

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

Bőr-ekvivalens modell

Skin-equivalent model

REMENYIK ÉVA DR, PETER JA DAVIES* DR,
MADELEINE DUVIC** DR

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők *in vitro* bőr-ekvivalens modellt készítettek és immunoperoxidáz módszerrel vizsgálták a keratinocita differenciálódási markerek (keratin 10, 14, 16, keratinocita transzglutamináz és involucrin) megjelenését a modellben, összehasonlítva azt a normál és psoriasisos lézióból származó biopsziás anyaggal. Megállapították, hogy a modell hámja a vizsgált markerek expresszióját tekintve a hiperproliferációs psoriasisos hámra hasonlít.

Kulcsszavak:

keratinocita – bőr-ekvivalens modell –
immunoperoxidáz módszer

SUMMARY

In vitro skin equivalent was fabricated. The appearance of the markers for keratinocyte differentiation (keratin 10, 14, 16, keratinocyte transglutaminase, and involucrin) was analyzed by immunoperoxidase method and was compared to the normal and the psoriatic lesional biopsies. It was found, that the epidermis of the skin equivalent model resembles psoriatic epidermis in terms of expressions of proliferation markers.

Key words:

keratinocyte – skin equivalent model –
immunoperoxidase method

A bőr számos sejtféleségből álló összetett funkciójú szerv, melynek speciális szerkezetéért és működéséért nagyrészt a hámréteg 90%-át alkotó keratinociták felelősek. Reinwald és Green munkássága során vált lehetővé a keratinociták *in vitro* tenyésztése (28, 29). Ez széles távlatokat nyitott a funkcionális, morfológiai és gyógyszer kutatásoknak. Az osztódásukban gátolt egér fibroblaszt sejtekre rétegezett, tripszinnel izolált hámsejtek, növekedési faktorokkal, hormonokkal (epidermal growth factor, glucocorticoid, insulin stb), kiegészített aminosavakat, ionokat, szérumot tartalmazó tápfolyadékban gyorsan osztódnak. Az osztódásra képes ke-

ratinociták a hám bazális sejtrétegét reprezentálják, néhány hét alatt összefolyó hámsejt réteget alkotnak, melyből az egér fibroblasztok kipsztlulnak és a keratinociták jelentős része differenciálódásnak indul. Néhány rétegű epidermisz-lemez képződik a tenyésztő edény alján (15). A differenciálódás indukálható és mértéke fokozható a szérum A vitamin tartalmának csökkentésével (14, 16). A keratinociták fibroblaszt tápláló réteg nélküli, alacsony Ca tartalmú médiumban történő tenyésztésének kidolgozásával (6) párhuzamosan növekedtek ismereteink a keratinocita differenciálódást befolyásoló tényezőkről. A konvencionális tenyésztés során azonban, a

* Előadás formájában elhangzott a „Szodoray Emlékülés”-en Debrecen 1994. szept. 29–okt. 1.

differentiálódást elősegítő körülmények között is a hám csak néhány szabálytalan rétegből áll, mely differentiálódási marker expressziója (keratinok, involucrin, keratinocita transzglutamináz, filagrin stb) jelentősen eltér az in vivo hámétól (14). Ennek ellenére az így tenyésztett hámsejtek alkalmasak a hám differentiálódás, funkciók vizsgálatára és gyakorlati hasznuk is van, mert donoronként szolgálhatnak ulcus cruris, égés utáni sebek fedésére. (7, 8, 18, 26, 31, 32, 37)

A törekvések, hogy szerkezetileg és funkcionálisan is az in vivo hámhoz hasonló modellt alakítsanak ki, az utóbbi évtizedekben megvalósíthatónak látszanak. Az ez irányú kutatásokat különösen a gyógyszergyárak finanszírozták, mivel ezek a bőr ekvivalens modellek lehetőséget teremtenek a drága és sokszor támadott állatkísérletek részbeni helyettesítésére.

