

Разработка экспериментальной модели вульгарной пузырчатки на лабораторных животных

А.А. Кубанов^{1,2}, А.Э. Карамова¹, К.В. Рог¹, Т.В. Абрамова², В.А. Смольяникова³,
А.Н. Мурашев⁴, Д.А. Бондаренко⁴

¹ ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

² ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

³ ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

⁴ ФГБУН Филиал института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН 142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 6

Вульгарная пузырчатка — хроническое аутоиммунное буллезное заболевание, характеризующееся образованием пузырей на коже и/или слизистых оболочках вследствие акантолиза. Для поиска новых молекулярно-биологических мишеней, изучения патогенетических механизмов развития заболевания, разработки новых методов терапии представляется актуальным создание экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных, воспроизводящей клинические, гистологические и иммунологические признаки пузырчатки.

Цель исследования. Разработка экспериментальной модели пузырчатки путем введения неонатальным мышам инбредной линии BALB/c препаратов IgG, полученных из сыворотки крови больных пузырчаткой.

Результаты. Новорожденным мышам линии BALB/c внутрибрюшинно введены препараты суммарных IgG, полученные от больных пузырчаткой (основная группа) и здоровых добровольцев (контрольная группа), в дозах от 10 до 30 мг/мышь. У мышей основной группы, получавших внутрибрюшинные инъекции IgG от больных пузырчаткой в дозе 30 мг/мышь, определены клинические, гистологические и иммуноморфологические признаки пузырчатки. У мышей контрольной группы, которым вводились препараты IgG здоровых лиц, признаки пузырчатки не наблюдались. Данное исследование подтверждает роль пемфигусных аутоантител в патогенезе вульгарной пузырчатки и показывает возможность пассивной передачи антител лабораторным животным.

Ключевые слова: **пузырчатка, экспериментальная модель, акантолиз, иммуноглобулины G, реакция иммунофлюоресценции.**

Контактная информация: abtava@mail.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2015; (4): 76—82.

Development of an experimental model of pemphigus vulgaris in laboratory animals

A.A. Kubanov^{1,2}, A.E. Karamova¹, K.V. Rog¹, T.V. Abramova², V.A. Smolyannikova³, A.N. Murashev⁴, D.A. Bondarenko⁴

¹ State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

Russian Medical Academy of Postgraduate Studies, Ministry of Health of the Russian Federation Barrikadnaya str., 2/1, Moscow, 123995, Russia

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University Trubetskaya str., 8, bldg 2, Moscow, 119991, Russia

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences Prospekt Nauki, 6, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

Pemphigus vulgaris is a chronic autoimmune bullous disease characterized by the formation of blisters on the skin and/or mucous tunics as a result of acantholysis. To search for new molecular and biological targets, study pathogenetic mechanisms of the disease development and develop new methods of treatment, it is urgent to create an experimental model of pemphigus in laboratory animals reproducing clinical, histological and immunological signs of pemphigus.

Goal of the study. To develop an experimental model of pemphigus by injecting IgG produced from the blood serum taken from patients with pemphigus to neonatal mice of the BALB/c inbred line.

Results. Accumulated IgG products taken from patients with pemphigus (main groups) and healthy volunteers (control group) were injected intraperitoneally to neonatal mice of the BALB/c in the doses of 10—30 mg per mouse. Clinical, histological and immunomorphological signs of pemphigus were revealed in the mice from the main group, which received intraperitoneal injections of IgG taken from patients with pemphigus in the dose of 30 mg per mouse. No signs of pemphigus were observed in the mice from the control group, which received injections of IgG taken from healthy people. This study confirms the role of pemphigus autoantibodies in the pathogenesis of pemphigus vulgaris and shows that passive transmission of antibodies to laboratory animals is possible.

Key words: pemphigus, experimental model, acantholysis, immunoglobulins G, immunofluorescence reaction.

■ Вульгарная пузырчатка — аутоиммунное буллезное заболевание, характеризующееся клинически образованием пузырей на коже и/или слизистых оболочках вследствие акантолиза [1—3].

Патогенетическую роль в формировании пузырей при дерматозе играют циркулирующие аутоантитела (класса IgG) к структурным компонентам десмосом кератиноцитов, относящимся к семейству кадгеринов: десмоглеинам типов 1 и 3 (Dsg1 и Dsg3) [4—7]. Выявлена связь между уровнем циркулирующих антител к Dsg1 и Dsg3 и тяжестью течения пузырчатки [8, 9].

