

Изучение эффективности воздействия аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в экспериментальных моделях атопического дерматита

*Черношей Д. А., Хватова Л. А., Павлов К. И., Лагода О. Ю., Кундельская Л. М.
Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Объектом исследования являлись экспериментальные животные (линейные мыши C57BL/6), аллогенные мезенхимальные стволовые клетки, клетки иммунной системы, задействованные в патогенезе атопического дерматита (АД). В ходе выполнения исследования на двух моделях АД с использованием в качестве аллергена в 1-й модели овальбумина, во 2-й — 1-фторо-2,4-динитробензол (DNFB) манифестация клинических проявлений была более выражена в модели DNFB.

Локальное введение аутологических МСК привело к разрешению клинических проявлений дерматита в обеих моделях АД с уменьшением толщины складки поврежденной кожи, снижению зуда и расчесов. Применение аутологических МСК мышей на модели пассивной анафилаксии также приводило к значительному уменьшению зоны воспаления.

Ключевые слова: аллергия, экспериментальная модель, атопический дерматит, мезенхимальные стволовые клетки, пассивная анафилаксия, воспаление.

Введение. Атопический дерматит (АД, L20, шифр по МКБ-10), несмотря на свою аллергическую природу, представляет собой многофакторное заболевание, которое проявляется, как правило, в ран-

нем детском возрасте. Для АД характерно дальнейшее прогрессирование (30–50 % пациентов с АД) с развитием так называемой аллергической триады: помимо кожных проявлений, появляются аллергический ринит и бронхиальная астма.

Лечение пациентов с АД многокомпонентное и включает: лечебное питание (с исключением пищевых аллергенов); контроль за окружающей средой пациента; системную фармакотерапию; наружную терапию; лечение сопутствующих аллергических, системных и органических заболеваний [1]. Подобный подход позволяет улучшить состояние пациентов, однако в целом терапия носит симптоматический характер и не влияет на патогенетические звенья данного заболевания.

Одним из наиболее перспективных направлений лечения АД является применение стволовых клеток, а именно мезенхимальных стволовых клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (далее МСК), согласно литературным данным, нашли широкое применение в регенеративной медицине, а также в терапии иммуноопосредованных заболеваний, что делает обоснованным применение данного вида терапии у пациентов с АД.

Применение экспериментальных моделей АД позволяет не только изучать патогенез данного заболевания (и в частности его отдельные звенья), но также является неотъемлемым этапом разработки инновационных подходов к его лечению.

В настоящее время применяются экспериментальные модели АД *in vitro* и *in vivo*. Выбор модели напрямую зависит от поставленных целей и задач исследования, например, модели АД *in vitro* позволяют изучать вклад отдельных популяций/субпопуляций клеток в патогенез данного заболевания.

Существуют различные экспериментальные модели АД *in vivo*: спонтанно возникший (NC/Nga мыши, Flakytail, DS-Nh и др.), модели с использованием трансгенных животных (с повышенной или пониженной экспрессией селективных молекул), гаптен-индуцированный, АД HR-1 мышей, вызванный диетой с низким содержанием магния и цинка, витамин D3-индуцированная модель, а также аллергические модели (с применением овальбумина, ИЛ-23, аллергенов пылевых клещей) и комбинированные аллергические модели АД. Гаптен-индуцированная модель (также используется NC/Nga линия мышей) была получена с помощью 9–10-кратных аппликаций низкомолекулярного гаптена, например, оксазолон, 1-флуоро-2,4-динитробензен (DNFB), 2,4,6-тринитрохлоробензена (TNCB) [3]. При этом наблюдаются повреждение кожного барьера, клеточная инфильтрация, увеличение сывороточного содержания IgE. На настоящий момент данную модель довольно часто используют для исследований АД, а также аллергического контактного дерматита. Наличие атопического дерматита у животного подтверждается сходной клинической картиной, повышением сывороточных концентраций ИЛ-4, IFN- γ , а также IgE общего и специфического к какому-либо аллергену в сыворотке крови. Большинство представленных моделей не отражают патогенез данного заболевания, поскольку описывают отдельные звенья, либо полученная модель *in vivo*, более сходна с другими иммуно-опосредованными кожными заболеваниями. Например, индукция атопического дерматита с помощью введения цитокинов, например, ИЛ-23 приводит к появлению кожных изменений воспалительного характера, более сходных с псориазом, чем с данным заболеванием.

