

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ СТРУКТУРНИХ, АДГЕЗИВНИХ І РЕГУЛЯТОРНИХ БІЛКІВ ФІБРОБЛАСТІВ ЛЕГЕНЬ ТА ШКІРИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

М. Гриценко

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна
пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна
e-mail: masha.offshorebox@gmail.com*

Вивчено експресію генів структурних і регуляторних білків міжклітинного матриксу в культурах фібробластів легень і шкіри білих щурів віком 0,5, 1, 3 та 24 місяці. Динаміка рівня експресії та накопичення досліджуваних білків в онтогенезі в обох культурах якісно подібна, але її максимуми відзначаються в них у різному віці. В обох культурах вміст колагену I типу підвищується, а колагену III типу, еластину і фібронектину з віком знижується. Ці вікові особливості суттєво більші в культурі фібробластів шкіри. Рівень експресії генів матриксних металопротеїназ (ММП) 1, 2, 9 знижено в клітинах старих тварин в обох культурах. Максимальна концентрація всіх трьох ферментів у них спостерігається на початку постнатального онтогенезу. Експресія генів тканинних інгібіторів металопротеїназ (ТІМП) 1 і 2 мають однакову вікову динаміку в культурах фібробластів обох органів. При цьому гени ТІМП1 максимально експресуються в клітинах 24-місячних, а ТІМП2 – в клітинах молодих тварин. Таким чином, практично для всіх досліджуваних білків та їхніх генів показано зниження інтенсивності експресії та накопичення їхніх продуктів у клітинах старих тварин.

Ключові слова: фібробласти, колаген, еластин, фібронектин, матриксні металопротеїнази.

Вивчення фібробластів легень і шкіри в умовах *in vitro* допомагає зрозуміти роль генетичних факторів у становленні та підтримці функцій сполучної тканини даних органів у різні періоди онтогенезу. Метою роботи було дослідити специфіку експресії генів білків міжклітинного матриксу (МКМ) – $\alpha 1$ -ланцюгів колагену типів I і III, еластину, фібронектину, ММП і ТІМП у фібробластах легень і шкіри щурів у постнатальному онтогенезі.

Матеріали і методи

Донорами фібробластів були безпородні білі щури чотирьох вікових груп (0,5, 1, 3 і 24 місяці). Тканини подрібнювали в середовищі DMEM, що містить 1% трипсину. Після 30-хвилинної інкубації при 37 °C клітини збирали і сіяли в вентильовані культуральні флакони в поживне середовище DMEM, що містить 10 % FBS, і проводили їх культивування. Клітини культивували при 37 °C і вологості 95 % за наявності 5 % CO₂ (Nuair 4500, США). За прикріпленням клітин і щільністю клітинної культури стежили за допомогою інвертованого мікроскопа Carl Zeiss Telaval. У роботі використовували фібробласти 3-го пасажу. Аналіз експресії генів проводили на ДНК-мікрочипах виробництва Arrayit (США). Загальну РНК з клітин виділяли на спин-колонках набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Синтез кДНК зворотною транскрипцією проводили наборами QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, США). У роботі використовували ген-специфічні праймери і Су3-мічені нуклеотиди виробництва Arrayit і Life Technologies (США) відповідно. Ампліфікацію проводили з використанням термоциклера BIO-RAD iCycler. Кінцеву кількість виробленого білкового продукту вимірювали імунохімічно на антитіло-кон'югованих ELISA-мікрочипах з вико-

ристанням наборів реактивів Antibody Array Assay Kit (KAS20, Full Moon BioSystems, Inc., США). Отримані результати виражали в одиницях флуоресценції – rFLU в розрахунку на 1 клітину. Результати обробляли статистично за допомогою критерію Манна-Уїтні [3].

Результати і їхнє обговорення

За даними табл. 1 і табл. 2, експресія гена $\alpha 1$ -ланцюгів колагену I та вміст його продукту максимальні в культурі фібробластів легень 24-місячних тварин. У культурі фібробластів шкіри максимума цих показників спостерігаються у 3- та 24-місячних тварин відповідно. Експресія гена $\alpha 1$ -ланцюгів колагену III найбільша в культурах фібробластів легень і шкіри 1- та 0,5-місячних тварин, а вміст ланцюгів у цих культурах максимальний для 3- та 1-місячних тварин.

Таблиця 1

Експресія генів структурних білків міжклітинного матриксу, ферментів їх катаболізму та їхніх інгібіторів у культурах фібробластів легень і шкіри щурів різного віку, rFLU/клітину

