

A Debreceni Orvostudományi Egyetem Bőr- és Nemikórtani Klinika (igazgató: Hunyadi János dr., egyetemi tanár), és Department of ¹Pharmacology and ²Dermatology, University of Texas, Medical School, Houston, Texas közleménye

Fibroblasztok hatása a keratinociták differenciálódására bőr-ekvivalens modellen

Effect of fibroblasts on keratinocyte in skin equivalent model

REMENYIK ÉVA DR., PETER J. A. DAVIES DR., MADELEINE DUVIC DR.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők háromdimenziós bőrkultúrát hoztak létre újszülött és felnőtt humán fibroblaszt és keratinocita, valamint 3T3 egér fibroblaszt felhasználásával. Minden lehetséges variációt tartalmazó modellt elkészítettek, dupla példányban. Hematoxilin-eozinfestéssel, és keratinocita transzglutamináz (KTG), keratin (K) 10, 14, 16 ellenes monoklonális antitestek felhasználásával immunoperoxidáz reakcióval vizsgálták a modellekből készült metszeteket. Megállapították, hogy a modell alkalmas a hám differenciálódás vizsgálatára és a keratinociták eredete lényegesen nem befolyásolta a differenciáltságot, a fibroblasztok eredete azonban igen. A 3T3 egér fibroblaszt eredményezte a legdifferenciáltabb hámot. Az egér fibroblasztokat tartalmazó modellekben a KTG és K10 expressziója a normál epidermiszben észlelt expresszióknak felelt meg, bár a K14, 16 a hiperproliferációs hámra jellemző expressziót mutatott. A humán fibroblasztok minden vizsgált antitesttel a hiperproliferációs hámra jellemző antitestmintázatot eredményezték a fölöttük differenciálódott epidermiszben. A szerzők feltételezik, hogy a keratinociták *in vitro* háromdimenziós differenciálódását a 3T3 fibroblasztok citokin-produkciója kifejezettebben befolyásolja, mint a humán fibroblasztoké.

Kulcsszavak:

fibroblaszt – bőr-ekvivalens modell – differenciáció – keratinocita

SUMMARY

Three dimensional skin organotypic cultures were fabricated using foreskin, adult human skin, fibroblasts and keratinocytes as well as 3T3 mouse fibroblasts. All possible variants were created in a duplicate form. Histological sections of models were studied with hematoxylin eosin and immunoperoxidase staining, using monoclonal antibodies against keratinocyte transglutaminase, keratin 10, 14 and 16. It was found, that the model is suitable to study the differentiation of epidermis and the origin of the keratinocytes did not influence the grade of differentiation. In case of fibroblasts differences could be seen. 3T3 mouse fibroblasts driven keratinocytes resulted in the best differentiated epidermis, while KTG and K10 expressions were the same as in normal epidermis, but K14 and K16 expression were characteristic of hyperproliferative epidermis. Human fibroblasts showed an antigen expression pattern characteristic of hyperproliferative epidermis with all examined antibodies. It was supposed, that cytokine production of 3T3 fibroblasts is more remarkable for *in vitro* three dimensional differentiation.

Keywords:

fibroblast – skin equivalent model – differentiation – keratinocyte

Az *in vitro*, háromdimenziós szervkultúrák felhasználása már néhány évtizede elterjedt a kutatói gyakorlatban. Előnyük, hogy az *in vivo* szervekhez sokkal közelebb álló rendszerek, mint a konvencionális egy sejtrétegben tenyésztett sejtek. A bőr speciális funkciójáért főleg az elszarusodó lap-hám felelős, mely 90%-ban keratinocitákból áll. Az alatta elhelyezkedő irha legfontosabb sejtfelesége a fibroblaszt. A két sejt-típus felhasználásával az *in vivo* hám szerkezetéhez nagyon hasonló epidermisz alakítható ki. A megvalósítás lehetőségeit korábban részletesen ismertettük (28). *Bell és mtsai* (2) módszerét alkalmazva, amikor is fibroblasztokat tartalmazó kollagén géltre tegezünk a keratinocitákat, lehetőség nyílik különböző eredetű fibroblasztok és keratinociták együttes tenyésztésére és azok kölcsönhatásának tanulmányozására.

