

Т.Г. РУКША, М.Б. АКСЕНЕНКО, А.В. КОМИНА, Н.В. ПАЛКИНА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДЕРМАТОЛОГИЯ ДЛЯ НАЧИНАЮЩИХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ



Москва

Издательство «Литтерра»

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
Введение	5
Глава 1. Иммуно- и гистохимия в дерматологии	6
Глава 2. Методы исследования на основе культур эукариотических клеток	27
Глава 3. Моделирование заболеваний кожи <i>in vivo</i>	64
Глава 4. Экспериментальные модели отдельных заболеваний кожи	76
Глава 5. Полимеразная цепная реакция и ее применение в экспериментальной дерматологии	103
Глава 6. Секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты и его разновидности	137
Глава 7. Микрофлюидика	158
Глава 8. Микрочипирование как высокопроизводительный метод исследования в дерматологии	161
Список литературы	172

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ *IN VIVO*

Для лучшего понимания механизмов развития любого дерматологического заболевания, а также для разработки средств эффективной терапии прибегают к воссозданию биологических моделей кожных заболеваний на лабораторных животных.

РАЗНОВИДНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Инбредная линия — совокупность генетически однородных животных, размножаемых инбридингом (братско-сестринским скрещиванием) на протяжении не менее 20 поколений. Примером может быть модель меланомы кожи B16, которая воссоздается на мышах инбредной линии C57Bl6.

Нокаутная линия — линия животных, у которых заблокирован («нокаутирован») определенный ген в ДНК. Например, использование в работе мышей, нокаутных по гену десмоглеина-3, для моделирования пузырчатки.

Трансгенная линия — линия животных, которая в своем геноме имеет привнесённый фрагмент чужеродной ДНК. В качестве примера можно выделить трансгенных мышей, содержащих промотор эластина человека. Данная модель максимально точно иллюстрирует изменения, происходящие в коже при фотостарении.

Линейные или инбредные животные обладают рядом преимуществ по сравнению с нелинейными. Главное преимущество таких животных — их генетическая однородность, гарантированно обеспечивающая воспроизводимость результатов экспериментов.

Конвенциональные животные — это животные, слабо защищенные от проникновения инфекционных агентов, имеющие естественную нормофлору. Животные данной категории обладают врожденным и приобретенным иммунитетом. Содержатся в конвенциональном (обычном) виварии.

Гнотобиоты (безмикробные) животные — полученные методом гистерэктомии (у самок на последних сроках беременности), в даль-

нейшем особи помещаются в стерильные условия. Данные животные обладают только врожденным иммунитетом.

SPF категория (от англ. Specific pathogen free) — это разновидность животных, свободных от специфической патогенной микрофлоры. Биомодели подобной категории получают часто через стадию гнотобиотов. Подобных животных категорически запрещается содержать в обычных конвенциональных условиях, так как у них практически отсутствует приобретенный иммунитет.

ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

Качество экспериментального моделирования напрямую зависит от особенностей лабораторных животных, технологий их производства и организации биомедицинского эксперимента.

Размещение лабораторных животных

1. Всех животных, которые используются для экспериментального моделирования, располагают в клетках согласно групповой принадлежности. Возможно размещение животных в индивидуальных клетках. Последнее является особенно актуальным, если они начинают проявлять агрессию по отношению друг к другу. Подобная реакция часто возникает у животных с язвенными дефектами на коже. Следует отметить, что наибольшую агрессию проявляют особи мужского пола. Если животные демонстрируют поведенческие реакции, имеющие угрожающий характер, то их необходимо содержать в отдельных клетках. Разнополые животные располагаются также раздельно.

Индивидуальные клетки имеют преимущество в том, что в них можно организовать должным образом режим кормления и поения. Размеры клеток подбираются индивидуально исходя из следующих характеристик: вид животных, тип биомодели, длительность эксперимента.

Для содержания трансгенных животных следует соблюдать стерильные условия. Поскольку они обладают иммунодефицитом, различные вирусы, экто- и эндопаразиты представляют для них реальную опасность. Для содержания мелких иммунодефицитных животных используются вентилируемые клетки-изоляторы для сохранения их SPF-статуса.

2. Прием животных в виварий производится только при наличии ветеринарного свидетельства (форма 1) или сопроводительных документов из питомника.

3. На животных, получаемых из питомника и другого хозяйства, должен быть паспорт, в котором указываются дата отправки и приема животных, вид животных, номер клетки, количество, возраст и масса животных, дата и результаты их клинического осмотра.

