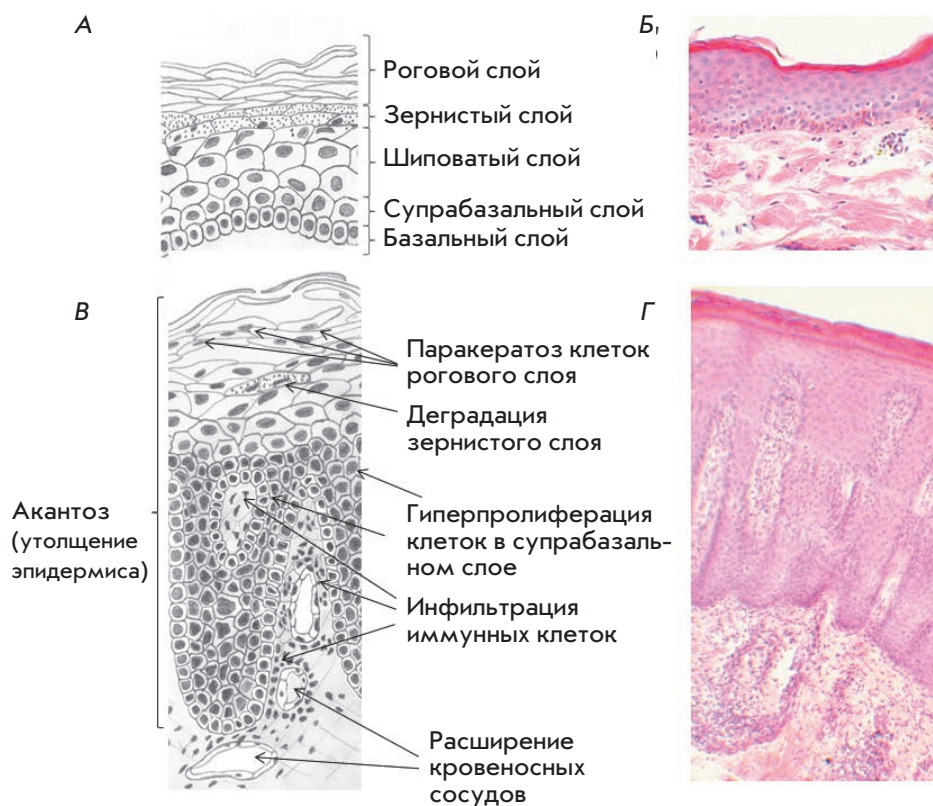


Рис. 2. Схема и гистологический анализ эпидермиса больного псориазом. Для гистологического анализа использовали образцы кожи больного в парафине после их окрашивания гематоксилином и эозином как описано в «Экспериментальной части». А – схема визуально нормального участка эпидермиса больного; Б – участок визуально нормального эпидермиса больного, окрашенный эозином и гематоксилином; В – схема пораженного участка эпидермиса больного; Г – пораженный участок кожи больного, окрашенный эозином и гематоксилином

Обработка ТММЭ провоспалительными цитокинами ФНО и ИФНГ приводит к увеличению толщины слоя живых клеток примерно в 1.5 раза относительно необработанных образцов (рис. 4). При этом видимой корнификации в верхнем слое клеток не происходит (рис. 1Б). Распределение клеток в нижних слоях ТММЭ становится менее плотным, а структура ткани – более хрупкой. Последнее обстоятельство осложняет получение неповрежденных срезов ТММЭ для гистологического анализа. Примечательно, что после обработки ИЛ-17 изменения не так сильно выражены, как после обработки ФНО и ИФНГ (рис. 1В и рис. 4): толщина трехмерной модели достоверно меньше, чем в образцах, обработанных ФНО и ИФНГ, но превышает аналогичные показатели в контрольных образцах. Таким образом, ТММЭ, как и эпидермис больных псориазом, чувствительна к действию провоспалительных цитокинов (ФНО, ИФНГ и ИЛ-17). При этом наибольший эффект наблюдается после обработки ТММЭ комбинацией ФНО и ИФНГ.