A modellek, a háromdimenziós hámszerv kultúrák kidolgozását az a felismerés tette lehetővé, hogy a két dimenziós hámlemezt a levegő/tenyésztő folyadék határra emelve ez az in vivo körülményekhez igen hasonló miliót teremt. A hám alulról kapja a táplálékot, mely a dermalis rétegen átdiffundálva éri el a hámot, aminek felső sejtjei a levegővel érintkeznek (19). Az arteficiális bőr mint egy tutaj (raft) a felületen úszik. Ez a körülmény a hám még jobb differentiálódását teszi lehetővé (23). Bár a pontos mechanizmus nem ismert, feltételezik, hogy a hámban kialakult csökkenő retinoid koncentráció-grádiens felelős a változásokért (21).

A modell, hámból és az alatta elhelyezkedő, azt mechanikusan és kémiaiilag támogató, az írha feladatait betöltő részből áll. A dermalis ekvivalens kialakítására több lehetőség van.

Kezdetben kollagénből készített gélt használtak, nyilvánvalóvá vált azonban, hogy a hám nem sokkal rétegezettebb, mint a médiummal elárasztott kultúrák esetén, ha a kollagén nem tartalmaz fibroblasztot.

Bell és mksai tanulmányozták, hogy a szolubilis kollagénnel összekevert fibroblasztokból képződött gél a gélle alakulás után néhány órával megkisebbedik, kontrahál. Ezért a jelenségért a fibroblasztok a felelősek, melyek új kötőszöveti matrix anyagok képzésével reorganizálják a gélt, mely így alkalmas

dermalis ekvivalensként (19). Hasonló módon létrehozott arteficiális bőrt az Organogenesis Inc. kereskedelmi forgalomba is hozta Testskin LSE néven. Több laboratórium kis módosításokkal használja ezt a módszert (1, 2, 24).

Egy korábbi, széles körben elterjedt lehetőség élő vagy kadaverből származó bőr hámjának eltávolítása után a dermiszt vagy irradációval vagy hőkezeléssel devitalizálni, és így használni a keratinociták rétegezésére, vagy biopsziás anyagok hámjának további expansziójára (17, 27).

Az utóbbi években dolgozták ki a fibroblasztok háromdimenziós tenyésztését, mely szintén alkalmas dermalis ekvivalens céljaira (9, 33).

Az előzőekben ismertetett modellek akkor eredményeztek jól differentiálódott hámot, ha a hám alatt a tenyésztetben fibroblasztok is jelen voltak. Ez felhívta a figyelmet a fibroblasztok hám differentiálódását kedvezően befolyásoló szerepére és lehetőséget adtak ennek tanulmányozására (10).

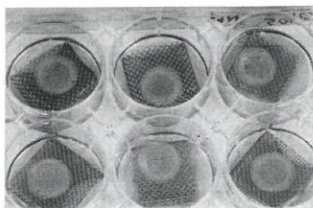
Bár 1990-ben Rosdy (30) közölt háromdimenziós hámkultúrát kémiaiilag meghatározott összetételű médiumban fibroblasztok nélkül, más kutatók ezt még nem erősítették meg.

Az általunk alkalmazott módszer, a Bell féle eredeti leíráshoz áll közel (3). Lényege, hogy a kollagén gélbe inkorporált fibroblasztokra tenyésztett hámsejteket rétegezzünk és a folyadék levegő határon kellő differenciáltság eléréséig tartjuk. A közleményben ezt a módszert és az in vitro modellt hasonlóságát a normál biopsziás hámhoz kívánjuk bemutatni.