В качестве модели *in vitro* может быть использована как отдельно взятая культура клеток, так и несколько, объединенных в систему. Один из примеров: совместное культивирование иммунокомпетентных клеток (базофилов или эозинофилов) с интактными клетками (монослойной культурой фибробластов). Помимо клеточной линии HaCaT, для исследований *in vitro* также используют первичные культуры кератиноцитов, полученные от пациентов с АД. Более сложные модели *in vitro* предполагают применение нескольких культур. Например, эквивалент кожи или 3D-модель кожи *in vitro* схожа по своему строению с предыдущей моделью, однако в данном случае в качестве подложки используют либо дерму, либо содержащий фибробласты матрикс (например, коллагеновый или фибриновый гели).

Таким образом, именно экспериментальная аллергическая модель *in vivo* является наиболее приближенной по клинической картине и по механизмам патогенеза к данному заболеванию, наблюдаемому у людей. Для разработки экспериментальной модели в качестве алергизирующих веществ были выбраны овальбумин, а также гаптен DNFB.

Цель работы — определение эффективности местной терапии аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками в моделях атопического дерматита у линейных лабораторных животных (мыши).

Материалы и методы. *Моделирование атопического дерматита у мышей.* Исследования с использованием лабораторных животных были одобрены этическим комитетом БГМУ и выполнялись в соответствии с международными и принятыми в Республике Беларусь принципами и требованиями биоэтики. Характеристика исследованных мышей представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика экспериментальных лабораторных животных

Вид	Musmusculus
Линия	C57BL/6
Пол	Самки
Источник	Виварий БГМУ
Возраст к введению	4–6 мес.
Вес тела к введению	20–30 г
Количество животных в группе	6

В течение эксперимента животные содержались в соответствии с нормативами индивидуально-го размещения. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Животные получали стандартный рацион в количестве, определенном действующими нормами [4]. Наблюдение за животными проводили непрерывно в течение всего времени исследования.

Для индентификации у мышей атопического дерматита использовались 2 модели (рисунок 1):

1) сенсибилизация с последующим внутрикожным введением овоальбумина, адсорбированного на гидрооксид алюминия;

2) сенсибилизация с последующим накожным введением 1-фторо-2,4-динитробензола (DNFB).

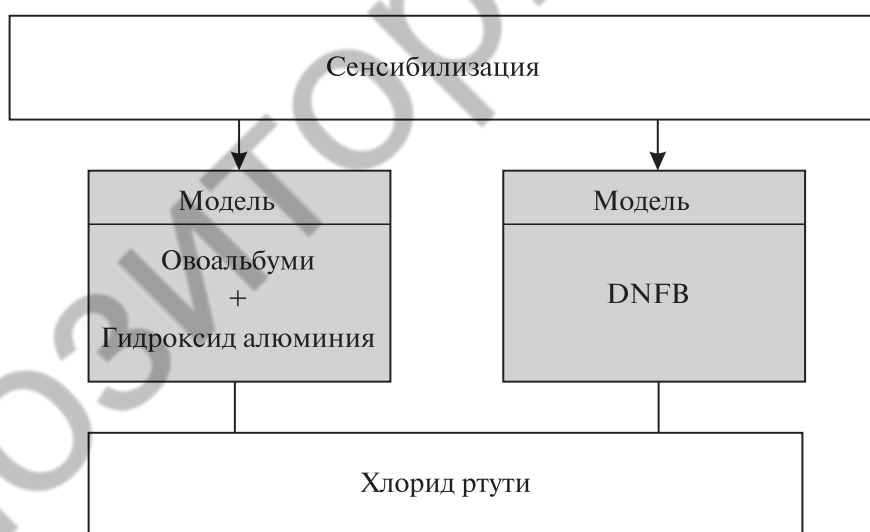


Рисунок 1 — Схема опыта по сенсибилизации мышей с целью моделирования атопического дерматита