На уровне транскрипции в ТММЭ также происходят изменения, аналогичные изменениям в коже больных: экспрессия биомаркеров псориаза, *krt16* и *fosl1*, повышена после обработки ФНО и ИФНГ (рис. 5А). Также повышается экспрессия маркера пролиферации кератиноцитов, *mki67*. Модель

воспроизводит специфический профиль экспрессии генов металлопротеиназ (*mmp1*, *mmp2*, *mmp9* и *mmp12*), характерный, как показано нами ранее, для псориаза [9]. Интересно, что обработка ИЛ-17 не приводит к статистически значимым изменениям экспрессии некоторых генов (*mki67*, *fosl1* и *krt16*) по сравнению с контролем (рис. 5Б). Таким образом, полученные нами результаты говорят в пользу того, что именно комбинация ФНО и ИФНГ вносит несравненно больший вклад в активацию кератиноцитов как при псориазе, так и в ТММЭ.

Как показано нами ранее, профили экспрессии металлопротеиназ в клетках HaCaT, обработанных одновременно ФНО и ИФНГ, аналогичны профилям в пораженной донорской коже [10]. Такие же изменения после обработки ФНО и ИФНГ наблюдаются и в ТММЭ (рис. 5А). Напротив, изменения экспрессии других биомаркеров говорят о том, что культура клеток HaCaT как предполагаемая экспериментальная модель псориаза имеет ряд принципиальных отличий от ТММЭ, которые должны учитываться в экспериментальной работе при использовании клеток данного типа. Так, в клетках HaCaT, обработанных цитокинами ФНО и ИФНГ, воспроизводятся изменения в экспрессии *krt16*, биомаркера псориаза (рис. 6А), но не воспроизводятся, в отличие от ТММЭ, изменения, вызванные обработкой ИЛ-17 (рис. 6Б). Следует

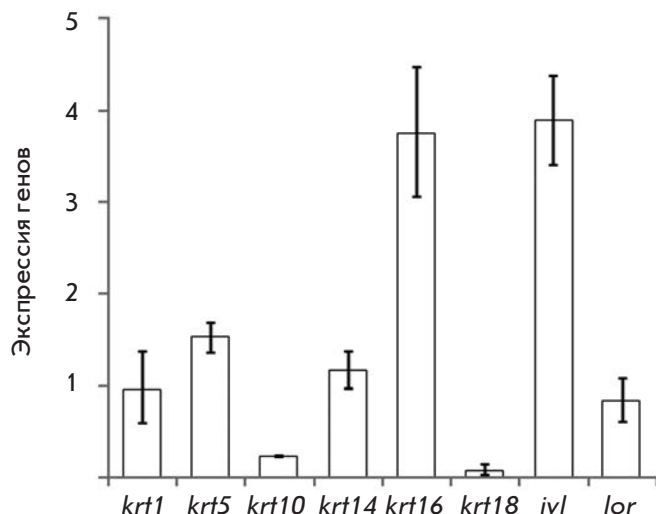


Рис. 3. Изменения экспрессии генов цитокератинов и маркеров конечной дифференцировки кератиноцитов. Экспрессию генов цитокератинов и маркеров конечной дифференцировки кератиноцитов определяли методом количественной ПЦР как описано в «Экспериментальной части». Экспрессию генов в обработанных образцах сравнивали с экспрессией в необработанных цитокинами образцах ($n = 3$). Уровень экспрессии генов в необработанных образцах принимали равным 1

отметить, что экспрессия *mkib7* и *fosl1* в этих клетках не увеличивалась независимо от того, обрабатывались ли эти клетки комбинацией ФНО и ИФНГ или цитокином ИЛ-17 (рис. 6А,Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Внешние проявления псориаза являются результатом сложного многостадийного процесса, в котором участвует множество сигнальных путей и различные типы клеток. Моделирование патологических изменений кожи при псориазе позволит определить круг молекулярных механизмов, вовлеченных в патогенез болезни, и установить их связь с конкретными клиническими признаками. В последнее время появляется все больше работ, посвященных разработке трехмерных моделей кожи и эпидермиса человека. В большей степени данное направление востребовано при лечении повреждений кожных покровов. Среди работ российских ученых мы хотели бы отметить разработку клеточных моделей с использованием эндопротезной сеточки [11] и полимерных матриц на основе природных и биodeградируемых материалов, таких, как хитин и хитозан [12], полимолочная кислота [13], аморфный поли(*D,L*-лактид) и полиэтиленгликоль [14] и др. Эти разработки используют при ожогах [11] и трофических язвах [3].