Білок	Ген	Фібробласти легень				Фібробласти шкіри			
		0,5 міс	1 міс	3 міс	24 міс	0,5 міс	1 міс	3 міс	24 міс
Колаген, тип I, $\alpha 1$ ланцюг	Coll1a1	2613	3149*	4305*	4471*	2197	5417*	5512*	5177*
Колаген, тип III, $\alpha 1$ ланцюг	Col3a1	±52,11	±62,57	±86,17	±89,40	±43,94	±108,0	±110,0	±103,54
Еластин	Eln	2115	2643*	2472*	1093*	814	345*	316*	338*
Фібронектин	Fnl	±42,33	52,85	±49,10	±21,02	±16,28	±6,90	±6,32	±6,76
Матриксна металопротеїназа 1	MMP1	2952	2710*	2429*	2106	1485*	2660*	2107*	1189*
Матриксна металопротеїназа 2	MMP2	±59,01	±54,23	±48,26	±42,18	±29,70	±53,20	±42,14	±23,78
Матриксна металопротеїназа 9	MMP9	1135	1529*	1671*	1905*	945	2624*	2135*	2161*
Інгібітор	TIMP1	±22,77	±30,33	±33,40	±38,19	±18,9	±52,48	±42,70	±43,22
Інгібітор	TIMP2	473	519*	230*	218*	384	883*	288*	244*
Інгібітор	TIMP2	±9,44	10,40	±4,65	±4,43*	±7,68	±17,66	±5,76	±4,88
Інгібітор	TIMP2	361	475*	328*	344*	289	807*	413*	387*
Інгібітор	TIMP2	±7,25	±9,44	±6,60	±6,89	±5,78	±16,14	±8,26	±7,74
Інгібітор	TIMP2	329	305*	217*	224*	262	514*	271	251
Інгібітор	TIMP2	±6,60	±6,11	±4,33	±4,55	±5,24	±10,28	±5,42	±5,02
Інгібітор	TIMP2	93	87	241*	350*	62	138*	302*	394*
Інгібітор	TIMP2	±1,91	±1,71	±4,85	±7,05	±1,24	±2,76	±6,04	±7,88
Інгібітор	TIMP2	79	114*	41*	32*	50	184*	53	32*
Інгібітор	TIMP2	±1,61	±2,31	±0,81	±0,65	±1,0	±3,68	±1,06	±0,64

Примітка: * – вірогідно щодо віку 0,5 місяця; $p \leq 0,05$.

Експресія гена еластину найбільш інтенсивна в культурах фібробластів легень і шкіри 0,5- та 3-місячних тварин, а накопичення його продукту максимальне в культурах 3- та 1-місячних тварин відповідно. Таким чином, з віком змінюється баланс колаген-еластин у бік збільшення частки колагену, що може бути причиною зниження еластичності сполучної тканини [1, 5, 6]. Ген фібронектину в культурі фібробластів легень максимально експресується у 24-місячних тварин, а кількість його продукту найбільша у 3-місячних щурів. У культурі фібробластів шкіри максимума експресії та накопичення фібронектину спостерігаються в клітинах 1-місячних тварин. Отже, здатність клітин до адгезії знижується в культурах обох типів [1].

Зміна кількості білків МКМ визначається їх самовідновленням, в якому, крім синтезу, постійно йде процес протеолізу, що здійснюється ММП і контролюється їх ТІМП [4]. У культурах фібробластів легень експресія генів ММП1 і ММП2 максимальна в клітинах 1-місячних тварин, а ММП9 в клітинах 0,5-місячних тварин; максимальний вміст продуктів даних генів спостерігається в клітинах 3-місячних щурів. У культурах фібробластів шкіри експресія і накопичення продуктів генів ММП (1, 2, 9) максимальні в клітинах 1-місячних тварин. Експресія гена ТІМП1 зростає з віком у культурі як фібробластів легень, так і фібробластів шкіри, в той час як накопичення його продукту в культурі фібробластів легень під-

Таблиця 2

Накопичення структурних білків міжклітинного матриксу, ферментів їх катаболізму і їхніх інгібіторів в культурах фібробластів легень і шкіри щурів різного віку, rFLU / клітину

Білок	Ген	Фібробласти легень				Фібробласти шкіри			
		0,5 міс	1 міс	3 міс	24 міс	0,5 міс	1 міс	3 міс	24 міс
Колаген, тип I, α1 ланцюг	Col1a1	5056	5688	6952	8201*	4830	7423	8086	9271
Колаген, тип III, α1 ланцюг	Col3a1	4250	4781	5839	4718	962	1400	980	749
Еластин	Eln	±85,0	±96,0	±11,10	±94,13	±19,24	±28,0	±19,60	±14,98
Фібронектин	Fn1	4362	4907	5967*	4619	3511	5317	3466	1524
Матриксна металопротеїназа 1	MMP1	±87,20	±98,10	±120,10	±92,40	±70,22	±106,34	±69,32	±30,48
Матриксна металопротеїназа 2	MMP2	2498	2810	3375*	3185	2511	5250	3510	2681
Матриксна металопротеїназа 9	MMP9	±50,0	±56,20	±67,50	±63,0	±50,22	±105,0	±70,20	±53,62
Інгібітор металопротеїнази 1	TIMP1	917	1032	1261*	540*	1472	2025	623	399
Інгібітор металопротеїнази 2	TIMP2	±18,30	±20,60	±25,20	±10,80	±29,44	±40,50	±12,46	±7,98
		765	861	1052*	629	1296	1885	819	569
		±15,30	±17,21	±21,0	±1390,0	±25,92	±37,70	±16,38	±11,38
		823	926	1131*	994	1386	1911	1160	822
		±16,40	±83,50	±22,60	±19,90	±27,72	±38,22	±23,20	±16,44
		453	510	623*	626*	1061	1230	795	559
		±6,70	±10,20	±12,60	±12,50	±21,22	±24,60	±15,90	±11,18
		525	591	691*	430	1246	1342	597	407
		±10,50	±11,80	±13,90	±8,60	±24,92	±26,84	±11,94	±8,14