Для активизации продукции IgE животным обеих групп внутрибрюшинно вводился хлорид ртути в концентрации 50 мкг/мл. Для сенсибилизации овоальбумином раствор готовился следующим образом. Раствор овоальбумина (1 мкг/мл) производства Cusabio (США) смешивался с раствором гидроксида алюминия (20 мг/мл) из расчета 1 : 1. Полученный раствор перемешивался на магнитной мешалке 6 ч для адсорбции овоальбумина на гидрооксиде алюминия. Животным внутрибрюшинно вводили 0,5 мл данного раствора. Для сенсибилизации DNFB (производство Glentham, Великобритания) использовался 2%-й раствор. Животным накожно наносили 0,5 мл. Сенсибилизация выполнялась шестикратно в течение 2 недель. Хлорид ртути вводился 3 раза в неделю в течение 2 недель. Для каждой из моделей выполнено 6 сенсибилизаций в течение 2 недель. На 22-е сутки с момента первой сенсибилизации выполнялось введение аллергена с целью индуцирования дермати-

та. Для индуцирования дерматита в модели 1 (Овальбумин + Гидрооксид алюминия) животным на спине выбривался фрагмент 2×2 см и внутрикожно вводили 0,5 мл раствора овоальбумина (1 мкг/мл). Для индуцирования дерматита в модели 2 (DNFB) на уже выбритый при сенсibilизации участок кожи спины 2×2 см наносили 0,5 мл 2%-го раствора DNFB.

У животных оценивались клинические проявления, связанные с поведением, питанием. Сенсibilизация количественно оценивалась по шкале Магнуссона – Клигмана для оценки реакции в провакационном тесте [5]. Баллы выставлялись следующим образом: 0 — никаких видимых изменений; 1 — разрозненная или неоднородная эритема; 2 — умеренная и сплошная эритема; 3 — интенсивная эритема и отек.

Моделирование пассивной анафилаксии у мышей. Оценка сенсibilизации мышей (продукции IgE) методом пассивной анафилаксии выполнялась с использованием белых беспородных мышей. Шерсть на спинке животного удаляли с помощью депилирующего крема. Крем осторожно втирали в волосяной покров, выдерживали животное в индивидуальной клетке 30 мин, после чего подходящим скребком и губкой легко снимали шерсть. Далее кожу обрабатывали косметическим защитным кремом. Животному давали отдохнуть сутки. Никаких признаков раздражения, мацерации и других повреждений обычно не регистрируется. Животное аккуратно фиксировали за холку и хвост. На кожу мыши несмываемым красным маркером (на основе нитрокрайки) наносили маркеры (точки в 2 мм) в месте будущего введения исследуемой сыворотки. Далее с соблюдением асептики подкожно вводили 50 мкл цельной сыворотки строго под маркерную точку. Через 24 ч внутривенно в объеме 200 мкл 0,5%-й синьки Эванса вводили 0,4 мг овоальбумина. Через 20–30 мин проводили учет реакции. Локальное посинение кожи в области маркерной точки свидетельствует о наличии алерген-специфической реакции.

Получение культур МСК и выполнение исследований по лечению. Для получения культур МСК были использованы лабораторные мыши линии C57BL/6. Ведение культур МСК, полученных из костного мозга и компактного вещества трубчатых костей мыши, выполняли следующим образом: полученные клетки из костного мозга и из компактного вещества трубчатых костей мыши инкубировали в питательной среде не менее 3 суток, смена питательной среды была осуществлена на 4-е сутки и далее смена среды осуществлялась раз в 3 дня. При накоплении достаточного количества клеточного материала (более $2-3 \cdot 10^6$ кл/мл) для получения чистой культуры применяли метод сортировки по CD90 и CD45 на проточном цитофлуориметре с сортером. Для оценки морфологии полученных культур использовали как световую микроскопию, так и флуоресцентную микроскопию. Для фенотипирования клеток были использованы моноклональные антитела для проточной цитометрии к таким поверхностным маркерам, как CD44, CD45 и CD90.

Иммунизация МСК мышам выполнялась трехкратно в течение недели на 1, 3 и 5-е дни. В предварительно выбритый на спине прямоугольный участок кожи площадью 2×2 см вводили 1 млн МСК, полученных из костного мозга мыши. Клетки суспендировались в 1 мл физиологического раствора и делились на 5 частей: 4 вводились в углы многоугольника, одна — в центр. Через 7 дней после последней иммунизации животные подвергались некропсии.