Újszülött keratinociták és fibroblasztok felhasználásával készített bőr-ekvivalens modellel nyert tapasztalatainkról már beszámoltunk (28). Jelen közleményben azt vizsgáljuk, milyen hatása van a modell morfológiájára, ha a készítéséhez felhasznált sejtek eredete különböző.

Anyag és módszer

A felhasznált sejtek:

Újszülött fiúk circumciziója után egyébként eldobott fitymából származó keratinocita (ÚKC) és fibroblaszt (ÚFb). Humán felnőtt nők mellkisebbítő műtete során feleslegessé váló bőrből szeparált keratinocita (FKC) és fibroblaszt (FFb). Az anyák, ill. a nők beleegyezésüket adták a szövetek felhasználásához. 3T3 egér-fibroblaszt.

A modell készítése

A részletes leírás a korábbi közleményben található (28). A primer keratinocita-tenyésztés 3T3 tápláló fibroblasztok felhasználásával történik, majd serummentes mediumban önállóan, fibroblasztok nélkül tenyésztettük tovább, 3.–4. passzázszt alkalmaztunk a modellekhez. A humán fibroblasztokat a dermiszből expansióval nyertük és DMEM + 10% FCS mediumban tenyésztettük, 3.–5. passzázs után használtuk fel. A bőr-ekvivalens modell a fibroblasztokat tartalmazó kollagén gél elkészítésével kezdődik, majd másnap erre rétegezzük a frissen tripszinizált keratinocitákat (3.–4. passzázs). A 3. napon rozsdamentes rácsra helyezük a modellt és úgy táp-

láljuk, hogy a medium csak alulról, a gélen keresztül jusson a hámsejtekhez. 14. napon fixáltuk a modelleket. Minden lehetséges kombinációt létrehoztunk a felhasznált sejtekből. Legalább három alkalommal és minden kísérleti kombinációból két azonos modellt alakítottunk ki.

A kombinációk: ÚKC/3T3, ÚKC/FFb, ÚKC/ÚFb, FKC/3T3, FKC/FFb, FKC/ÚFb

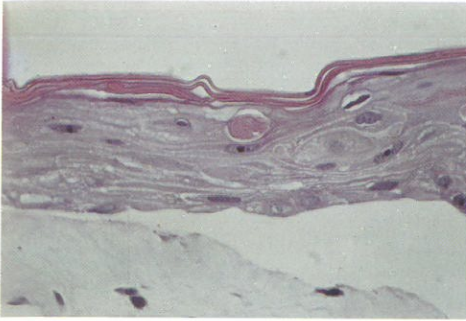
Immunoperoxidáz festés

A 14. napon a fixálatlan modelleket 3 részre vágtuk és egy részt RNAz mentes paraformaldehidben fixáltunk, majd paraffinba ágyaztunk, egy részt hirtelen folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és -70°C -on tároltunk. A harmadik harmadot Tissue-Tek OCT Compound (Miles, IN) felhasználásával folyékony nitrogénben fagyasztottunk, majd felhasználásig -70°C -on tároltunk. Ebből 4 μm kriosztát metszeteket készítettünk poly L-lisinnel (Sigma) fedett tárgylemezre és acetonban fixáltuk. A paraffinba ágyazott anyagokból is 4 μm metszetek készültek előkezelt tárgylemezre. Dehidráció és mikrohullámú kezelés után Keratinocita transzglutamináz (BC1) monoklonális antitest 1:4, Keratin 10, 14, 16 1:100 (ajándék Irene Lightól, Dept. of Experimental Dermatology, London, UK), elleni antitestek felhasználásával avidin-biotin-immunoperoxidáz (DAKO LSAB kit) reakciót végeztünk a protokollban leírtak szerint, 3,3'-diaminobenzidine tetrahidrokloride (DAB, DAKO) kromogén felhasználásával. A háttérfestéshez 1% hematoxilinnel I festést használtunk.