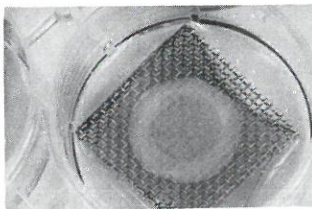
Anyag és módszer

Keratinocita tenyésztés monolayerben:

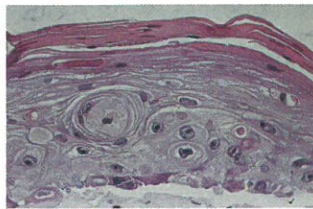
Újszülött fityma bőrt a subcutan zsírszövettől megszabadítva, kb 3 mm-es darabokra vágva 4 C°-os 0,25% tripszinben egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően a hámot az írharól könnyen lehúztuk és a tripszinben szuszpendálva izolált hámsejtekre választottuk, melyeket 1×10^6 koncentrációban 3×10^6 mitomycinnel kezelt 3T3 egér fibroblaszt sejttel egy T-75 tenyésztőedénybe FAD médiumba (DMEM és Hams' F-12 3:1 arányban, kiegészítve 10% fetal bovin serum (FBS) 400 ng/ml hidrokortizon, 10–10 M choleratoxin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 0,089 mM adenin,



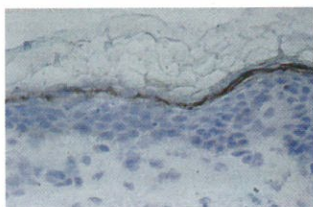
1. ábra
Bőr-ekvivalens modellek
6 lyukú lemezben



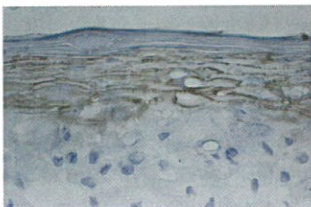
2. ábra
Egy modell közelebbről



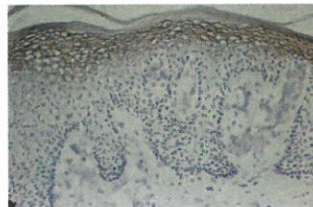
3. ábra
14 napos modell paraffinba
ágyazott keresztmetszete
(hematoxilin eosin (HE)
festés, 400x)



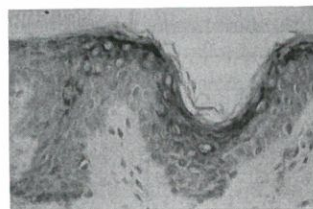
4. ábra
Normál bőr, kriosztát metszet,
immunoperoxidase (IP) festés
keratinocita transzglutamináz
antitest (Ab), 200x



5. ábra
Modell újszülött keratinocita
és fibroblasztból, kriosztát
metszet, IP festés, keratinocita
transzglutamináz Ab, 400x



6. ábra
Psoriasis, kriosztát metszet,
IP festés, keratinocita
transzglutamináz Ab, 200x



7. ábra
Normál bőr, paraffinba
ágyazott metszet, IP festés,
involucrin Ab, 400x



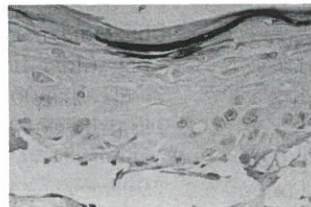
8. ábra
Modell újszülött keratinocitából
és fibroblasztból, paraffin
metszet, IP festés, involucrin
Ab, 400x



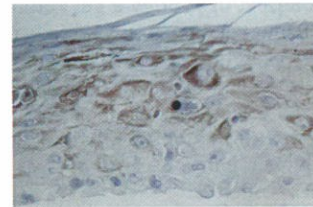
9. ábra
Psoriasis, paraffin metszet.
IP festés, involucrin Ab, 200x



10. ábra
Modell újszülött keratinocitából
és fibroblasztból, paraffin
metszet, IP festés, keratin 14
Ab, 400x



11. ábra
Modell újszülött keratinocitából
és fibroblasztból, paraffin
metszet, IP festés, keratin 10
Ab, 400x



12. ábra
Modell újszülött keratinocitából
és fibroblasztból, paraffin
metszet, IP festés, keratin 16
Ab, 400x

292 ug/ml glutamin, 0,105 IU/ml insulin, transferin, 1% Fungibact) helyeztünk. A medium heti három alkalommal volt cserélve. Konfluens tenyészet elérése után a tripszin+EDTA segítségével felszedett keratinocitákat KGM mediumba 3T3 sejtek nélkül tenyésztettük tovább.