Полученные качественные и количественные данные экспериментов обрабатывали методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows (версия 6.1). В выборках мышей (модель 1 и модель 2) для подтверждения гипотезы о наличии различий между двумя независимыми выборками применяли групповой тест Стьюдента и *U*-критерий Манна – Уитни. Для сравнения двух независимых групп по качественному признаку использован точный критерий Фишера. Статистическую значимость изменений исследуемых параметров устанавливали при 5%-м уровне вероятности ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Клинические проявления АД после 1-й сенсibilизации носили различный характер в двух экспериментальных моделях. Кожные проявления в модели 1 проявились через 30 мин и характеризовались слабо выраженной эритемой и незначительной отеком. Для модели 2 было характерно более позднее наступление кожных проявлений (1–1,5 ч), выраженная эритема, папулы, нарывы (рисунок 2).

Дальнейшее поведение животных в двух моделях также выражено отличалось. У мышей, сенсibilизированных к овоальбумину, наблюдалось обычное поведение. Кожный зуд и расчесывание в месте введения алергена были не характерны. Напротив, мыши сенсibilизированные к DNFB, интенсивно расчесывали место введения, проявляли беспокойство, которое быстро переходило в противоположное состояние: пассивность, заторможенность, слабость защитных реакций (таблица 2).



Рисунок 2 — Кожные проявления atopического дерматита

Таблица 2 — Характеристика моделей atopического дерматита

Признак	Модели atopического дерматита	
	Модель 1	Модель 2
Аллерген	Овальбумин	DNFB
Адьювант	Гидроксид алюминия	Нет
Усиление продукции IgE	Хлорид ртути	Хлорид ртути
Поведение животных	Естественное поведение животных	Беспокойство, перемежающееся с угнетенным состоянием
Кожный зуд	Слабо выражен	Интенсивный зуд
Макроскопическая характеристика проявлений дерматита	Эритема, незначительная отечность	Эритема, папулы, нарывы
Балл по шкале Магнуссона – Клигмана	1	2

Определение развития сенсibilизации (циркуляции специфических IgE в крови) методом пассивной анафилаксии (рисунок 3).



Отрицательный контроль



Положительная реакция

Рисунок 3 — Учет реакции пассивной анафилаксии на мышах

Всего исследовали 6 сывороток сенсibilизированных животных. Специфические IgE обнаружены в 5 сыворотках. Типичные проявления пассивной анафилаксии и учет реакций представлены на рисунке 3. Необходимо отметить, что у мышей тучные клетки могут активироваться иммунными комплексами с IgG. Однако в отличие от них IgE способны длительно (недели) оставаться на поверхности тучных клеток. Кроме того, описанный метод позволяет оценить и интенсивность поздней фазы аллергической реакции, в том числе интенсивность ГЗТ, что может иметь значение при моделировании атопического дерматита на мышах.

МСК выделяли из костного мозга трубчатых костей и компактного вещества трубчатых костей мыши. Смешанные культуры при оценке экспрессии таких маркеров как CD44, CD90 показали высокое содержание CD44+клеток и небольшой процент CD90+клеток (рисунок 4).