Eredmények

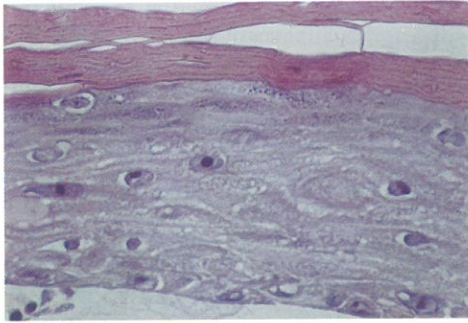
Azonos fibroblasztokon fejlődő különböző eredetű keratinociták által képzett hámot összehasonlítva, megállapíthatjuk, hogy felnőtt bőrből származó keratinocitát használva vékonyabb a hám, de a szerkezete hasonló, mint amelyet az újszülött fityma bőrből származó keratinociták alkotnak (1., 3. ábra). Ezzel ellentétben azonos keratinocitát alkalmazva a különböző fibroblasztokon már hematoxilinnel eosinfestéssel is jelentős különbség látható a modellek között (2., 3. ábra). HE festéssel a 3T3 fibroblasztokon (2. ábra) differenciálódott hám jól elkülönült rétegeket, bazális, tüskés, szemcsés és vastag keratinréteget mutat. A keratinrétegben magvak csak elvétve láthatóak. A FFb-on (3. ábra) differenciálódott hám nagyon hasonlít az ÚFb tartalmazó modellhez. A hám horizontális rétegzettsége helyenként felbomlott, ren-

Bőr-ekvivalens modellek (400x)



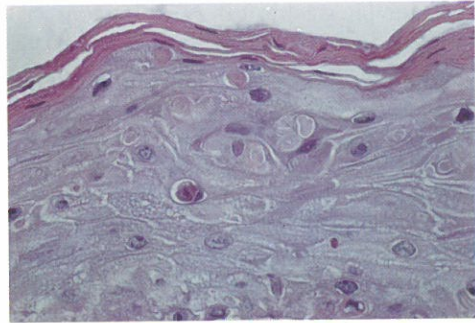
1. ábra

Felnőtt humán KC/Felnőtt humán FB
Hematoxilin-eozin festés, paraffin beágyazás



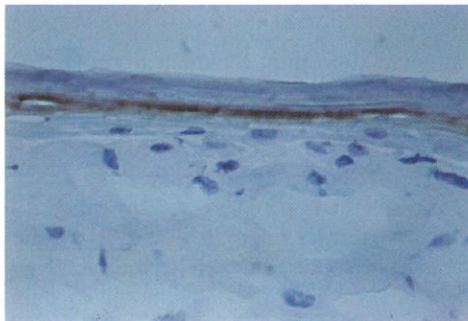
2. ábra

Újszülött humán KC/3T3 egér FB
Hematoxilin-eozin festés, paraffin beágyazás



3. ábra

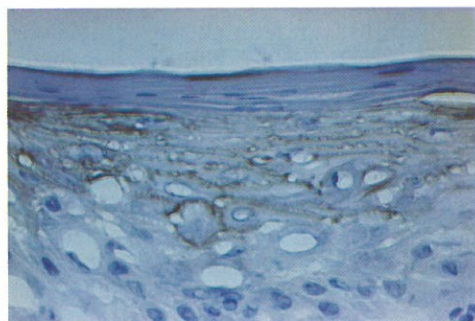
Újszülött humán KC/Felnőtt humán FB
Hematoxilin-eozin festés, paraffin beágyazás



4. ábra

Újszülött humán KC/3T3 egér FB

Immunoperoxidáz festés, AB: Keratinocita transzglutamináz, fagyasztott metszet



5. ábra

Újszülött humán KC/Felnőtt humán FB

dezetlen, a granularis réteg csak néhol látható, a keratinréteg jól elkülönül, de kifejezett parakeratózis van.