Fibroblaszt tenyésztés:

Az újszülött fitymabőr dermiszéből néhány apró darbot szövettenyésztő petri csésze aljára helyeztünk, amit négy sarkán vazelinezett fedőlemezzel fedtünk és 10% FBS-t tartalmazó DMEM-mel hetente háromszor tápláltunk, kb 3 hét múlva a dermiszből a fibroblasztok kinőttek és betérítették a tenyésztőedény alját. Ekkor feltripszinizálva a fibroblasztokat monolayerként tenyésztettük tovább.

Bőr-ekvivalens modell:

1. nap. dermális komponens előkészítése (kollagen gél készítése):

jégen 10x DMEM, FBS, antibioticum, antimycoticum, NaOH keverékéhez solubilis patkányfarkból származó kollagen I oldatot (Collaborative Biochemical Products) adtunk, majd $1-2 \times 10^5$ /ml gel végkoncentrációban fibroblasztokat (3–5 passage) kervertünk hozzá. 24 lyukú lemez mélyedéseibe töltöttünk egy-egy ml-t, majd 37 °C-os inkubátorba helyeztük amíg meg nem szilárdult, ekkor DMEM FBS mediumot rétegeztünk rá. Visszahelyeztük az inkubátorba.

2. nap. epidermális komponens készítése.

A monolayer tenyészetből a keratinocitákat (3–4 passage) feltripszinezítettünk és FAD mediumban reszuszpendált 5×10^5 keratinocitát helyeztünk minden egyes gél tetejére, miután eltávolítottuk a fibroblaszt médiumot. 24 órán át inkubáltuk.

3. nap. A gél tetejéről a FAD médiumot óvatosan leszívtuk, majd a gél kiemelve a 24 lyukú lemez mélyedéséből 6 lyukú lemez mélyedésében elhelyezett rozsdamentes, lábakon álló rácstra tettük, úgy, hogy a gél keratinocitákat tartalmazó teteje legyen továbbra is felül. Hetente 3x úgy cseréltük a FAD médiumot, hogy az csak a dermális komponest érje, a hám a levegővel érintkezzen, táplálékot, csak alulról a dermiszen keresztül kapjon (1. 2. ábra). 14–21 napon hasonlóan bármely bőrbíopsziás anyaghoz, felhasználhattuk.

A modellek felhasználása:

A kb 1 cm átmérőjű bőrekvivalens modelleket a 14–21 napon fixáltuk. Minden egyes anyag 1/3-át OCT-be ágyaztuk, folyékony nitrogén fagyasztást követően 4 µ-os kriosztát metszeteket készí-

tettünk poly-L lisinnel kezelt tárgylemezre. Az anyagok másik harmadát folyékony nitrogén fagyasztás után -70 °C-on tároltuk molekuláris biológiai feldolgozás céljából. Végül 1/3-át paraformaldehidben fixáltuk és paraffinba ágyazva metszet készült belőle, mely mindegyikét hematoxilin eosinnal festettük. Kontrollként felnőtt normál és psoriasisos lézióból származó bőrbíopsziás anyagot használtunk, mely hasonló módon volt fixálva.

Immunohistokémia:

Keratinocita transzglutaminase (KTG) (BC 1 ajándék Scott Tachertől), Keratin 14, keratin 10, keratin 16 (Irene Leightól), involucrin (kereskedelmi) antitestek és DAKO LSAB kit felhasználásával immunoperoxidáz festést végeztünk a protokollban leírt módon DAB kromogén felhasználásával, a háttérfestéshez hematoxilin I-et használtunk.

Eredmények

A modell hisztológiai metszetén (3. ábra) hematoxilin eosin festéssel látható, hogy a transzparens, kevés fibroblasztot tartalmazó irha fölött egyenes határral elkülönülve többretegű elszarusodott laphám van, mely rétegezetsége kissé szabálytalanabb, mint az előbből származó hámé. A stratum granulosum megfigyelhető, a szarurétegben parakeratózis van.