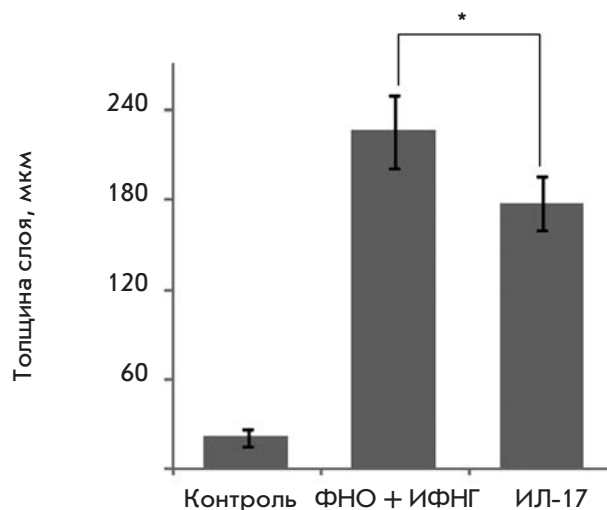


Рис. 4. Изменения толщины образцов ТММЭ после обработки провоспалительными цитокинами. Образцы ТММЭ культивировали в течение 2 недель. Обработку провоспалительными цитокинами проводили после 9 полных дней культивирования как описано в «Экспериментальной части»

В наиболее часто применяемых трехмерных моделях кожи и эпидермиса эпидермальные кератиноциты высевают либо на содержащий фибробласты коллагеновый гель, либо на другую специальную подложку, например, на лишенную клеток дерму. Основным источником фибробластов для трехмерных моделей, применяемых в лабораторных, неклинических исследованиях, служат раковые клетки человека или мыши, предварительно γ -облученные или обработанные митомицином С для подавления в них митоза. В качестве источника кератиноцитов чаще всего используют кусочки человеческой кожи, оставшиеся после хирургических операций. Реже, в зависимости от специфики эксперимента, в трехмерные модели включают клетки других типов, например макрофаги [15], меланоциты [16] или дендритные клетки [17]. Особенность нашей модели как экспериментальной модели псориаза состоит в том, что в ней используются исключительно первичные кератиноциты мыши и не используются клетки человека.

Применение кератиноцитов и деэпителизированной дермы мыши в трехмерных моделях имеет целый ряд принципиальных преимуществ. Домашняя мышь – широко используемое в лабораторной практике животное, неприхотливое при содержании в неволе. Высокая плодовитость (6–8 и более мышат в одном выводке) и короткая беременность (18.5 дней) мышей позволяют снизить зависимость экспериментаторов от донорской кожи. Выбрав для своего ис-