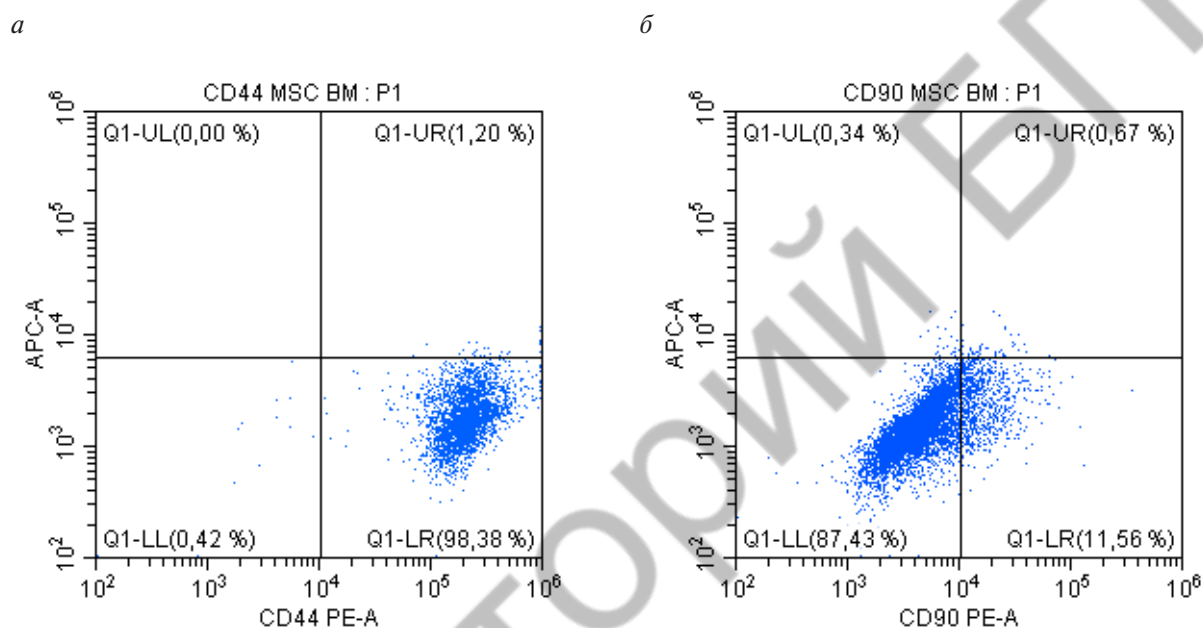


Рисунок 4 — Результаты фенотипирования культуры МСК, полученной из костного мозга трубчатых костей мыши (1 пассаж):
а — экспрессия CD44 (%); б — экспрессия CD90+ (%)

Согласно литературным данным и полученным результатам методом адгезии к пластику можно получить смешанную культуру с невысоким содержанием CD90+клеток. МСК костного мозга трубчатых костей мыши обладают сниженной адгезивной активностью, а также невысоким процентом содержания в костном мозге. Стандартным методом, а именно методом адгезии получить чистую культуру не представляется возможным.

При разовой иммунизации предварительно выбритый на спине прямоугольный участок кожи площадью 2×2 см вводили 1 млн МСК, полученных из костного мозга мыши. Всего в течение недели было выполнено 3 иммунизации (1-й, 3-й, 5-й день). Систематическое наблюдение за контрольными и опытными животными не выявило каких-либо отклонений от нормы в поведении за период эксперимента. Все животные были одинаково подвижными, активно передвигались по клетке в поисках «лучшего места в группе», при незначительных болевых и тактильных раздражителях наступала «настороженно-ожидательная» поза с избеганием, голосовой и оборонительной реакциями, царапающими и кусающими движениями. Кожный зуд и расчесывание у животных опытной группы наблюдалось в течение 2 ч в области образовавшегося волдыря на месте введения МСК. Животные контрольной (интактные мыши) и опытной (3 иммунизации МСК) групп охотно поедали корм и имели гладкий блестящий шерстяной покров.

Локальное введение аутологических приводило к разрешению клинических проявлений дерматита на моделях с овоальбумина и DNFB: происходило уменьшение отечности (уменьшение толщины

складки поврежденной кожи), снижению зуда и расчесов. Взяты образцы тканей для последующего анализа экспрессии цитокинов воспаления.

Применение аутологических МСК мышей на модели пассивной анафилаксии (локальное подкожное введение 1 млн МСК за 2 дня до постановки пассивной анафилаксии) приводило к значительному уменьшению зоны воспаления ($с\ 7,1 + 0,87$ до $4,52 + 1,0\ \text{см}^2$) и ускорению резорбции крастера из кожи мышей.