A differenciálódási markereket tekintve a KTG a normál hámban (4. ábra) a granuláris rétegben van jelen, míg a modellben (5. ábra) már a suprabasalis rétegben megjelenik, hasonlóan a psoriasisos hámhoz (6. ábra). Az involucrin a normál hámban a granuláris rétegben és a str. spinosum ahhoz közeli rétegeiben látható. Psoriasisban (9. ábra) a KTG-hez hasonlóan, az alsóbb rétegekben jelenik meg, míg a bőrekvivalens modellben (8. ábra) szinte az egész hám területén festődést mutat. A bazális sejtekre jellemző keratin 14 expresszió a modell hámjának minden rétegében megmarad (10. ábra). A fő differenciálódási marker, a keratin 10 ezen in vitro körülmények között a suprabasalis réteg felső sejtsoraiban jelenik meg (11. ábra). Az előbből származó normális viszonyok között nem expresszáldó keratin 16 a raftban bazális réteg fölött jelenik meg (12. ábra) és megmarad a felsőbb rétegekben is.

Megbeszélés

A monolayerben tenyésztett keratinociták és az in vivo kimetszett bőrből származó hisztológiai metszettel összehasonlítva a bőr ekvivalens modell hámja a normál hámhoz szerkezetileg sokkal közelebb áll, annak ellenére, hogy a különbségek, már HE festés mellett is nyilvánvalóak (3. ábra) (papilláritás hiánya, kisebb fokú rendezettség, parakeratozis).

A keratinociták differenciálódása során a sejtek által szintetizált fehérjék minősége és mennyisége a differenciálódás fokától függően eltérő és arra jellemző, immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálható. A differenciálódási markerek felhasználása részletesebb összehasonlítást tesz lehetővé.

A legjelentősebb változás, mely mutatja, hogy a sejt elindult a differenciálódás felé, a nagy molekulasúlyú K1 és K10 megjelenése a basalis sejtekre jellemző K5 és K14 helyett (13). A HE festéssel az élőből származó hámra nagyon hasonlító modellben a K14 expressziója (10. ábra) nemcsak a basalis rétegre lokalizálódik, hanem a hám egészében megmarad, a keratin 10 (11. ábra) pedig később jelenik meg. Ugyancsak eltér a K16 megjelenése is. Ez a hiperproliferációs keratinnak is nevezett keratin a normál hámokban nem található meg, viszont gyorsabban proliferáló hámokban (sebgyógyulás, psoriasisos lézió hámja) a suprabasalis rétegtől jelen van. A K16 antitesttel a modell bazális sejtjeit kivéve minden sejt mutat festődést (12. ábra), mely jelzi a hiperproliferációs állapotot.

A hiperproliferációs hámra jellemző elrendeződést mutatja a modellben a KTG (5. ábra) és involucrin (7. ábra) expressziója is. A KTG a keratinocitákra jellemző transzzglutamináz, membránhoz kötött fehérje, mely szubsztrátjaiból (involucrin, loricin, cornifin stb) a keratinocita differenciálódásra jellemző enzimatis bontásnak, kémiai oldószereknek ellenálló burkot (cornified envelop) hoz létre (36), mely fontos jellemzője a differenciálódásnak (12). A normál bőrben a KTG a granularis rétegben, az involucrin a granularis és a szuprabazális réteg külső részében van jelen. Psoriasisban mindkettő a hám alsóbb rétegeiben jelenik meg. Összehasonlítva ezen markerek festődését a psoriasisos

bőrben megfigyelttel, megállapítható, hogy a differenciálódási markereket tekintve a modell morfológiailag közelebb áll a hiperproliferációs hámokhoz, mint a normálhoz.