4. Полученные из специализированного питомника животные размещаются в изолированных секциях сроком на 3 дня для адаптации к новым условиям.

Параметры окружающей среды

Независимо от времени года, а также погодных условий вне стен лаборатории, в помещении, где содержатся экспериментальные животные, должны поддерживаться постоянные температура и влажность воздуха.

Температура. Для содержания конвенциональных животных температура в виварии не должна опускаться ниже +20 °С. Температура окружающей среды для размещения иммунодефицитных животных поддерживается не ниже +25 °С. Это значение меняется в зависимости от создаваемой биомодели.

Вентиляция. Необходимо избегать сквозняков в лаборатории. Для вентилирования помещения лаборатории, где содержатся иммунодефицитные животные, используют преимущественно систему принудительной вентиляции. Она обеспечивает 100% приток свежего воздуха. Данная система имеет три фильтра: грубой, тонкой и ультратонкой очистки.

Освещенность. В виварии, где содержатся животные, действует 12-часовой цикл освещения. Свет включается в 8 ч утра и выключается в 20 ч. Главное освещение в лаборатории обеспечивается люминесцентными лампами. Во время выполнения манипуляций с животными интенсивность освещения может увеличиваться, но не более чем до 400 лк. В виварии должен быть запасной источник электропитания.

Шум. В помещениях, где содержатся животные, фоновый шум создается самими животными, работающей вентиляцией, сотрудниками лаборатории при выполнении экспериментальных манипуляций. Уровень шума в помещении во время работы с животными не должен превышать 85 дБ. Для уменьшения шума в помещении вивария системы кондиционирования и вентиляции должны быть оборудованы шумоглушителями.

Кормление животных

1. Кормление различных видов лабораторных животных должно производиться полнорационными кормами, соответствующими стандартам «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных».

2. Диеты животных рассчитываются исходя из возраста животных. При составлении рационов питания учитываются также и генетические особенности метаболизма отдельных линий животных.

3. Корма должны храниться в сухом, чистом и хорошо проветриваемом помещении, не зараженном вредителями и дикими грызунами. Идеальной температурой окружающей среды для хранения корма является +4 °С.

Особого внимания требует *контроль качества пищи иммунодефицитных животных*. Корм иммунодефицитных животных перед употреблением должен обязательно подвергаться стерилизации в автоклаве с применением вакуума при температуре 121–124 °С, давлении 1,2 атм, в течение 20 мин. Другой вид стерилизации корма включает воздействие гамма-лучей. Гранулы корма упаковывают в 2 полиэтиленовых пакета по 1,5–2,0 кг, затем их герметично закрывают и облучают в дозе 2,5 миллирад. В помещения, где содержатся животные, корм заносится только в автоклавированном виде. Для грызунов корм засыпается в количестве, установленном исследовательским протоколом.

Особое внимание контролю поступающей пищи отводится при моделировании атопического дерматита (АД), поскольку поступающая пища служит триггерным фактором в инициации заболевания.

Вода

Для иммунодефицитных животных вода также автоклавируется и помещается в стерильные бутылочки, которые закрываются герметичными крышками и имеют трубки-носики. Смена бутылочек с водой должна производиться не реже 1 раза в 3 дня, при этом остатки воды выливаются. Для конвенциональных животных водопроводная вода подвергается кипячению без дополнительной обработки.

Подстилка

В роли подстилки используются опилки, стружка из экологически чистой древесины лиственных пород, могут использоваться специальные гранулы, обладающие гигроскопическими свойствами. Не разрешено использовать подстилки из химически обработанной древесины, а также из древесины хвойных пород. Для животных SPF-категории подстилка также автоклавируется. Смена подстилки происходит по мере ее загрязнения, но не реже одного раза в 7 дней. Клетку необходимо вымыть с дезинфицирующим средством. Данные средства подбираются индивидуально в зависимости от типа животных. После чего клетки промываются под струей проточной воды до исчезновения

мыльной пены. Далее клетки ставят вверх дном на стеллажи для сушки. На следующем этапе происходит замена чистой подстилки из расчета 0,5 л на 500 см².

Очистка и дезинфекция помещений для животных

Следует минимизировать содержание загрязняющих веществ в виварии, что достигается благодаря регулярной уборке помещения.

Влажную очистку полов в комнатах, где содержатся животные, необходимо проводить ежедневно с использованием дезинфицирующего средства. В течение рабочего времени необходимо поддерживать чистоту пола. Влажная уборка с мытьем стен, дверей проводится с использованием обеззараживающего средства. После завершения эксперимента проводят генеральную уборку помещения с применением дезинфекционного средства. В заключение уборки проводится стерилизация помещения путем фумигации формальдегидом.