A modellek hámjának differenciáltsági fokáról még több információt kaphatunk immunoperoxidáz festéssel. A humán bőrök-ből (újszülött fityma és felnőtt normál bőr)

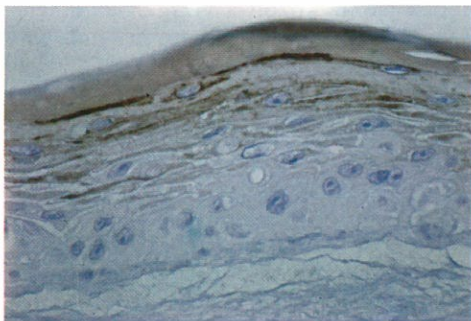
származó fibroblasztokat tartalmazó modellek háma között a vizsgált paraméterekben lényeges eltérést nem találtunk. Így csak a felnőtt humán epidermiszből származó fibroblasztokból készített modelleket (3., 5., 7. ábra) és a 3T3 egér-fibroblasztokat tartalmazó modelleket (2., 4., 6. ábra) mutatjuk be.

A KTGáz megjelenése a 3T3 sejtek fölött fejlődött hámban szigorúan csak a granuláris rétegre lokalizálódik (4. ábra). A Ffb-at tartalmazó dermisz fölött (5. ábra) már jóval korábban, a szuprabazális réteg alsó sejtsoraiban megkezdődik a fehérje megjelenése, így jóval nagyobb sávban

található a membránfestődés, mint a 3T3 fibroblasztok fölött.

A K10 a 3T3 fibroblasztok fölötti hámban (6. ábra) már a szuprabazális réteg legalsóbb sejtsoraiban megjelenik, míg a Ffb fölötti epidermiszben (7. ábra) csak a külső sejtsorokban.

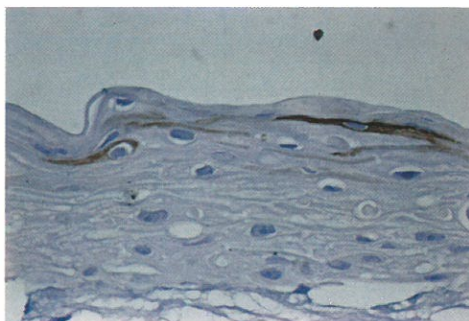
Bőr-ekvivalens modellek (400x)



6. ábra

Újszülött humán KC/3T3 egér FB

Immunoperoxidáz festés, AB: keratin 10, paraffin beágyazás



7. ábra

Újszülött humán KC/Felnőtt humán FB

Megbeszélés

Előző hasonló tárgyú közleményünkben arra mutattunk rá, hogy a bőr-ekvivalens modell alkalmas a hám differenciálódás vizsgálatára és hámjának szerkezete leginkább a hiperproliferációs (psoriasis, sebgyógyulás) hám szerkezetéhez áll közel (28). Ez a különböző módon kialakított modellek esetében is igaz. Számos cikk foglalkozik az irodalomban a modellek tökéletesítésével. A cél olyan hámot létrehozni in vitro, amely szerkezetében, funkcionálisan és farmakológiai reakcióiban is megegyező a normál in vivo hámmal. A medium összetételének változtatásával [lipid (24), EGF (6)], különböző dermális komponens felhasználásával [kereszt kötött kollagén glükóz amino glukán GAG (33), DED (10), Fb gel (27), kollagén szivacs (22)], a páratartalom csökkentésével (27) történtek ilyen irányú kísérletek, melyek mindegyike azon kívül, hogy tökéletesítette a modellt, egyben gyarapította tudásunkat az epidermális differenciációról.