Ezen eredmények összhangban vannak az irodalmi adatokkal (2, 20), miszerint a modellek morfológiailag a sebgyógyulás és a psoriasisos lézió hámjára emlékeztetnek. Ez részben magyarázható azzal, hogy az in vitro körülmények között hiányzik a kontakt gátlás és a tápfolyadékok proliferációt serkentő anyagokat tartalmaznak. A modell és az élő bőr nyilvánvaló különbségeit tekintve is ez a szerv-kultúra a bőrgyógyászati kutatások fontos eszköze. Alkalmas gyógyszerek farmakológiai hatásának (20), a bőr barrier funkciójának (25, 35), a differenciálódás folyamatának (1, 9) és a fibroblaszt-keratinocita interakció (5, 11, 34) tanulmányozására, valamint a kórképek modellezésére (22). A bőr-ekvivalens modellek alkalmazása egy lépéssel közelebb vitte az in vitro kutatásokat az in vivo viszonyokhoz.

IRODALOM

1. Asselineau D. és mtsai: *Dermatol.* 86, 181 (1986)
2. Asselineau D., Bernard BA., Darmon M.: *Models Dermatol.* 3, 1 (1987)
3. Bell E., Ivarson B., Merrill C.: *Proc Natl Acad Sci USA* 176, 1274 (1979)
4. Bell E. és mtsai: *J Biomechanical Engineering* 113, 113 (1991)
5. Bohnert A. és mtsai: *Cell tissue Res* 224, 413 (1986)
6. Boyce ST., Ham RG.: *J. Invest. Dermatol.* 81, (suppl), 33s (1983)
7. Boyce ST., Hansborough JF.: *J. Invest. Dermatol.* 88, 479 (1987)
8. Carver N., Leigh IM.: *Int. J. Dermatol* 30, 540 (1991)
9. Contard P. és mtsai: *J. Invest. Dermatol* 100, 35 (1993)
10. Coulomb B., Dubertret L.: *Path. Biol.* 40, 139 (1992)
11. Coulomb B., Lebreton C., Dubertret L.: *J. Invest. Dermatol.* 92, 122 (1989)
12. Diwic M. és mtsai: *J. Invest. Dermatol.* 102, 462 (1994)
13. Fuchs E., Green H.: *Cell* 19, 1033 (1980)
14. Fuchs E., Green H.: *Cell* 25, 617 (1981)
15. Green H.: *Tudomány* 1, 54 (1992)
16. Green H., Kehinde O., Thomas J.: *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 5665 (1979)
17. Heenen M. és mtsai: *Cell Prolif* 25, 311 (1992)
18. Hunyadi J. és mtsai: *Bőrgyógy. Vener. Szemle* 62, 141 (1986)
19. Karasek M. A., Charlton M. E.: *J. Invest. Derm.* 56, 205 (1971)

20. Kopan R., Fuchs E.: J. Cell. Biol. 109, 295 (1989)
21. Kopan R., Traska G., Fuchs E.: J. Cell. Biol. 105, 427 (1987)
22. Krueger GG., Jorgensen CM.: J. Invest. Dermatol. 95, 56S (1990)
23. Lillie JH., MacCallum DK., Jepsen A.: J. Invest. Dermatol. 90, 100 (1988)
24. Mackenzie IC., Fusenig NE.: J. Invest. Dermatol. 81, 189s (1983)
25. Mak VH. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 96, 323 (1991)
26. Parenteau NL. és mtsai.: J. Cell. Biochem. 45, 245 (1991)
27. Pruneiras M., Regnier M., Woodley D.: J. Invest. Dermatol. 81, 28 (1983)
28. Rheinwald JG., Green H.: Cell 6, 317 (1975)
29. Rheinwald JG., Green H.: Cell 6, 331 (1975)
30. Rosdy M., Clauss LC.: J. Invest. Dermatol. 95, 419 (1990)
31. Rowling PJE. és mtsai.: Biomaterials 11, 181 (1990)
32. Sebők B. és mtsai.: Bőrgyógy. Vener. Szemle 68, 153 (1992)
33. Slivka SR. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 96, 544A (1991)
34. Slivka SR. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 98, 621A (1992)
35. Slivka SR. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 100, 40 (1993)
36. Thacher SM., Rice RH.: Cell 40, 685 (1985)
37. Wassermann D. és mtsai.: Burns 14, 326 (1988)