

A pikkelysömör kísérletes állatmodelljei

Animal models of psoriasis

HORVÁTH SZABINA, GYULAI ROLLAND DR.

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika, Pécs

ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a humán betegségek háttérében álló genetikai, molekuláris és immunológiai mechanizmusok feltárásának nélkülözhetetlen eszközeivé váltak az in vivo egérmodellek. A komplex, multigénes betegségek, mint a pikkelysömör; állatmodellekkel történő helyettesítése ugyanakkor rendkívül nagy kihívást jelent a kutatók számára, illetve jelentős korlátokkal is jár. Ennek ellenére az elmúlt 4 évtizedben több, mint 40 egérmodellt írtak le a pikkelysömör patomechanizmusának vizsgálatára. Jelen tanulmányban összefoglaljuk a pikkelysömör vizsgálatára alkalmas modellrendszerek típusait, azok előnyeit és hátrányait.

Kulcsszavak:
pikkelysömör – betegségmodell
– bőrgyulladás – imiquimod

SUMMARY

Recently, in vivo mouse models have become indispensable tools for understanding the genetic, molecular and immune mechanisms contributing to the development of human diseases. Modeling a complex, multigenic disease such as psoriasis in animal has proven extremely challenging for researchers and has several limitations. In spite of this over the last four decades, more than 40 mouse models have been described for the investigation of psoriasis. In this study, we summarize the types of psoriasis-like model systems, their advantages and disadvantages.

Key words:
psoriasis – disease model
– skin inflammation – imiquimod

Az ideális állatmodell a betegség etiológiáját, patofiziológiáját, tüneteit és gyógyszerekre való érzékenységét egyaránt jól utánozza. A jelenleg rendelkezésre álló modellek a fenti kritériumok összességét ugyan nem teljesítik, azonban egy adott kérdéskör megválaszolására megfelelően bizonyultak. Az adott modellrendszer genetikai és/vagy biológiai alapja határozza meg, hogy a humán betegség mely folyamatainak vizsgálatára alkalmas. A pikkelysömör kutatásában használatos egérmodellek között megkülönböztethetünk többek között akut (indukálható), genetikailag módosított (transzgenikus) és xenograft (humanizált) modelleket. Ezeknek a modelleknek a típusait foglalja össze az 1. táblázat, kiemelve alkalmazásuk előnyeit és hátrányait, amely tükrözi egy olyan multigénes humán betegség, mint a pikkelysömör modellezésének komplexitását.

Akut (indukálható) modellek

Az akut modellrendszerek esetében helyi kezelés, intra-dermális injekció vagy az epidermális barrier károsodása indukálja a pikkelysömör-szerű tünetek (bőrpír, hámlás, epidermisz megvastagodása, sejtes infiltráció) kialakulását. Ide

sorolhatók azok a modellek, amelyek esetén a gyulladásos reakciót az immunrendszer sejtjeit aktiváló kémiai anyagok [imiquimod (IMQ), oxazolone, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)] ismételt alkalmazásával váltják ki az egerek bőrén (1, 2). A modellek egy másik csoportja esetén a bőrreakció indukálása proinflammatorikus citokinek (pl: IL-23) (3) vagy antigének intradermális injekciójával történik. Szintén kiváltható psoriasisiform bőrgyulladás az epidermális barrier károsításával, úgynevezett tape-stripping módszer segítségével (ennek során az egerek bőrére egymás után többször ragtapaszt helyeznek fel, majd húznak le, mely a stratum corneum rétegeinek eltávolítását eredményezi) (4). Az IMQ-indukált psoriasisiform dermatitisz modell elterjedését követően az akut vagy indukálható modellek igen gyorsan a leggyakrabban használt rendszerekké váltak a pikkelysömör tanulmányozására.

Az akut modellrendszerek előnyei, hogy könnyen használhatóak, költséghatékonyak és a gyulladásos reakció gyors (5-7 nap alatti) kiváltását teszik lehetővé. Az akut modellek alkalmazásával speciális genetikai háttérű egértörzsekben is lehetővé vált a pikkelysömörre jellegzetes gyulladásos folyamatok tanulmányozása, illetve a pik-