A sejtek eredete is befolyásolja a kialakult hám szerkezetét. A legtöbb közlemény újszülött fitymabőrrel származó humán keratinocitákat használ. Azon kevés közlemény, amely a keratinociták eredete szerint összehasonlításokat végez a modellekkel vagy tumorból, vagy beteg bőrből (1, 19) származó sejteket alkalmazott. Azonos faj különböző életkorú egyedeiből származó modellek összehasonlításáról nincs tudásunk. Megfigyelésünkhöz

hasonló adatokat, miszerint a ÚKC vastagabb, de szerkezetében hasonló hámot eredményez, mint a FKC még nem közöltek.

A fibroblasztok eredetének jelentőségére a hám differenciálódásában már néhány szerző felhívta a figyelmet. Többnyire betegségből származó fibroblasztokat [psoriasis (8), scleroderma (32)] hasonlítottak össze egészséges fibroblasztokkal. Wilson (36) közölt a mienkhez hasonló nem várt eredményt, miszerint a 3T3 fibroblasztok a differenciálódási markereket tekintve a normál hám szerkezetéhez közelebb álló hámot hoznak létre a fölöttük differenciálódó keratinocitákból, mint a humán fibroblasztok. A 3T3 fibroblasztokat tartalmazó modellek hámja ugyan a He-festéssel megfigyelt szerkezet, KTG és K10 expressziót tekintve megfelel a normál hámnak, a másik két marker (K14, K16) vizsgálva már ettől eltér. A normál hámokban a K5/K14 a suprabazális rétegben átadja a helyét a K1/K10-nek. A keratin profil váltás módja és funkciója nem ismert (33). Ez a váltás egyik vizsgált modellben sem figyelhető meg. A K16 proliferáló hám suprabazális rétegére jellemző keratin, amely a normál hámokban is expresszálódik; fokozott expressziója fokozott proliferációt, akantózist, hiperkeratózist eredményez transzgen egéren (34). Ez a keratin valamennyi modell suprabazális rétegében kimutatható volt [az itt nem dokumentált adatok megegyeznek a korábbi közleményünkben bemutatottakkal

(28)]. A K16 jelenléte jelzi, hogy a keratinociták in vitro sokkal kifejezettebb proliferációs stádiumban vannak, mint a normál hámban in vivo. Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a kultúrák fenntartásához használt mediumok számos proliferációt serkentő anyagot (EGF, hydrocortison stb.) tartalmaznak, melyek a differenciálódásra is hatnak. Az EGF-ről kimutatták, hogy egy nukleáris protein indukciója révén fokozza a K6 és K16 gének transzkripcióját (13). Éppen ezért, újabb vizsgálatok az EGF kihagyását javasolják a bőr-ekvivalens modellek médiumaiból (7), ezáltal vastagabb, szabályosabb szerkezetű hámoskat tudtak létrehozni.

A fibroblasztok epidermalis differenciációt befolyásoló hatása korábbi in vitro (24) és in vivo (10) vizsgálatokból is kitűnik (5). A bőr-ekvivalens modell dermális komponense fibroblasztok nélkül csak néhány rétegű, vékony, rendezetlen szerkezetű hámos eredményez (20, 22). A szerzők nagyobbik része megegyezik abban, hogy élő vagy élettelen fibroblasztok jelenléte fontos a hám differenciálódása, a bazálmembrán produkciója (14) szempontjából. A keratinociták differenciálódását számos jól és kevésbé ismert tényező befolyásolja: Ca^{++} -koncentráció (4), hormonok (11, 17), az extracelluláris mátrix, a bazális membrán minősége (3) és citokinek (13). Nincs adat arra, hogy fibroblasztok direkt módosítanak, emelnék a hám Ca -koncentrációját. A retinoid koncentráció csökkenése in vitro körülmények között a keratinociták differenciálódásához vezet. A hámoshoz jutó medium retinoid koncentrációja csökkenhetne a fibroblasztok retinoid felhasználása révén. Kimutatták, hogy a fibroblasztok típusa befolyással van a retinoid hatás kialakulására; a fölöttük elhelyezkedő epidermisz bizonyos eredetű fibroblasztok esetében kevésbé érzékeny a retinoidra (15). Esetünkben nem valószínű, hogy ez játszana döntő szerepet a megfigyelt eltérésekben, mert ekkor a hámosdifferenciálódásra hatással kellene lennie a fibroblasztok koncentrációjának. Ezt azonban itt nem közölt kísérleteink nem támasztották alá. Ugyancsak nem támasztotta alá ezt a