В отношении таких трансгенных линий, как, например, C57BL/6 и BALB/c, некоторые исследователи отмечают отсутствие возникновения АД в свободных от патогенов условиях [6]. Имеются также данные об отсутствии признаков АД при стимуляции антигенами пылевого клеща при использовании линии мышей BALB/c, в связи с чем был сделан вывод о предрасположенности к развитию АД лишь у NC/Nga линии (развитие заболевания в ответ на стимуляцию гаптенами или аллергенами). Известно также, что В-лимфоциты NC/Nga линии мышей являются более чувствительными в ответ на стимуляцию (например, введение ИЛ-4) чем линия мышей BALB/c [7]. Также В-лимфоциты, полученные от NC/Nga, сохраняют способность к продукции иммуноглобулина Е (IgE) даже при воздействии высоких доз ИФН- γ при совместном культивировании *in vitro* [7]. Таким образом, в отношении трансгенных линий также существуют значительные отличия в предрасположенности к атопии. Наиболее чувствительными в этом отношении, как и наиболее широко применимыми с целью разработки экспериментальных моделей, являются NC/Nga мыши.

Заключение. В ходе выполнения исследования была оценена эффективность местной терапии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками с низким содержанием CD90+у мышей в двух моделях АД, вызванного сенсibilизацией к овальбумину (модель 1) и 1-фторо-2,4-динитробензолу (модель 2).

Проявления дерматита в использованных экспериментальных моделях носили различный характер. Атопический дерматит, вызванный сенсibilизацией к овальбумину, характеризовался слабым кожным зудом, эритемой, отеком и оценивался в 1 балл по шкале Магнуссона – Клигмана. Для модели атопического дерматита, индуцированного DNFB, было характерно угнетенное состояние животных, кожный зуд, эритема, папулы, нарывы. По шкале Магнуссона – Клигмана воспаление соответствовало 2 баллам.

Разрешение клинических проявлений АД в моделях с использованием овоальбумина и DNFB, проявляющееся уменьшением воспалительного синдрома в ответ на локальное введение аутологических МСК, свидетельствует об уменьшении активности воспалительной реакции при индукции пассивной анафилаксии у мышей и обоснованности применения МСК при атопическом дерматите.

Литература

1. Клинический протокол диагностики, лечения и профилактики атопического дерматита. — Минск: БелМАПО, 2009. — 32 с.
2. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering / C. Auxenfans [et al.] // Eur. J. Dermatol. — 2009. — Vol. 19, № 2. — P. 107.
3. Martel, C. B. Translational animal models of atopic dermatitis for preclinical studies / C. B. Martel // Yale J. Biol. Med. — 2017. — Vol. 90, № 3. — P. 389–402.
4. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами: ГОСТ 33216-2014. Введ. 01.05.2017. — М.: Стандартинформ, 2016. — 10 с.
5. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсibilизации: ГОСТ 32375-2013. Введ. 18.01.2013. — М.: Стандартинформ, 2016. — 7 с.
6. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice / H. Kawasaki [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2012. — Vol. 129, № 6. — P. 1538–1546.
7. Tanaka, A. Animal models of atopic eczema / A. Tanaka, H. Matsuda // Handbook of atopic eczema. — Springer Science and Business Media. — 2006. — P. 410–416.

Evaluation of the efficiency of allogenic mesenchymal stem cells in experimental models of atopic dermatitis

Chernoshei D. A., Khvatova L. A., Pavlov K. I., Lagoda O. Yu., Kundelskaya L. M.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

In the course of the research, two models of atopic dermatitis were obtained. The first model was to use ovalbumin as an allergen, the second — 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) as an allergen. Atopic dermatitis caused by sensitization to ovalbumin was characterized by mild pruritus, erythema, and edema. The model of atopic dermatitis induced by DNFB is characterized by depression of animals, pruritus, erythema, papules, abscesses. Methods have been developed to control the sensitization of mice to the allergens used, based on the phenomenon of passive anaphylaxis. The method allows to determine the presence of specific antibodies (IgE and IgG) in the blood serum of sensitized mice, which provide the atopic component of the developed models.

Local injection of autologous MSCs led to a relief of dermatitis symptoms in models with ovoalbumin and DNFB: the decreasing of an edema and a thickness of the damaged skin folds. The use of autologous MSCs in a micemodel of passive anaphylaxis also led to a significant reduction of the inflammation area.

Keywords: allergy, experimental model, atopic dermatitis, mesenchymal stem cells.

Поступила 16.11.2020