Levelező szerző: Horváth Szabina
e-mail: horvath.szabina@pte.hu

Modell típusa	Előnyök	Hátrányok
Akut (indukálható)	<ul style="list-style-type: none"> – könnyen használható, idő- és költséghatékony – betegség fenotípusának tanulmányozása a fejlődés különböző stádiumaiban – minimális gyakorlati képzettséget igényel 	<ul style="list-style-type: none"> – kémiai anyagok vagy vivőanyagok nem kívánt mellékhatásai – standardizált protokollok hiánya – elhúzódó gyulladós állapot tanulmányozására nem alkalmas
Genetikailag módosított (transzgenikus)	<ul style="list-style-type: none"> – lehetővé teszi a génspecifikus hatások <i>in vivo</i> nyomonkövetését 	<ul style="list-style-type: none"> – embrionális/prenatális halálozás – idő-, költség- és munkaigényes – komplex, multigénes betegségeknél egy gén módosítása – nehézségek a vizsgált gén sejt- és szövetspecifikus hatásainak vizsgálatában
Szövetspecifikus	<ul style="list-style-type: none"> – a génmódosítás specifikus sejtpopulációra vagy szövettípusra korlátozódik – túlexpresszázó vagy KO konstrukciók 	<ul style="list-style-type: none"> – munkaigényes – embrionális/prenatális halálozás – más gének expresszióját is befolyásolhatja – a vizsgált gén nem várt expresszióját eredményezheti
Xenograft (humanizált)	<ul style="list-style-type: none"> – leginkább reprodukálja a humán betegség fenotípusos, immunológiai, és genetikai tulajdonságait 	<ul style="list-style-type: none"> – technikai képzettséget igényel – idő-, költség- és munkaigényes – fenotípusos variáció a donor szövetek között – gazdaszervezet befolyásoló hatása

1. táblázat

A pikkelysömör kutatásában használt modellrendszerek előnyei és hátrányai

kelysömör kezelésében potenciálisan alkalmazható vegyületek/anyagok tesztelését is el lehet végezni. Az akut modellrendszerek elterjedése a preklinikai vizsgálatok felfordulását vonta maga után, amit jól tükröz azoknak a publikációknak az egyre növekvő száma, amelyben az IMQ-indukált psoriasiform dermatitisz modellt használják. Jelenleg több, mint 85 transzgenikus modellben alkalmazták az imiquimodot a gyulladós reakció kiváltására (5). Kutatócsoportunk ezt a modellt alkalmazva igazolta a Transziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák gyulladáscsökkentő hatását a bőrgyulladás folyamatában (6). Indukálható modellek használatával lehetőség nyílik a betegség fenotípusának tanulmányozására a fejlődés kü-

lönöző stádiumaiban is, különböző életkorú egerek alkalmazásával.

Az akut modellrendszerek azonban jelentős korlátokkal is rendelkeznek. Elsődleges hátrányuk a kiváltott bőrgyulladás nem specifikus jellegének tulajdonítható. Ez abban az esetben különösen problémás, amikor egymással klinikailag és/vagy szövettanilag átfedő humán bőrbetegségeket modellezünk (például pikkelysömör, szisztémás lupus erythematosus, atópiás dermatitisz). A szakirodalomban több olyan példa is fellelhető, amelyben a pikkelysömör vizsgálatára általánosan használt modelleket más etiológiájú humán betegségek tanulmányozására is használják (pl. IMQ-indukált bőrgyulladást szisztémás lupus erythematosus modelljeként)

(7). Az akut modellek további hátrányai a gyulladási reakció kiváltásának módszertanához kapcsolódnak. Jelenleg nem áll rendelkezésre standardizált protokoll a gyulladást kiváltó kémiai anyagok helyi alkalmazására vagy intradermális injekciójára vonatkozóan. A szakirodalomban különböző variációkat találunk a kezelés gyakoriságára, időtartamára, a felhasznált vegyületek gyártójára, az alkalmazott dózisokra és koncentrációkra, az egerek genetikai hátterére, állatházi körülményeire, és a kezelt anatómiai területre vonatkozóan. Ezek a módszertani különbségek megnehezítik az egyes kutatási eredmények értelmezését és összehasonlítását, valamint magyarázatot adnak arra, hogy miért jelent olyan nagy kihívást a kutatási eredmények reprodukálhatósága. Az akut modellrendszerek nem használhatóak hosszútávú kezelésekre, így nem képesek reprodukálni a pikkelysömörös betegeknek megfigyelhető elhúzódó gyulladási állapotot és a társbetegségeket sem (8).

Genetikailag módosított (transzgenikus) modellek

A molekuláris biológia fejlődésének köszönhetően lehetővé vált kiválasztott gének és azok fehérjéinek túlexpresszállatásán vagy funkcióvesztésén alapuló egérmodellek létrehozása. Az akut modellrendszerekkel ellentétben a transzgenikus egerek olyan génmódosításokat tartalmaznak, amelyek már születéskor jelen vannak, és minden sejtípust érintenek [csírvonal vagy egész test knockout (KO)]. A KO egerek egyik legnagyobb előnye, hogy a gén hiánya lehetővé teszi a génspecifikus változások *in vivo* nyomkövetését. Ez a technológia alkalmas a klinikai fenotípus hátterében álló genetikai és molekuláris biológiai mechanizmusok tanulmányozására, és ezáltal bepillantást nyújt a betegség etiológiájába.