lehetőséget az a tény sem, hogy 3T3 és humán fibroblasztok különböző arányú keverékét alkalmazva a humán fibroblasztok már alacsony koncentrációban is megakadályozták a 3T3 fibroblasztok differenciáltabb hámos létrehozó hatásának érvényesülését (az adatokat a közlemény nem tartalmazza). Ezek a megfigyeléseink nem támogatják a retinoid konzumpciós teóriát, de alátámasztják Wilson feltételezését, miszerint a 3T3 Fb által termelt citokinek összetétele a döntő (36).

A fibroblasztok számos citokint termelnek, melyek jelentős része hatással van a specifikus citokin receptorral rendelkező keratinocitákra. A fibroblaszt növekedési faktor (FGF) például, szükséges a keratinociták normális morfogeneziséhez (35). A keratinocita növekedési faktor (KGF) a FGF családban tartozik, mitogén a keratinocitákra, és újabb adatok szerint a differenciálódásukra is hat (12), de a keratin gének expresszióját nem befolyásolja (18). Számos gyulladáscsökkentő citokin befolyásolja a termelődését (IL1, PDGF, IL6, TGF alfa) (5). A transzformáló növekedési faktor (TGF)-beta a keratinocita VII típusú kollagén szintézisét fokozza (16), ezzel az egyik legfontosabb citokin a bazális membrán összerendeződésében és az epidermalis mezenchimális interakciók szabályozásában. Hat a mezenchimális mátrix akkumulációjára, de egyéb citokinek (bázikus fibroblaszt növekedési faktor, TGF-alpha, insulin like növekedési faktor I) ezt a hatást módosítják. Az extracelluláris mátrix kialakításában a citokinek egyensúlya fontos (9).

A fibroblasztok nemcsak a citokin produkcióval, hanem extracelluláris mátrix képzésével is befolyásolják a keratinociták fejlődését, mivel azok mellett hozzájárulnak a bazálmembrán komponenseinek szintéziséhez is (21). Ennek összetétele pedig befolyással van a keratinociták integrin expressziójára (29), ezen keresztül a differenciálódásukra.

A 3T3 sejtek véleményünk szerint olyan egyensúlyban produkálnak citokinek és olyan összetételű extracelluláris mátrixot hoznak létre, mely kedvező a keratinociták

differenciálódására. A 3T3 egér fibroblasztok hatása egyaránt érvényesült az újszülött és a felnőtt keratinocitákon is. Ezek a kísérleteink alátámasztják a fibroblasztok jelentőségét az epidermalis differenciációban.

Az egér fibroblasztok által irányított kedvező keratinocita differenciálódás a háromdimenziós modellben nemcsak a hárommodell tökéletesítésének lehetőségeit veti fel, hanem utat mutat a hám differenciációt befolyásoló tényezők tanulmányozásához is. A fibroblasztok hatása a hám differenciálódásra a kötőszöveti sejtek lehetséges patogenetikai szerepére hívja fel a figyelmet a keratinizáció zavarával járó bizonyos betegségekben (pl. psoriasisban).