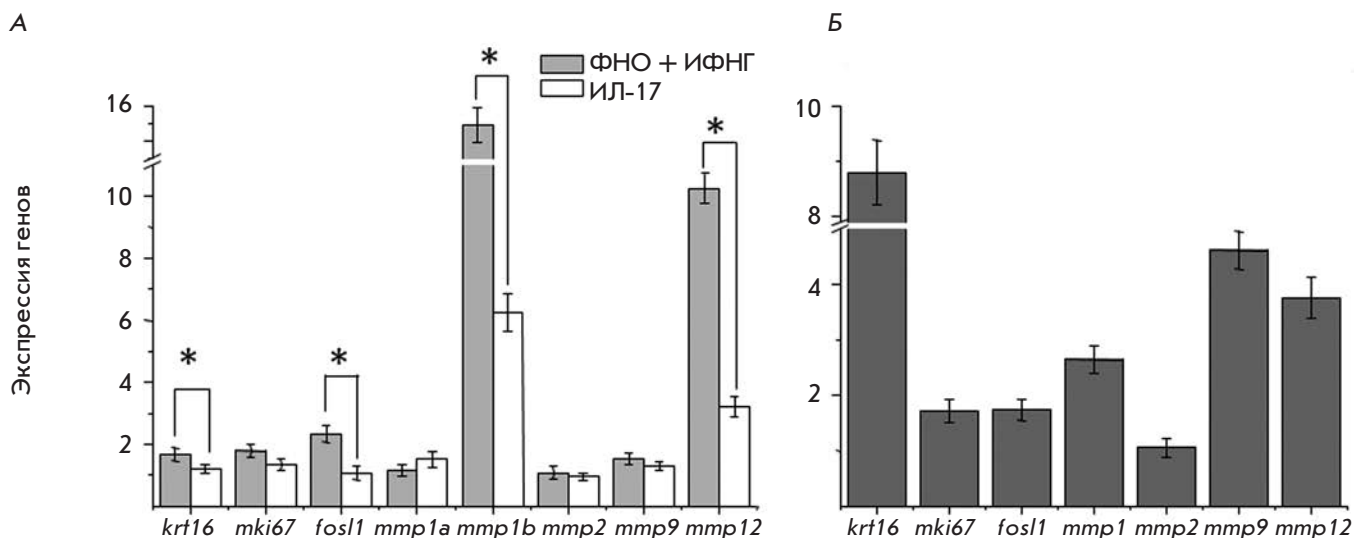


Рис. 5. Изменения экспрессии генов в ТММЭ после обработки провоспалительными цитокинами (А) и в коже больных псориазом (Б). ТММЭ обрабатывали либо комбинацией ФНО и ИФНГ, либо ИЛ-17. Из соответствующих образцов выделяли РНК и проводили синтез кДНК. кДНК анализировали методом количественной ПЦР как описано в «Экспериментальной части». Экспрессию генов в образцах ТММЭ, обработанных цитокинами, сравнивали с экспрессией в необработанных цитокинами образцах ($n = 3$)

следования кожу новорожденных мышат, мы рассчитывали увеличить выход при выделении клеток, поскольку толщина мышинного эпидермиса существенно уменьшается в первые дни жизни мышат.

Существуют несколько типов экспериментальных моделей псориаза, в которых используются генетически модифицированные, т.е. трансгенные мыши [18] и животные с делециями в определенных генах [19]. Кроме этого, имеются экспериментальные модели, в которых характерные особенности псориаза вызваны спонтанными мутациями в геноме животных [20, 21] либо применением лекарственных средств [22]. По мере развития такие модели позволят добиться точного соответствия с клиническими проявлениями псориаза у людей [18, 22].

Получение и дальнейшее совершенствование ТММЭ полностью отвечает требованиям европейского законодательства, которое требует от исследователей сокращения использования лабораторных животных и скорейшего перехода к использованию клеток и тканей [4, 5]. Как показывают наши исследования, в полученной модели экспрессируются гены основных цитокератинов, вовлеченных в дифференцировку эпидермальных кератиноцитов (*krt1*, *krt5*, *krt14*). При этом уровень экспрессии этих генов сопоставим с уровнем в коже новорожденных мышат (рис. 3). Помимо генов цитокератинов экспрессируются гены *ivl* и *lor*, начало экспрессии которых предваряет процесс кератинизации. Повышенный

уровень экспрессии *ivl* и *krt16*, а также пониженный уровень *krt10* говорят об изменениях в дифференцировке клеток в процессе культивирования ТММЭ. Пониженный уровень экспрессии *krt18* указывает на большую однородность клеточного состава ТММЭ, состоящей преимущественно из эпидермальных кератиноцитов.

Сравнение ТММЭ и кожи больных позволяет сделать вывод о том, что полученная модель, как и псориазные бляшки, чувствительна к действию провоспалительных цитокинов. При этом изменения на уровне ткани, т.е. увеличение толщины слоя клеток (рис. 4) и отсутствие кератинизации во внешнем слое (рис. 1А–В), дополняются индукцией характерных для псориаза генов – генов металлопротеиназ, *mki67*, цитокератина, *krt16*, и ядерного белка, *fosl1* (рис. 5А). Зафиксированные нами гистологические изменения в модели (рис. 1А–В) напоминают акантоз (рис. 2В), а изменения профилей экспрессии генов (рис. 5А) аналогичны изменениям в коже больных псориазом (рис. 5Б).