A humán betegség tanulmányozására használt leggyakoribb KO egerek az $IL1rn^{-/}$ (9) és a hipomorf CD18-null egértörzsek (10), amelyek esetében a pszoriázis-szerű fenotípus spontán kialakulása figyelhető meg. A hipomorf CD18-null egerek azokban a leukocita 2 integrinokban hordoznak mutációt, amelyek a sejt-sejt kapcsolatokért felelősek a különböző gyulladási során. Az egerek bőrben a T limfocita infiltráció hámphiperpláziát, túlzott keratinocita proliferációt és dilatált kapillárisokat eredményez, parakeratózissal és mikroabszcesszus-képződéssel.

Az Interleukin-1 (IL-1) számos immunológiai folyamat (pl. proinflammatorikus citokinek aktivációja, adhéziós faktorok termelése, monociták és B limfociták proliferációja) kulcsfontosságú szabályozó molekulája. Így az $IL1rn^{-/}$ törzsnél a gyulladási válasz kialakulása a dendritikus sejtek és a T limfociták infiltrációját eredményezi az epidermiszbe, ami annak megvastagodásához, parakeratózishoz és mikroabszcesszusok kialakulásához vezet.

A KO egerek hátránya, hogy költség-, munka- és időigényes a létrehozásuk, és gyakran az egerek korai halálához vezet. Egyetlen gén módosítása nem képes reprezentálni az olyan komplex, multigénes betegségeket, mint a pikkelysömör. Továbbá, a minden sejtípusban bekövetkező ge-

netikai változás korlátozza a megfigyelt fenotípus kialakulásáért felelős sejtpopulációk vagy szövetek azonosításának lehetőségét.

Ugyanakkor lehetőség van olyan transzgenikus egerek létrehozására is, ahol egy specifikus gén promóter (keratin 5 vagy 14) szabályozása vagy a génexpresszió modulálása (tetraciklin, doxyciklin, tamoxifen) által (11, 12) a génmódosítás csak bizonyos szövettípusra vagy sejtpopulációra korlátozódik. Ebben az esetben lehetőség van olyan kísérletek tervezésére, amelyekkel meghatározható egy adott gén hozzájárulása a fenotípushoz vagy a betegséghez. A K14-AREG, K14-VEGF és a K5-Stat3C egérmodellekben például egy-egy gén K14 vagy K5 promóter által irányított, csak az epidermiszre korlátozott, fokozott expressziója pszoriázis-szerű fenotípus kialakulásához vezet (4, 13, 14). A szövetspecifikus transzgenikus egérmodellek hátránya, hogy a génmódosítások az egerek korai halálához vezethetnek, más gének expresszióját is befolyásolhatják, illetve a vizsgált gén nem várt expresszióját eredményezhetik.

A CRISPR/Cas9 rendszer felfedezésével a bőrgyógyászati kutatásokban is lehetővé vált olyan transzgenikus egerek létrehozása, amelyben több gén egyidejű módosítása válik lehetővé (15).

Xenograft (humanizált) modellek

A xenograft egérmodelleket úgy hozzák létre, hogy pikkelysömörös betegektől származó tünetes vagy tünetmentes bőrszövetet immunhiányos egerek hátbőrre transzplantálnak (16). A súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egereket, melyek T-sejt és B-sejt deficienciával rendelkeznek, széles körben alkalmazzák a xenograft modellekben. Ezek az egértörzsek a szilárd szövetek, így az emberi bőr átültetését tolerálják. Nickoloff és munkatársai mutatták ki, hogy a SCID egerekre transzplantált tünetmentes bőrgraftba pikkelysömörös betegektől származó T-sejtek injektálása pszoriázisos plakk kialakulását indukálja. Ez a kísérlet további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a pikkelysömör T-sejtek által mediált betegség (17).

A xenograft modellekben gyakran használt másik egértörzs a hármasknockout AGR129, melyet az I. és II. típusú IFN receptor, valamint a Rag-2 (recombinase activating gene-2) gén hiánya jellemez. Így ezek az egerek sem rendelkeznek T- és B-sejtekkel, viszont a SCID egerekkel ellentétben az NK sejtek itt inaktívak. Boyman és munkatársai megfigyelték, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrgraft transzplantációja AGR129 egerekre, spontán, T-sejt injekció nélkül eredményezte a pikkelysömörös plakkok kialakulását. Ezzel igazolták, hogy a humán transzplantált bőrben lévő T-sejtek aktiválódnak és proliferálódnak, ami epidermális léziók kialakulásához vezet (18).