Первыми моделями для исследования патогенности антител при пузырчатке были экспланты человеческой кожи [10] и культуры клеток кератиноцитов мыши [11]. J. Schiltz и B. Michel (1976) продемонстрировали патогенность антител фракции сыворотки крови, полученной от больных пузырчаткой, *in vitro* на эксплантах человеческой кожи. Несколько позже R. Farb и R. Dykes (1978) выявили, что IgG-фракция сыворотки больных пузырчаткой приводит к разъединению эпидермальных мышинных клеток культуры BALB/c, выращенных в среде с низким содержанием комплемента. Однако при использовании клеточной линии кератиноцитов не наблюдается акантолиза, так как клетки в культуре формируют только монослой.

У мышей в природных условиях не развиваются заболевания, напоминающие пузырчатку. Введение антител, полученных от больных пузырчаткой, взрослым мышам также не вызывает акантолиза [12]. Впервые модель на лабораторных животных с пассивным переносом антител была получена группой японских ученых в 1982 г. [13]. Антитела, выделенные от больных пузырчаткой, вводились новорожденным мышам, и через 8—24 ч у мышей появлялись клинические и гистологические признаки пузырчатки. В последующем было показано, что Fab-фрагменты IgG больных вульгарной пузырчаткой вызывают появление пузырей у новорожденных мышей [14].

Для поиска новых молекулярно-биологических мишеней, изучения патогенетических механизмов развития заболевания, разработки новых методов терапии представляется актуальным создание экспериментальной модели пузырчатки на лабораторных животных, воспроизводящей клинические, гистологические и иммунологические признаки пузырчатки.

Цель исследования: разработка экспериментальной модели пузырчатки путем введения неонатальным мышам инбредной линии BALB/c препаратов IgG, полученных из сыворотки крови больных пузырчаткой.

Материал и методы

Сыворотка крови человека. Для проведения работы была использована сыворотка крови больных с подтвержденным диагнозом вульгарной пузырчатки, содержащая антитела к Dsg3 и объединенная в пул сывороток. Наличие антител к Dsg3 определялось ме-

тодом иммуноферментного анализа с помощью наборов Anti-Desmoglein 3 ELISA (Euroimmun AG, ФРГ).

Для контроля эксперимента использовалась сыворотка крови здоровых добровольцев, не содержащая антител к Dsg3.

Лабораторные животные. Эксперименты выполнены на неонатальных мышах — самцах инбредной линии BALB/c с массой 2,5—3,5 г, в возрасте менее 24 ч от рождения, предоставленных НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пущино. Производитель животных предоставил данные последнего контроля здоровья животных, подтверждающие их SPF-статус (животные, свободные от патогенов). В эксперимент были отобраны животные без признаков отклонений здоровья таким образом, чтобы индивидуальные значения массы не отклонялись от среднего значения в пределах одного пола более чем на 20%. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, указанным в руководстве Guide for Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press). Животные содержались в стандартных условиях и получали корм и воду *ad libitum*. Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с протоколом, утвержденным биоэтической комиссией ФИБХ РАН. Исследование выполнялось согласно требованиям Национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 53434-2009). Все процедуры в исследовании выполнены согласно утвержденному письменному Плану исследований и Стандартным операционным процедурам.

Получение препаратов IgG. Выделение препаратов IgG производилось из пула сывороток крови методом аффинной хроматографии на колонке с белком G — сефарозой («Биалекса», Россия) по стандартному протоколу производителя. После хроматографии проводилась проверка качества выделения антител методом электрофореза по Лэммли [15].

Полученный раствор IgG диализовали против изотонического буфера и концентрировали в центрифужных фильтрах Amicon (Millipore, США) с пределом отсека 100 кД. Готовый концентрированный раствор количественно переносили в пробирку типа «эппендорф» и определяли концентрацию антител в нем методом спектрофотометрии при длине волны 280 нм. Коэффициент экстинкции IgG был принят равным 1,4. Готовые препараты антител хранили при –20 °С.

Работа с лабораторными животными. Препараты IgG вводили животным из одного помета, которых разделили на две группы: опытную и контрольную. Мышам из опытных групп ($n = 24$) вводили препараты антител, полученные из пула сывороток, содержащих антитела к Dsg3. Животным контрольных групп ($n = 12$, по 3 мыши в каждой серии экспериментов) вводили препараты IgG, не содержащие антител к Dsg3, для отслеживания возможных неспецифических реакций организма мышей на человеческие иммуноглобулины.