При выборе генов для экспериментальной характеристики модели мы руководствовались их вкладом в патогенез болезни. Так, ММР1, ММР9 и ММР12 участвуют в структурной перестройке эпидермиса при псориазе [9]. Экспрессия и активация этих металлопротеиназ важны для изменения состава внеклеточного матрикса и базальной мембраны, роста новых сосудов и миграции клеток, например иммун-

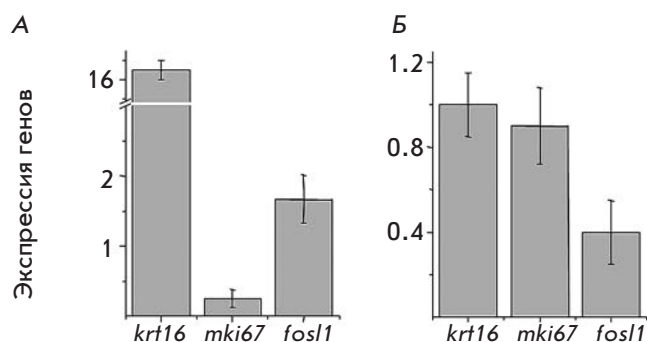


Рис. 6. Изменения экспрессии генов в клетках HaCaT, обработанных провоспалительными цитокинами. Культуры клеток HaCaT, достигшие 70% монослоя, обрабатывали провоспалительными цитокинами либо комбинацией ФНО и ИФНГ (А), либо ИЛ-17 (Б). Из образцов выделяли РНК и получали кДНК. кДНК анализировали методом количественной ПЦР как описано в «Экспериментальной части». Экспрессию генов в обработанных образцах сравнивали с экспрессией в необработанных цитокинами образцах ($n = 3$)

ных клеток. Нарушение баланса между металлопротеиназами в коже больного псориазом указывает на обострение болезни. Увеличение экспрессии гена *mki67* говорит о гиперпролиферации кератиноцитов [23]. Повышенная экспрессия *mki67* также является одним из наиболее характерных признаков поврежденной псориазом кожи [24]. В коже больных псориазом повышен уровень цитокератина 16 (рис. 5Б). При этом в коже здоровых людей ген *krt16* экспрессируется на очень низком уровне [25]. Наконец, по изменению экспрессии *fosl1* можно судить об эффективности курса терапии. Экспрессия *fosl1* возрастает при обострении болезни и снижается при наступлении ремиссии [26].

Любопытно, что после обработки ИЛ-17 изменения профиля экспрессии генов становятся менее выраженными (рис. 5А). Экспрессия генов *krt16*, *mki67*, *fosl1*, *mmp1a*, *mmp2* и *mmp9* изменяется не более чем в 1.5 раза по сравнению с экспрессией в необработанных цитокинами образцах, и только у двух других генов – *mmp1b* и *mmp12* – остается на сравнительно высоком уровне.

Примечательная особенность приведенного в работе профиля генной экспрессии – наличие у мыши двух изоформ MMP1: MMP1a и MMP1b. Гены, кодирующие эти белки, идентифицированы уже более 10 лет тому назад [27]. При этом физиологические различия между продуктами генов *mmp1a* и *mmp1b* остаются неустановленными. Оба гена входят в состав одного кластера, расположенного на хромосо-

ме 9, и обладают высокой гомологией как по отношению друг к другу, так и к *mmp1* человека [27]. Кроме этого, выявлено значительное сходство в регуляции генов *mmp1a* и *mmp1b* цитокинами и факторами роста [28]. Включение обоих генов в список предполагаемых маркеров позволило нам показать, что *mmp1a* более чувствителен к действию провоспалительных цитокинов, в то время как экспрессия *mmp1b* после обработки как комбинацией ФНО и ИФНГ, так и ИЛ-17, изменяется примерно в 1.6 раза по сравнению с контролем (рис. 5А).