A xenograft modellek legnagyobb előnye, hogy emberi szöveteket alkalmaznak, így jelenleg ezek a modellek reprodukálják legjobban a humán betegség jellegzetes genetikai, fenotípusos és immunpatológiai elváltozásait. A xenograft modellek hátrányai, hogy igen széleskörű technikai tudást és jelentős mennyiségű donor szövetet igényel az eljárás. A

humán donorok közötti immunológiai és genetikai különbségek miatt jelentős fenotípusos variáció figyelhető meg, valamint nem elhanyagolható a gazdaszervezet befolyásoló hatása (pl. a pikkelysömörhöz társuló citokin expresszió hiánya miatt) sem.

Annak ellenére, hogy az egérmodellek létrehozását lehetővé tevő technológiák rohamosan fejlődnek, jelenleg nem áll rendelkezésre olyan modellrendszer, amely teljes mértékben reprodukálná a humán pikkelysömör minden jellegzetességét. A pikkelysömör komplexitása, kombinálva az egér biológiájának bonyolultságával, igen nagy kihívás elé állítja a kutatókat. Bár úgy tűnik, hogy a humán betegség tökéletes modellezése egérben szinte elérhetetlen, szükség van a már meglévő modellek továbbfejlesztésére, új modellrendszerek létrehozására és a laboratóriumi protokollok standardizálására.

Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését a PEPSYS-GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú projekt támogatta.

IRODALOM

1. *van der Fits L., Mourits S., Voerman J. S. A. és mtsai.:* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol.* (2009) *182*, 5836–45.
2. *Stanley P. L., Steiner S., Havens M. és mtsai.:* Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol.* (1991) *4(4)*, 262–71.
3. *Hedrick M. N., Lonsdorf A. S., Shirakawa A.-K. és mtsai.:* CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *J Clin Invest.* (2009) *119(8)*, 2317–29.
4. *Sano S., Chan K. S., Carbajal S. és mtsai.:* Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med.* (2005) *11(1)*, 43–9.
5. *Hawkes J. E., Gudjonsson J. E., Ward N. L.:* The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. *J Invest Dermatol.* (2017) *137(3)*, 546–9.
6. *Kemény Á., Kodji X., Horváth S. és mtsai.:* TRPA1 acts in a protective manner in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in mice. *J Invest Dermatol.* (2018).
7. *Yokogawa M., Takaishi M., Nakajima K. és mtsai.:* Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* (2014) *66(3)*, 694–706.
8. *Hawkes J. E., Adalsteinsson J. A., Gudjonsson J. E. és mtsai.:* Research Techniques Made Simple: Murine Models of Human Psoriasis. *J Invest Dermatol* (2018) *138(1)*, 1–8.
9. *Shepherd J., Little M. C., Nicklin M. J. H.:* Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. *J Invest Dermatol.* (2004) *122(3)*, 665–9.
10. *Bullard D. C., Scharffetter-Kochanek K., McArthur M. J. és mtsai.:* A polygenic mouse model of psoriasiform skin disease in CD18-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* (1996) *93(5)*, 2116–21.
11. *Günschmann C., Chiticariu E., Garg B. és mtsai.:* Transgenic mouse technology in skin biology: Inducible gene knockout in mice. *J Invest Dermatol.* (2014) *134(7)*, 1–4.
12. *Scharfenberger L., Hennerici T., Kiraly G. és mtsai.:* Transgenic mouse technology in skin biology: generation of complete or tissue-specific knockout mice. *J Invest Dermatol.* (2014) *134(1)*, 1–5.
13. *Cook P. W., Piepkorn M., Clegg C. H. és mtsai.:* Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest.* (1997) *100(9)*, 2286–94.
14. *Detmar M., Brown L. F., Schon M. P. és mtsai.:* Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol.* (1998) *111(1)*, 1–6.
15. *Guitart J. R. J., Johnson J. L., Chien W. W.:* Research Techniques Made Simple: The Application of CRISPR-Cas9 and Genome Editing in Investigative Dermatology. *J Invest Dermatol.* (2016) *136(9)*, e87–93.
16. *Zollner T. M., Renz H., Igney F. H. és mtsai.:* Animal models of T-cell-mediated skin diseases., *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* (2004), 693–6.
17. *Nickoloff B. J., Kunkel S. L., Burdick M. és mtsai.:* Severe combined immunodeficiency mouse and human psoriatic skin chimeras. Validation of a new animal model. *Am J Pathol.* (1995) *146(3)*, 580–8.
18. *Boyman O., Hefti H. P., Conrad C. és mtsai.:* Spontaneous Development of Psoriasis in a New Animal Model Shows an Essential Role for Resident T Cells and Tumor Necrosis Factor- . *J Exp Med.* (2004) *199(5)*, 731–6.

Érkezett: 2018. 06. 29.

Közlésre elfogadva: 2018. 07. 04.