Препараты IgG вводили инсулиновым шприцем с иглой 27G внутривенно по следующим схемам:

- однократно в дозах 10, 15, 20, 30 мг/мышь;
- двукратно в дозе по 15 мг/мышь с промежутком между введениями 24 ч.

Отклонений в процедуре введения не было.

Животных подвергали эвтаназии путем ингаляции CO₂ через определенный промежуток времени (время экспозиции) — 24 или 48 ч, после чего проводили осмотр кожных покровов и получали аутопсийный материал кожи для патоморфологического исследования (пузырный элемент) и исследования методом реакции непрямой иммунофлюоресценции (ИРИФ) (видимо здоровый участок кожи).

Клиническая оценка поражений кожных покровов животных. При визуальном осмотре проводили оценку выраженности поражений кожи в виде пузырей и/или эрозий по следующей шкале:

- 1+ — три или менее морфологических элемента;
- 2+ — от 4 до 10;
- 3+ — более 10 или наличие на поверхности участков некроза кожи, составляющих более 20% эпидермиса лабораторного животного.

Гистологическое исследование аутопсийного материала. При гистологическом исследовании материал фиксировали 10% забуференным формалином. Гистологические образцы подвергали стандартной гистологической проводке, заливали в парафиновые блоки, ориентируя образцы строго в вертикальной плоскости. Из парафиновых блоков на микротоме изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Готовые препараты исследовались под микроскопом LeicaDM4000 B.

Метод реакции непрямой иммунофлюоресценции (ИРИФ) с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vitro*. Для

исследования методом ИРИФ образцы кожи заливали в криоконсервирующую среду (Tissue-Tek® O.C. T™ Compound, Sakura, Япония) и замораживали. Из полученных блоков на криостатном микротоме изготавливали срезы толщиной 5—6 мкм, растягивали их на предметных стеклах с полилизинным покрытием, высушивали при комнатной температуре 25 °С в течение 30 мин. После высушивания препараты со срезами помещали в фольгу, хранили в морозильной камере до проведения ИРИФ. Методом ИРИФ в замороженных срезах после оттаивания и фиксации в ацетоне определяли наличие иммуноглобулинов класса G (первичные антитела — rabbit polyclonal antibodies, ready-to-use, Cell Marque antibody, США, разведение 1,42 нг/мл; вторичные — Goatanti-RabbitIgGLight 488, Epitomics США, разведение 1:400). Полученные препараты анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Olympus IX81S1F-S (Германия) с использованием объективов ×60 и ×100, с архивацией изображения для последующего морфометрического анализа.

Результаты и обсуждение

Клинические симптомы пузырчатки были выявлены у животных опытной группы, которым вводили 30 мг препаратов IgG однократно или двукратно со временем экспозиции 48 ч (см. таблицу). У 4 мышей наблюдались эрозии в абдоминальной области, по 3-балльной шкале оцениваемые как 1+ (т.е. три или менее поражения кожи) (рис. 1).

При патоморфологическом исследовании аутопсийного материала кожи мышей акантолиз выявлялся во всех гистологических препаратах животных из опытных групп, которым были введены антитела в количестве 30 мг/мышь как однократно, так и двукратно со временем экспозиции 48 ч (рис. 2).

Таблица

Результаты, полученные в экспериментах по созданию экспериментальной модели пузырчатки в опытных группах лабораторных животных

Номер эксперимента	Доза препарата IgG, мг/мышь	Время экспозиции, ч	Кратность введения препарата IgG	Число мышей в эксперименте	Клинические признаки пузырчатки (число мышей)			Патоморфологические признаки пузырчатки (число мышей)	ИРИФ (фиксация IgG в эпидермисе животных), число мышей
					1+	2+	3+		
1	10	24	1	5	0	0	0	0	5
2	15	24	1	5	0	0	0	0	5
3	20	24	1	5	0	0	0	0	5
4	30	48	1	5	2	0	0	5	5
			2	4	2	0	0	4	4