В целом более точное воспроизведение профиля экспрессии генов, специфичных для псориаза, отличается предложенную нами модель от более традиционной «двумерной» культуры клеток HaCaT (рис. 5А и 6 соответственно). Например, обработка клеток HaCaT провоспалительными цитокинами ФНО и ИФНГ подавляет экспрессию *mki67* (рис. 6А). По-видимому, это объясняется отклонением от физиологического оптимума для данного типа клеток. При этом наиболее неожиданные изменения наблюдаются после обработки клеток HaCaT цитокином ИЛ-17: экспрессия двух биомаркеров – *krt16* и *mki67* – меняется незначительно, а у *fosl1* падает до уровня более низкого, чем в контроле (необработанные клетки). Таким образом, культура клеток HaCaT менее точно описывает экспрессию биомаркеров псориаза, чем ТММЭ.

ТММЭ пока имеет ряд существенных отличий от широко используемых в настоящее время трехмерных моделей кожи человека. Например, в ТММЭ нет четкой границы при переходе от одного слоя клеток к другому, корнификация внешнего слоя клеток незначительна, а распределение клеток более диффузно. Помимо этого, в ТММЭ отсутствует гранулярный слой клеток. Хотя у нас нет однозначного объяснения данного феномена, мы предполагаем, что эти различия обусловлены тем, что эпидермис мыши, используемый нами, не полностью сформирован, и для более полного соответствия моделям из клеток человека необходимо будет внести изменения в среду культивирования ТММЭ.

Для стабилизации уровня эпидермальных ростовых факторов и цитокинов в среде предполагается дополнить модель слоем непродифференцирующих дермальных фибробластов, предварительно обработанных митомицином С [29]. С целью предотвращения дифференцировки эпидермальных кератиноцитов на начальном этапе культивирования мы планируем использовать ингибиторы киназы GSK3. Ранее один из ингибиторов киназы GSK3 уже успешно использовался для получения индуцированных стволовых клеток кожи из эпидермальных кератиноцитов [30]. Наконец для улучшения корнификации верхних слоев трехмерной модели в культуральную среду будет

добавлен ИЛ-1 или онкостатин М. Эти факторы будут применены на позднем этапе культивирования. Как показано ранее, ИЛ-1 и онкостатин М обладают способностью индуцировать гены белка S100A, а также стимулируют экспрессию генов *Tgm1* и *Ivl*, кодирующих маркеры дифференцировки кератиноцитов – трансглутаминазу и инволюкрин [31, 32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного нами исследования подтверждают возможность использования трехмерной модели эпидермиса мыши для изучения псориаза.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что комбинация ИФНГ и ФНО вносит, по-видимому, большой вклад в активацию кератиноцитов мыши, чем ИЛ-17. ●