Köszönetnyilvánítás

A kísérletes munka az Allergan-Herbert Laboratories Irvin, CA, USA anyagi támogatásával készült.

IRODALOM

1. *Amsellem C. és mtsai:* Acta Derm Venereol. (Stockh.) 73, 262 (1993)
2. *Bell EB, Ivarson B, Merrill C.:* Proc Natl Acad Sci USA 176, 1274 (1979)
3. *Bohnert A. és mtsai:* Cell Tissue Res 224, 413 (1986)
4. *Boyce ST, Ham RG.:* J Invest Dermatol (Suppl) 81, 33s (1983)
5. *Chedid M. és mtsai:* J Biol Chem 269, 10753 (1994)
6. *Chen CS. és mtsai:* J Invest Dermatol 104, 107 (1995)
7. *Chen CS, Lavker RM, Jensen PJ.:* J Invest Dermatol 102, 639 (1994)
8. *Coulomb B, Dubertret L.:* Pathol Biol 40, 139 (1992)
9. *Davidson JM, Zoia O, Liu JM.:* J Cell Physiol 155, 149 (1993)
10. *Fartasch M, Ponc M.:* J Invest Dermatol 102, 366 (1994)
11. *Fuchs E, Green H.:* Cell 25, 617 (1981)
12. *Guo L, Yu QC, Fuchs E.:* EMBO J 12, 973 (1993)
13. *Jiang CK. és mtsai:* Proc Natl Acad Sci USA 90, 6786 (1993)
14. *Kangesu T. és mtsai:* Br J Plast Surg 46, 401 (1993)
15. *Kautsky MB, Fleckman P, Dale BA.:* J Invest Dermatol 104, 546 (1995)
16. *König A, Bruckner-Tuderman L.:* Lab Invest 70, 203 (1994)
17. *Kopan R, Traska G, Fuchs E.:* J Cell Biol 105, 427 (1987)
18. *Latkowski JM, Freedberg IM, Blumenberg M.:* J Dermatol Sci 1, 36 (1995)
19. *Lenoir MC, Bernard BA.:* Skin Pharmacol 3, 97 (1990)
20. *Lillie JH, MacCallum DK, Jepsen A.:* J Invest Dermatol 90, 100 (1988)
21. *Marinkovich MP. és mtsai:* Dev Dyn 197, 255 (1993)
22. *Maruguchi T. és mtsai:* Plast Reconstr Surg 93, 537 (1994)
23. *Mitsuhashi Y és mtsai:* J Dermatol Sci 5, 3 (1993)
24. *Nolte CJ. és mtsai:* Arch Dermatol Res 285, 466 (1993)
25. *Perkins W. és mtsai:* J Cutan Pathol 19, 476 (1992)
26. *Regnier M, Asselineau D, Lenoir MC.:* Skin Pharmacol 3, 70 (1990)
27. *Regnier M. és mtsai:* Skin Pharmacol 5, 49 (1992)
28. *Remenyik É, Davies PAJ, Duvic M.:* Bőrgyógy Vener Szle 71, 19 (1995)
29. *Robert M. és mtsai:* Cell Biol Toxicol 10, 361 (1994)
30. *Rugg EL. és mtsai:* Genes Dev 8, 2563 (1994)
31. *Saintigny G. és mtsai:* Acta Derm Venereol (Stockh.) 73, 175 (1993)
32. *Serpier H. és mtsai:* Pathol Biol 40, 865 (1992)
33. *Steiner PM, Marekov LN, Parry DA.:* Biochemistry 32, 10046 (1993)
34. *Takahashi K, Folmer J, Coulombe PA.:* J Cell Biol 127, 505 (1994)
35. *Wener RL, Williams LT.:* EMBO J 12, 2635 (1993)
36. *Wilson JL. és mtsai:* Cell Growth Differentiation 3, 471 (1992)

Érkezett: 1995. 11. 28. Közlésre elfogadva. 1996. 01. 30.