Рис. 1. Эрозии на коже новорожденных мышей

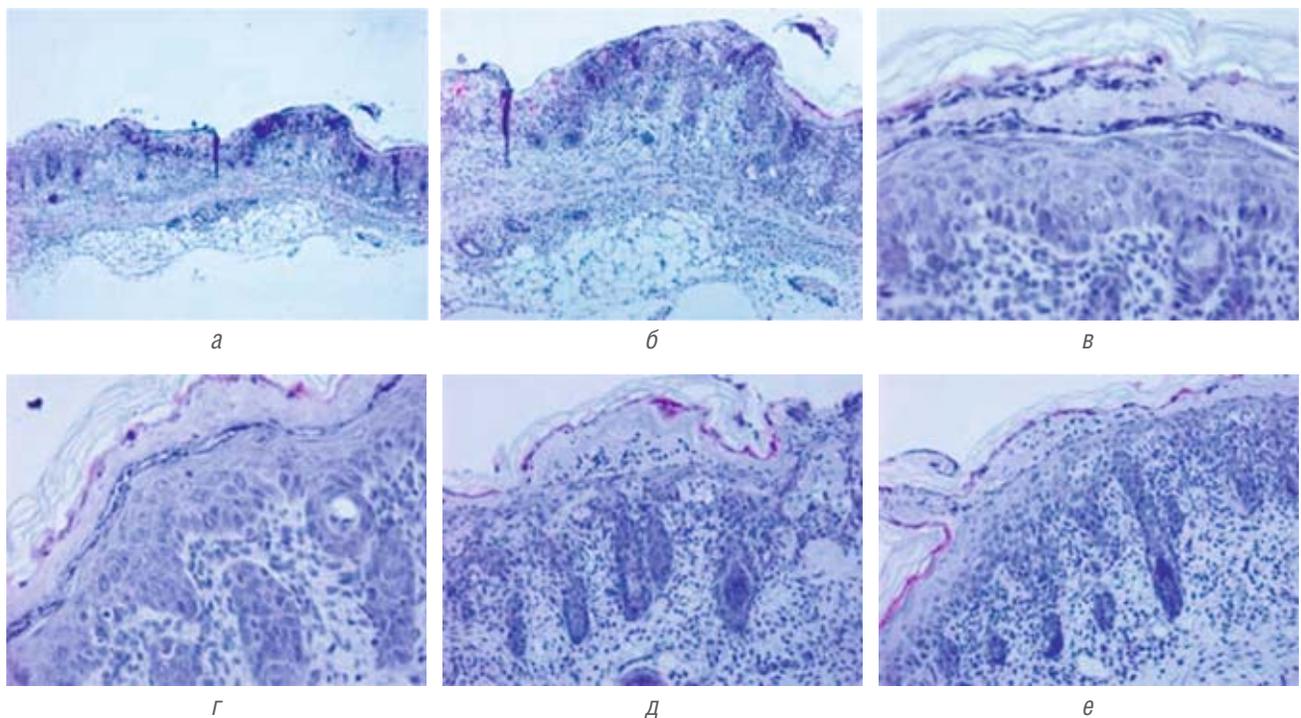


Рис. 2. Гистологическая картина. Эпидермис обычной толщины, слои дифференцированы. Небольшой рыхлый кератоз. В центре биоптата присутствует очаг поверхностного изъязвления, покрытый фибриновой коркой, пропитанной лейкоцитарным детритом. В прилегающих участках биоптата наблюдается расслоение эпидермиса на уровне зернистого слоя с формированием щелей и мелких пузырей, в полости которых присутствуют акантолитические клетки, лимфоциты и лейкоциты. В дерме присутствуют фрагменты фолликулов. Вокруг сосудов умеренная гистиолимфоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином: *а* — $\times 50$; *б* — $\times 100$; *в* — *е* — $\times 200$