Утилизация трупов животных

Трупы погибших животных размещают в полиэтиленовых пакетах и хранят в специально отведенной для этих целей морозильной камере при температуре -20°C . Трупы, которые подлежат вскрытию, хранят в холодильнике при температуре $+4-8^{\circ}\text{C}$, после чего они подлежат утилизации в установленном порядке.

Методы маркировки каждого вида

Для идентификации грызунов используются цветные метки на теле (бриллиантовый зеленый, раствор фукорцина, метиленовый синий либо специальные нетоксичные маркеры). На клетку необходимо нанести специальную идентификационную карточку, в которой следует указать данные: вид животного, линия, пол, номер клетки, тип экспериментальной модели.

Ведение лабораторного журнала

В лабораторном журнале ведется постоянный учет индивидуальных записей эксперимента.

Необходимо вносить полные данные протокола воссоздания биомодели дерматологического заболевания.

Указать дату и время начала эксперимента.

Проводить ежедневные записи дерматологического статуса животного, оценку поведенческих реакций и фиксировать любые отклонения в состоянии здоровья животных.

СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

В норме кожа занимает площадь 1,5–2,0 м² и составляет почти 15% массы тела человека (Swann G., 2010). Кожа человека и животных выполняет следующие функции.

1. Барьерную функцию (обеспечивает устойчивость к травмам).
2. Обеспечивает защиту от различных инфекций.
3. Защищает тело человека и животных от гипогидратации.
4. Участвует в регуляции температуры тела.
5. Синтезирует витамин D.
6. Позволяет ощущать тепло, холод, боль (Arda O. et al., 2014).

Всасывание многих топических лекарственных препаратов отличается у различных животных (Alikhan F.S. et al., 2011). Главным образом это обусловлено различным содержанием в коже человека и животных свободных жирных кислот и триглицеридов (Kim E.J. et al., 2010). Поэтому для тестирования лекарственных средств с трансдермальным нанесением необходимо использовать биомодели с аналогичной биодоступностью кожи для фармакологических препаратов. Например, у макаки резус чрескожная абсорбция гидрокортизона, тестостерона и бензойной кислоты аналогична человеческой коже (Wester R.C., Maibach H.I., 1975). Основные сходства и различия в коже животных и человека представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Основные сходства и различия в коже животных и человека

Сходства	Различия
Кожа свиней сходна с человеческой по: — толщине; — наличием фолликулярных структур, проникающих глубоко в толщу дермы; — хорошо развитой сети дермальных гребней и дермальных сосочков; — времени обновления эпидермиса; — обильной субдермальной жировой ткани;	• Отличия кожи свиней от кожи человека: — в коже свиней не содержится эккринных потовых желез, а в отличие от людей апокриновые потовые железы находятся на поверхности тела. • Кожа мышей: — тоньше, чем кожа человека; — отличается от человеческой по лейкоцитарному профилю (кластерам дифференцировки лейкоцитов); — по количеству и чувствительности Toll-подобных рецепторов;

Окончание табл. 3.1

Сходства	Различия
— анатомическому расположению сосудов; — структуре коллагена в дерме; — экспрессионному профилю генов в коже	— активности индуцибельной синтетазы оксида азота; — по экспрессионному профилю цитокинов и их рецепторов; — различается по механизмам Th_1/Th_2 дифференцировки и агрегирующей функции эндотелиальных клеток, секрети хемокинов и активности хемокиновых рецепторов; — отличается по механизмам передачи сигнала внутри клетки, а также по структурно-функциональным характеристикам онкогенов и генов-супрессоров; — ведущим патогенетическим звеном в репарации клеток кожи человека является механизм репарации по типу удаления и восстановления поврежденных нуклеотидных последовательностей, что нехарактерно для кожи мыши; — в коже человека меланоциты расположены в базальном слое эпидермиса, а в коже мыши меланоциты находятся у основания волосяных фолликулов в дерме и встречаются только в эпидермисе бесшерстных областей (ушей, хвоста и лап), а также на участках дермально-эпидермального соединения в определенные периоды времени (во время эмбриогенеза и в послеродовом периоде); — у животного наблюдаются последовательные волны: анаген, катаген, телоген, перемещающиеся по направлению от головы к основанию хвоста. Для человека синхронизация роста волос нехарактерна; — цикл волосяных фолликулов мыши короткий и занимает около 3 нед, тогда как у человека он продолжается несколько лет

Несмотря на различия в коже животных и человека, использование способа экспериментального моделирования дерматологических заболеваний является одним из ведущих в исследовательской работе. Данный метод применяется в том числе в экспериментальной трихологии. Наличие очень короткого цикла роста волосяных фолликулов у мелких лабораторных животных является безусловным преимуществом для исследователей. Это позволяет проводить экспериментальные работы в конкретный ограниченный период времени.

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ

Трансгенные животные необходимы для:

- 1) изучения механизмов развития заболеваний у человека;
- 2) проведения генной терапии;
- 3) исследования эффективности лекарственных препаратов;
- 4) клонирования животных;
- 5) трансплантации органов.

Трансгенных животных получают путем клонирования трансгена (чужеродной ДНК) и последующего его включения в геном недавно оплодотворенной яйцеклетки с последующим культивированием клетки до стадии бластоцисты и имплантацией эмбриона в матку суррогатной матери (Doyle A. et al., 2012) (рис. 3.1).

Для доставки гена, представляющего интерес для исследователя, в качестве мишени применяют несколько методов:

- 1) физические (микроинъекции);
- 2) механические («генная пушка», электропорация, лазерное воздействие);
- 3) химические [осаждение фосфатом кальция, диэтиламиноэтанол (DEAE)-декстраном];
- 4) биологические (липиды, вирусы, плазмиды).

Все методы получения генетически модифицированных животных применяются для создания:

- 1) трансгенных моделей;
- 2) нокаутных моделей: knock-out mice (с направленным удалением определенного гена) либо knock-in mice (с целенаправленной инъекцией трансгена в определенный участок локуса гена);
- 3) направленной инактивации генов животных методами энхансерных (Enhancer trapping) и генных ловушек (Gene trapping);
- 4) животных моделей случайного мутагенеза (при помощи контролируемого воздействия химического вещества либо ионизирующего

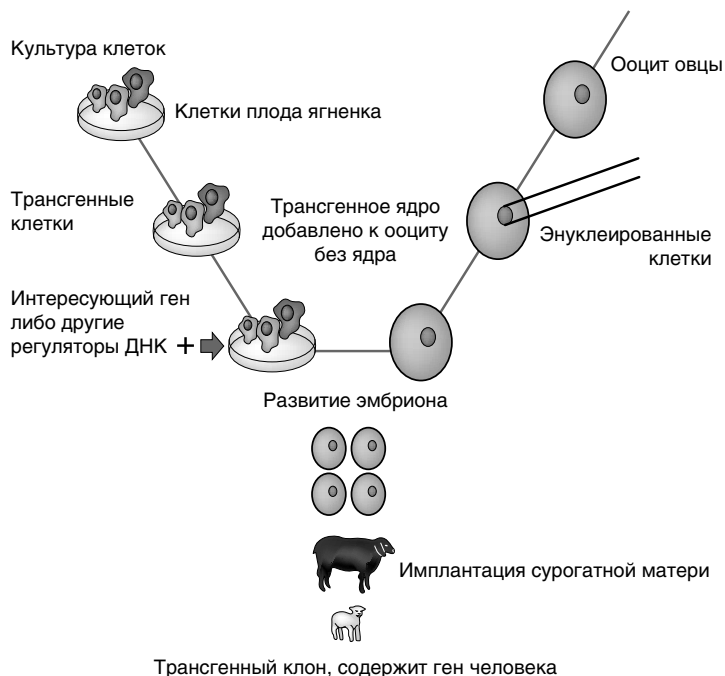


Рис. 3.1. Трансгенные животные. На рисунке схематически изображено получение трансгенного животного методом микроинъекций

излучения в геноме животного генерируются случайные точечные мутации).

Таргетные мутации моделируются посредством гомологичной рекомбинации (процесс, при помощи которого мутаген целенаправленно воздействует на точное местоположение гена в геноме) в эмбриональных стволовых клетках. В дальнейшем производится введение модифицированных эмбриональных стволовых клеток в бластоцисты и на следующем этапе происходит имплантация их животному-донору (Chen J., Roop D.R., 2008).

У *нокаутных животных* целевой ген или гены инактивируются, вследствие чего у животного развивается фенотип, обусловленный отсутствием целевого продукта гена (Kuprer T.S., 1996). Скрещивание мышей, которые имеют гетерозиготный или гомозиготный генотип, может представлять особый интерес в изучении патогенеза дерматологических заболеваний, вызванных множественными генетическими дефектами (Han L. et al., 2009) Это также позволяет анализировать

функции белков, кодирующих определенные гены *in vivo*. В случае с knock-in моделями таргетный ген (гены) трансформируется при помощи целевой точечной мутации вместо полного нарушения экспрессии гена-мишени. При этом фенотип животного будет зависеть от экспрессии модифицированного генного продукта.