Примітка: * – вірогідно щодо віку 0,5 місяця; $p \leq 0,05$

вищується, а в культурі клітин шкіри знижується упродовж онтогенезу. Максимальна інтенсивність експресії TIMP2 у фібробластах шкіри і легень спостерігається в 1-місячному віці, а вміст продукту даного гена найбільший у культурі фібробластів легень 3-місячних, та в культурі фібробластів шкіри 0,5-місячних щурів. Ці особливості генної експресії визначають перманентні зміни кількісного та якісного складу структурних біополімерів міжклітинного матриксу, за рахунок підвищення концентрації колагену I типу та зниження концентрацій колагену III типу й еластину, що призводить до зміни функціонального складу сполучної тканини, в першу чергу, підвищення її жорсткості та зниження еластичності з віком [2].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Akiyama S.K., Nagata K., Yamada K.* Cell surface receptors for extracellular matrix components // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1031. P. 91-110.
2. *Bailey A. J.* Molecular mechanisms of ageing in connective tissues // *Mechanisms of ageing and Development.* 2001. Vol. 122. P. 735-755.
3. *Glantz S.A.* Primer of Biostatistics // McGraw-Hill. 2007. P. 298.
4. *Parks W. C.* Matrix Metalloproteinases in lung repair // *Eur. Respir. J.* 2003 Vol. 22. Suppl. 44. P. 36-38.
5. *Sung-Gon Kim, Toshihiro Akaike, Tadashi Sasagawa et al.* Gene Expression of Type I and Type III Collagen by Mechanical Stretch in Anterior Cruciate Ligament Cells // *Cells Structure and Function.* 2002. Vol. 27. P. 139-144.
6. *Xin Xiong.* New Insights into Structure and Function of Type I Collagen // *Institute fur Grenzflächenverfahrenstechnik der Universitat Stuttgart.* 2008. P. 69.

GENE EXPRESSION OF STRUCTURAL ADHESIVE AND REGULATORY PROTEINS OF LUNG AND SKIN FIBROBLASTS OF RATS OF DIFFERENT AGES

M. Grytsenko

*V. N. Karazin Kharkiv National University
4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine
e-mail: masha.offshorebox@gmail.com*

Gene expression of structural and regulatory proteins of the intercellular matrix in lung fibroblasts cultures and skin of white rats under 0.5, 1, 3 and 24 months was studied. Dynamics of expression and accumulation of protein studied ontogeny in both cultures qualitatively similar, but its peaks are found in them at different ages. In both cultures content of collagen type I increased and collagen type III, fibronectin and elastin decreases with age. These age characteristics significantly larger in skin fibroblasts culture. The level of gene expression of matrix metalloproteinase (MMP) 1, 2, 9 is reduced in cells of old animals in both cultures. The maximum concentration of all three enzymes are observed in the early postnatal ontogenesis. Gene expression of tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP) 1 and 2 have the same age dynamics in cultures of fibroblasts of both organs. This TIMP1 most genes are expressed in cells of 24-month and TIMP2 – cells of young animals. Thus, for almost all of the studied proteins and their genes we show decrease of the gene expression intensity and product accumulation in cells of older animals.

Keywords: fibroblasts, collagen, elastin, fibronectin, matrix metalloproteinase.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ, АДГЕЗИВНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ И КОЖИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

М. Гриценко

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина
пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина
e-mail: masha.offshorebox@gmail.com*

Изучена экспрессия генов структурных и регуляторных белков межклеточного матрикса в культурах фибробластов легких и кожи белых крыс в возрасте 0,5, 1, 3 и 24 месяца. Динамика уровня экспрессии и накопления исследуемых белков в онтогенезе в обеих культурах качественно подобна, но ее максимумы отмечаются у них в разном возрасте. В обеих культурах содержание коллагена I типа повышается, а коллагена III типа, эластина и фибронектина с возрастом снижается. Эти возрастные особенности существенно больше в культуре фибробластов кожи. Уровень экспрессии генов матриксных металлопротеиназ (ММП) 1, 2, 9 снижен в клетках старых животных в обеих культурах. Максимальная концентрация всех трех ферментов в них наблюдается в начале постнатального онтогенеза. Экспрессия генов тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП) 1 и 2 имеет одинаковую возрастную динамику в культурах фибробластов обоих органов. При этом гены ТИМП1 максимально экспрессируются в клетках 24-месячных, а ТИМП2 – в клетках молодых животных. Таким образом, практически для всех исследуемых белков и их генов показано снижение интенсивности экспрессии и накопления их продуктов в клетках старых животных.

Ключевые слова: фибробласты, коллаген, эластин, фибронектин, матриксные металлопротеиназы.