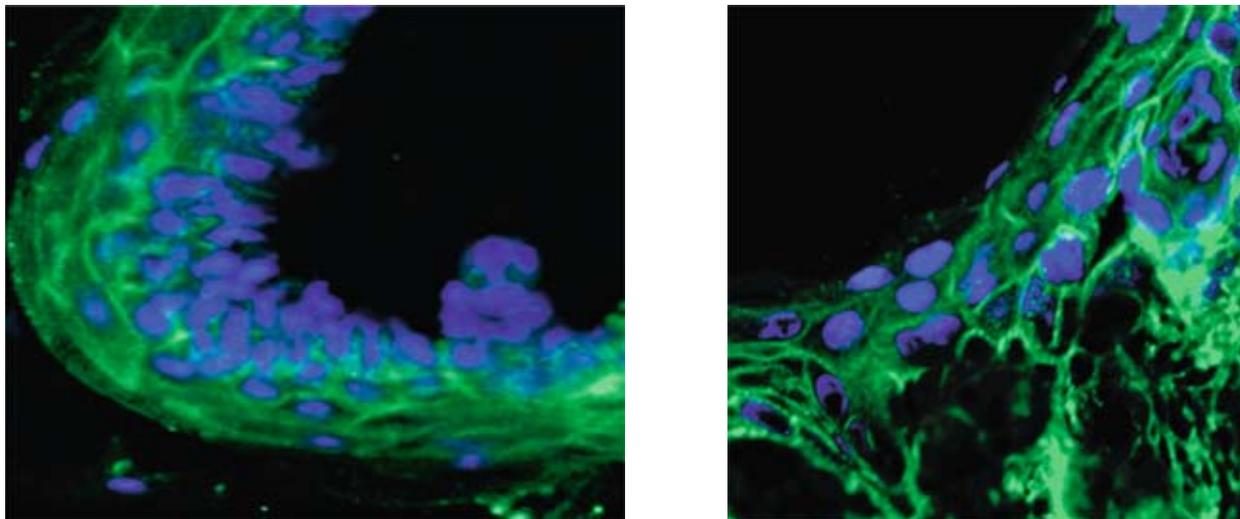


Рис. 3. ИРИФ. Препарат IgG от больного пузырчаткой. Фиксация IgG в межклеточных промежутках эпидермиса, $\times 20$

При исследовании криосрезов кожи мышей из опытных групп методом ИРИФ была обнаружена фиксация человеческих IgG в межклеточных промежутках эпидермиса у всех мышей (рис. 3).

В контрольных группах животных клинических, патоморфологических признаков пузырчатки, а также фиксации человеческих IgG в эпидермисе не наблюдалось.

Наличие акантолитических изменений в эпидермисе мышей опытной группы при патоморфологическом исследовании, а также фиксация человеческих IgG в эпидермисе, выявляемая методом ИРИФ только у животных, которым вводили препараты IgG, содержащие антитела к Dsg3, свидетельствуют о том, что антитела, содержащиеся в сыворотках крови больных пузырчаткой, индуцируют в коже животных процессы, сходные с симптомами пузырчатки.

Слабая выраженность клинических поражений кожи у мышей из опытных групп свидетельствует о том, что индукция патологических процессов, характерных для пузырчатки, развивается медленно. Это может быть обусловлено малым временем экспозиции для тех количеств антител, которые вводились животным.

Эксперимент считался успешным при проявлении у животных в опытной группе следующих признаков:

1. Видимые поражения кожи: образование эрозий или пузырей.
2. Патоморфологические изменения: наличие акантолиза в гистологических срезах эпидермиса животного.
3. Фиксация человеческих IgG в эпидермисе мыши, выявляемая методом ИРИФ.

Как следует из результатов экспериментов, сочетание всех трех признаков наблюдается в схеме с введением IgG одно- и двукратно в количестве 30 мг/мышь и временем экспозиции 48 ч. При примерно одинаковых результатах предпочтение следует отдать схеме с двукратным введением антител с интервалом 24 ч, так как благодаря этому обеспечивается уменьшение объема раствора, вводимого одновременно, что приводит к снижению случайных потерь препарата IgG при инъекции и уменьшает риск развития у животных негативных явлений, связанных с введением в организм больших объемов жидкости.

В дальнейшем работа над экспериментальной моделью пузырчатки будет продолжена. Планируется подтверждение воспроизводимости модели на большой выборке животных и осуществление валидации экспериментальной модели для использования в экспериментах, связанных с изучением механизмов патогенеза пузырчатки.