Направленная инактивация генов животных методом энхансерных ловушек (Enhancer trapping). В геном лабораторного животного осуществляется трансфекция клеток репортерным геном со слабым промотором. После чего экспрессия изучаемого гена будет происходить только в результате его встраивания в геном вблизи энхансерного элемента.

Направленная инактивация генов животных методом генных ловушек (Gene trapping). Осуществляется «улавливание» исследуемых генов. «Ловушка гена» (gene trap) случайным образом вставляется в локус гена и прерывает транскрипцию на сайтах интеграции. Метод очень похож на способ knock-in, но, в отличие от второго способа, здесь встройка происходит случайно.

«Ловушка гена» (gene trap) представляет собой обобщенное понятие, обозначающее различные виды «улавливающих» систем независимо от конкретной конструкции репортерного гена (Bouabe H., Okkenhaug K., 2015).

Репортерные гены могут быть использованы для построения трех основных типов «ловушек генов»: энхансер-ловушка, ловушка-промотор и ловушка-ген. Каждый тип данных ловушек способен реагировать с Cis-regulatory elements (CREs) (некодирующими областями ДНК, которые регулируют транскрипцию соседних генов) (Springer P.S., 2000).

Спонтанный мутагенез реализуется путем генерации случайных точечных мутаций в геноме при помощи контролируемого воздействия мутагенного химического вещества, а также влияния ионизирующего излучения (Smith K.C., 1992). Первыми трансгенными животными были мыши. Для их получения на первом этапе мышинные бластоцисты подвергались эксплантации (длительному сохранению и выращиванию в специальных питательных средах клеток, тканей, органов животных и растений). На следующем этапе производилась микроинъекция в полость бластулы ДНК вируса обезьяны *Simian virus 40* (SV40). На заключительном этапе происходил хирургический перенос бластоцисты в матку суррогатной матери (Mattos L.S., 2009). В 1982 г. Ральф Бринстер совместно с Ричардом Палмитером осуществили внедрение гена гормона роста человека в мышинные эмбрионы. Ученые отметили, что мыши с чужеродным геном значительно увеличились в размерах

по сравнению с контрольными животными. Кроме того, данный признак наследовался (Mattos L.S., 2009). В настоящее время трансгенные животные могут быть сконструированы несколькими способами (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Способы получения трансгенных животных

МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Метод микроинъекций. Микроинъекция ДНК в эмбрион пронуклеарной стадии производится тонкой стеклянной пипеткой. Одной из важных проблем данного этапа является тот факт, что когда ДНК вводится в оплодотворенную яйцеклетку, ДНК случайно встраивается в геном и может приводить к нарушению нормального функционирования генов животного. Одним из способов преодоления данной проблемы является использование различных вирусов, например, таких как аденоассоциированные. Они нацелены на определенные участки гена для трансгенной вставки и не повреждают функцию клеток хозяина. Другим способом преодоления вышеуказанной проблемы является использование ретровирусов, которые более эффективны для интеграции чужеродной ДНК, хотя сайт интеграции для ретровирусов чаще всего случаен (Kvaratskhelia M. et al., 2014).

Метод с использованием эмбриональных стволовых клеток. Данный способ похож на метод микроинъекций, но предполагает превращение

эмбриональных стволовых клеток, а не воздействие на оплодотворенные яйцеклетки, путем внедрения в них чужеродной ДНК. В вышеуказанном методе таргетирующая конструкция вводится в целевой участок гена путем электропорации (воздействия электрического тока, приводящего к образованию микропор в биомембране, через которые ДНК проходит внутрь клетки).

Разработан еще один подход к получению трансгенных животных, при котором для инактивации гена в ограниченных популяциях клеток и тканей используется *рекомбинантная соматическая*, а не стволовая клетка. В этом методе тканеспецифический промотор используется для направленной экспрессии одной из сайтоспецифических рекомбиназ. При этом происходит ограничение инактивации гена только в тех клетках, которые экспрессируют рекомбиназу (Gassmann M. et al., 1998). Еще один способ заключается в том, чтобы вставить чужеродный ген для рецептора токсина или фермента в участок промотора, специфичного для определенного типа клеток. Примером может стать введение гена рецептора дифтерийного токсина (Mailly L. et al., 2010).