Работа поддержана Министерством науки и образования Российской Федерации (грант № 16.512.11.2049), федеральной программой «От фундаментальной науки к медицине» и специальной программой «Научный и педагогический потенциал инновационной России» (грант № Р1309).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kolbe L., Mann T., Gerwat W., Batzer J., Ahlheit S., Scherner C., Wenck H., Stab F. // J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. 2013. V. 27. S1. P. 19–23.
- Васильев А.В., Воротеляк Е.А., Кисилев И.В., Терских В.В. // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2008. № 2. С. 45–53.
- Мельцова А.Ж., Гриценко В.В., Орловский П.И., Томсон В.В., Сабельников В.В., Шулепова Е.К., Прокопец А.И., Пинаев Г.П., Блинова М.И., Юдинцева Н.М. // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2007. Т. 166. № 1. С. 72–77.
- Kandarova H., Liebsch M., Genschow E., Gerner I., Traue D., Slawik B., Spielmann H. // Altex. 2004. V. 21. № 3. P. 107–114.
- Mun G.C., Aardema M.J., Hu T., Barnett B., Kaluzhny Y., Klausner M., Karetsky V., Dahl E.L., Curren R.D. // Mutat. Res. 2009. V. 673. № 2. P. 92–99.
- Johnson-Huang L.M., Lowes M.A., Krueger J.G. // Dis. Model Mech. 2012. V. 5. № 4. P. 423–433.
- Tjabringa G., Bergers M., van Rens D., de Boer R., Lamme E., Schalkwijk J. // Am. J. Pathol. 2008. V. 173. № 3. P. 815–823.
- Chomczynski P., Mackey K. // BioTechniques 1995. V. 19. № 6. P. 942–945.
- Стародубцева Н.Л., Соболев В.В., Соболева А.Г., Николаев А.А., Брускин С.А. // Генетика. 2011. Т. 47. № 9. С. 1254–1261.
- Стародубцева Н.Л., Миннибаев М.Т., Соболева А.Г., Корсунская И.М., Кривошапов Л.Г., Елкин А.М., Яковенко Г.Т., Пирузян А.Л., Брускин С.А., Соболев В.В. // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2011. Т. 2. № 15. С. 38–41.
- Смирнов С.В., Кшелев И.В., Васильев А.В., Терских В.В. // Хирургия. 2003. № 12. С. 58–62.
- Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А., Бочек А.М., Гофман И.В., Баклагина Ю.Г. Сапрыкина Н.Н., Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Спичкина О.Г. и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5. № 1. С. 65–73.
- Швед Ю.Л., Кухарева Л.В., Зорин И.М., Соловьев А.Ю., Блинова М.И., Билибин А.Ю., Пинаев Г.П. // Цитология. 2006. Т. 48. № 2. С. 161–168.
- Швед Ю.А., Зорин И.М., Пинаев Г.П., Билибин А.Ю. // Физикохимия полимеров: синтез, свойства и применение. 2009. № 15. С. 175–179.
- Linde N., Gutschalk C.M., Hoffmann C., Yilmaz D., Mueller M.M. // PloS One. 2012. V. 7. № 7. e40058.
- Souto L.R., Vassallo J., Rehder J., Pinto G.A., Puzzi M.B. // Sao Paulo Med. J. 2009. V. 127. № 1. P. 28–33.
- Uchino T., Takezawa T., Ikarashi Y. // Toxicol. in vitro. 2009. V. 23. № 2. P. 333–337.
- Nakajima K., Kanda T., Takaishi M., Shiga T., Miyoshi K., Nakajima H., Kamijima R., Tarutani M., Benson J.M., Elloso M.M., et al. // J. Immunol. 2011. V. 186. № 7. P. 4481–4489.
- Schonthaler H.B., Huggenberger R., Wculek S.K., Detmar M., Wagner E.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 50. P. 21264–21269.
- Liang Y. // Patholog. Res. Int. 2011. № 936794.
- Wang Z., Sokolovska A., Seymour R., Sundberg J.P., Hogenesch H. // PloS One. 2012. V. 7. № 2. e31809.
- van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S., Kant M., Boon L., Laman J.D., Cornelissen F., Mus A.M., Florencia E., Prens E.P., et al. // J. Immunol. 2009. V. 182. № 9. P. 5836–5845.
- Fransson J., Hammar H. // Arch. Dermatol. Res. 1992. V. 284. № 6. P. 343–348.
- Rikimaru K., Moles J.P., Watt F.M. // Exp. Dermatol. 1997. V. 6. № 5. P. 214–221.
- Iizuka H., Takahashi H., Honma M., Ishida-Yamamoto A. // J. Dermatol. 2004. V. 31. № 4. P. 271–276.
- Серов Д.Н., Соболев В.В., Потеев Н.Н., Пирузян Е.С., Корсунская И.М., Абдеева И.А., Соболева А.Г., Золотаренко А.Д., Миннибаев М.Т. // Клиническая дерматология и венерология. 2010. № 4. С. 4–9.
- Balbin M., Fueyo A., Knauper V., Lopez J. M., Alvarez J., Sanchez L. M., Quesada V., Bordallo J., Murphy G., Lopez-Otin C. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 13. P. 10253–10262.
- Hyc A., Osiecka-Iwan A., Niderla-Bielinska J., Moskalewski S. // Int. J. Mol. Med. 2011. V. 27. № 1. P. 127–137.
- Huang Y.C., Wang T.W., Sun J.S., Lin F.H. // Artif. Organs. 2006. V. 30. № 3. P. 150–159.
- Li Z., Rana T.M. // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 1085.
- Yano S., Banno T., Walsh R., Blumenberg M. // J. Cell. Physiol. 2008. V. 214. № 1. P. 1–13.
- Gazel A., Rosdy M., Bertino B., Tornier C., Sahuc F., Blumenberg M. // J. Invest. Dermatol. 2006. V. 126. № 12. P. 2647–2657.