Выводы

1. Подтверждена возможность создания экспериментальной модели пузырчатки на мышах путем введения животным антител, полученных от больных пузырчаткой.
2. Определена минимальная доза препарата IgG и время экспозиции, при которых у лабораторных животных наблюдается развитие клинических симптомов пузырчатки, подтвержденных патоморфологическими методами и ИРИФ.
3. Будет продолжена работа по стандартизации условий по воспроизведению экспериментальной модели. ■

Литература

1. Karacheva YU.V., Gajdash A.A., Prokhorenkov V.I. Study of relation of acantholysis and apoptosis in pathogenesis of pemphigus vulgaris. *Vestn dermatol venerol* 2014; 2: 31—37. [Карачева Ю.В., Гайдаш А.А., Прохоренков В.И. Изучение взаимосвязи акантолиза и апоптоза в патогенезе вульгарной пузырчатки. *Вестн дерматол венерол* 2014; (2): 31—37.]
2. Kubanov A.A., Znamenskaya L.F., Abramova T.V., Svishhenko S.I. Revisited diagnostics if true (acantholytic) pemphigus. *Vestn dermatol venerol* 2014; 6: 121—130. [Кубанов А.А., Знаменская Л.Ф., Абрамова Т.В., Свищенко С.И. К вопросам диагностики истинной акантолитической пузырчатки. *Вестн дерматол венерол* 2014; (6): 121—130.]
3. Grando S.A. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity* 2012; 45 (1): 7—35.
4. Matushevskaya E.V., Kubanova A.A., Samsonov V.A. i dr. Autoantibodies and autoantigenes in pemphigus and pemphigoid. *Vestn dermatol veneroli* 1995; 5: 28—33. [Матушевская Е.В., Кубанова А.А., Самсонов В.А. и др. Аутоантитела и аутоантигены при пузырчатке и пемфигоиде. *Вестн дерматол венерол* 1995; (5): 28—33.]
5. Stanley J.R., Yaar M., Hawley-Nelson P. et al. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982; 70: 281—288.
6. Delva E., Jennings J.M., Calkins C.C., Kottke M.D., Faundez V., Kowalczyk A.P. Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and esmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *J BiolChem* 2008; 283: 18303—18313.
7. Koga H., Tsuruta D., Ohyama B. Desmoglein 3, its pathogenicity and a possibility for therapeutic target in pemphigus vulgaris. *Expert Opin-Ther Targets* 2013; 17 (3): 293—306.
8. Matushevskaya E.V., Svirshhevskaya E.V., Dzutseva I.R., Togoeva L.T., Lapshina T.P. Changes of anti-Dsg3 autoantibodies levels in serum of pemphigus patients before and after treatment. *Vestn dermatol venerol* 2005; 6: 12—16. [Матушевская Е.В., Свищевская Е.В., Дзутцева И.Р., Тогоева Л.Т., Лапшина Т.П. Изменение уровня антител к десмоглеину-3 в сыворотках крови больных пузырчаткой до и после лечения. *Вестн дерматол венерол* 2005; (6): 12—16.]
9. Cozzani E., Di Zenzo G., Riva S., Calabresi V., Sera F., Drosera M., Parodi A. Are clinical phenotype and autoantibody profile always concordant in pemphigus? A study in a cohort of pemphigus patients. *Eur J Dermatol* 2013 Jan-Feb; 23 (1): 40—48.
10. Schiltz J.R., Michel B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 1976 Aug; 67 (2): 254—60.
11. Farb R.M., Dykes R., Lazarus G.S. Anti-epidermal-cell-surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Proc Natl AcadSci USA* 1978 Jan; 75 (1): 459—463.
12. van der Wier G., Pas H.H., Jonkman M.F. Experimental human cell and tissue models of pemphigus // *Dermatol Res Pract.* — 2010. — 143871.
13. Anhalt G.J., Labib R.S., Voorhees J.J. et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *J. Med* 1982. 306: 20: 1189—1196.
14. Mascaró J.M. Jr., España A., Liu Z., Ding X., Swartz S.J., Fairley J.A., Diaz L.A. Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Oct; 85 (1): 90—96.
15. Osterman L.A. Research techniques of proteins and nucleic acids. electrophoresis and centrifugation. *EHlektroforez i ul'tratsentrifugirovanie.* M.: Nauka 1981: 288. [Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука 1981: 288.]

об авторах:

А.А. Кубанов — д.м.н., зам. директора по научной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, зав. кафедрой дерматовенерологии, микологии и косметологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва
 А.Э. Карамова — к.м.н., зав. отделом дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 К.В. Рог — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 Т.В. Абрамова — к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии, микологии и косметологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва
 В.А. Смольяникова — д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва
 А.Н. Мурашев — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории биологических испытаний ФГБУН ФИБХ РАН, Пущино
 Д.А. Бондаренко — к.фарм.н., научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФГБУН ФИБХ РАН, Пущино

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье