

УДК: 577.12.577.112.577.2

**Експресія генів деяких цитокінів та кількість їхніх продуктів у культурах фібробластів шкіри та легенів щурів в онтогенезі**  
**М.А.Гриценко***Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*  
*gricenkomarija@gmail.com*

Вивчено експресію генів інтерлейкінів (ІЛ 1, 2, 6, 8, 10–13, 15,18), факторів росту фібробластів 1, 2, 8 та трансформуючих факторів росту  $\alpha$  та  $\beta 1$  в культурах фібробластів шкіри та легенів білих щурів у віці 0,5, 1, 3 та 24 місяці. Відомо, що саме ці молекули регулюють розвиток та відновлення сполучної тканини в постнатальному онтогенезі, разом з тим різні види сполучної тканини, в зв'язку з їхніми функціональними особливостями, розвиваються в неоднакових умовах та під впливом різних внутрішніх і зовнішніх факторів, але досі не досліджували вікову специфіку продукції даних молекул в клітинах сполучних тканин різних типів. Саме цьому в даній роботі порівняно вікову динаміку вказаних показників в культурах фібробластів, вилучених з різних органів – шкіри та легенів. Також визначений вміст продуктів генів цих цитокінів в культурах, з метою порівняння відношення продукції про- та протизапальних інтерлейкінів у культурах фібробластів шкіри та легенів. Обговорена вікова динаміка вказаних показників та її особливості в зв'язку з функціями досліджених цитокінів. Для генів всіх досліджених типів цитокінів – інтерлейкінів, факторів росту фібробластів та трансформуючих факторів росту – було зафіксовано зміну інтенсивності експресії та накопичення їх продуктів в постнатальному онтогенезі. Динаміка як інтенсивності експресії досліджуваних генів, так і накопичення їх продуктів якісно подібна в культурах клітин обох типів тканин, але для фібробластів шкіри вікові та кількісні коливання даних показників виражені сильніше. При цьому максимума експресії та концентрацій всіх трьох типів вивчених цитокінів знаходяться в інтервалі між 0,5 і 3 місяцями з істотними кількісними відмінностями як між цитокінінами різних типів, так і між культурами фібробластів легенів і шкіри. Значення відношення як експресії, так і накопичення продуктів генів протизапальних інтерлейкінів до прозапальних в онтогенезі зростає в культурах клітин обох типів фібробластів, що може відображати як особливості розвитку організму, так і зниження здатності до регенерації сполучної тканини з віком.

**Ключові слова:** *культура фібробластів, інтерлейкіни, фактори росту, вік.*

**Expression of some cytokine genes and amount of their products in fibroblast cultures from skin and lung of rats in ontogenesis**  
**M.A.Gritsenko**

The expression of interleukin (IL 1, 2, 6, 8, 10–13, 15, 18), fibroblast growth factors 1, 2, 8, and transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta 1$  genes in skin and lung fibroblast cultures (donors – white rats at the age of 0.5, 1, 3 and 24 months) was studied. It is known that these molecules regulate the development and restoration of connective tissue in postnatal ontogenesis, at the same time, different types of connective tissue, in connection with their functional characteristics, develop under unequal conditions and under the influence of various internal and external factors, but not yet investigated the age specificity of the production of these molecules in the cells of connective tissue of various types. That is why, in this paper, the age dynamics of these indicators was compared in cultures of fibroblasts taken from various organs – skin and lungs. The content of the products of these cytokine genes in cultures was also determined, in order to compare the ratio of production of pro- and anti-inflammatory interleukins in cultures of skin and lung fibroblasts. The age dynamics of these indices and its features in connection with the functions of the cytokines studied are discussed. For the genes of all investigated types of cytokines – interleukins, fibroblast growth factors and transforming growth factors – a change in the intensity of expression and accumulation of their products in postnatal ontogenesis was recorded. Dynamics of both the expression intensity of the studied genes and the accumulation of their products is qualitatively similar in cell cultures of both types of tissues, but for skin fibroblasts the age and quantitative variations of these parameters are more pronounced. The maxima of expression and concentrations of all three types of cytokines studied are between 0.5 and 3 months with significant quantitative differences both between cytokinins of different types and between cultures of fibroblasts of the lungs and skin. The significance of the ratio of both expression and accumulation of the products of the anti-inflammatory interleukin genes to pro-inflammatory genes in ontogeny increases in cell cultures of both types of fibroblasts, it can reflect both the developmental features of the organism and the decrease in the ability to regenerate connective tissue with age.

**Key words:** *fibroblast culture, interleukins, growth factors, age.*

## Експресія генів деяких цитокінів і кількість їх продуктів в культурах фібробластів шкіри і лёгких крыс в постнатальному онтогенезі

М.А.Гриценко

Изучена експресія генів інтерлейкінів (ІЛ 1, 2, 6, 8, 10–13, 15, 18), факторів росту фібробластів 1, 2, 8 і трансформуючих факторів росту  $\alpha$  і  $\beta$ 1 в культурах фібробластів шкіри і лёгких білих крыс в віці 0,5, 1, 3 і 24 місяці. Відомо, що саме ці молекули регулюють розвиток і відновлення з'єднаної тканини в постнатальному онтогенезі, разом з тим різні види з'єднаної тканини, в зв'язі з їх функціональними особливостями, розвиваються в неоднакових умовах і під впливом різних внутрішніх і зовнішніх факторів, але до сих пор не досліджували вікову специфіку продукції даних молекул в клітках з'єднаної тканини різних типів. Саме тому в даній роботі порівнювали вікову динаміку вказаних показателів в культурах фібробластів, взятих з різних органів – шкіри і лёгких. Також визначено вміст продуктів генів цих цитокінів в культурах, з метою порівняння співвідношення продукції про- і протизапальних інтерлейкінів в культурах фібробластів шкіри і лёгких. Обговорено вікову динаміку вказаних показателів і її особливості в зв'язі з функціями досліджуваних цитокінів. Для генів всіх досліджуваних типів цитокінів – інтерлейкінів, факторів росту фібробластів і трансформуючих факторів росту – було зафіксовано зміну інтенсивності експресії і накоплення їх продуктів в постнатальному онтогенезі. Динаміка як інтенсивності експресії досліджуваних генів, так і накоплення їх продуктів якісно подібна в культурах кліток обох типів тканин, але для фібробластів шкіри вікові і кількісні коливання даних показателів виражені сильніше. При цьому максимуми експресії і концентрацій всіх трьох типів досліджуваних цитокінів знаходяться в інтервалі між 0,5 і 3 місяцями з суттєвими кількісними відмінностями як між цитокінами різних типів, так і між культурами фібробластів лёгких і шкіри. Значення співвідношення як експресії, так і накоплення продуктів генів протизапальних інтерлейкінів до прозапальних в онтогенезі зростає в культурах кліток обох типів фібробластів, що може відображати як особливості розвитку організму, так і зниження здатності до регенерації з'єднаної тканини з віком.

**Ключові слова:** культура фібробластів, інтерлейкіни, фактори росту, вік.

### Вступ

В онтогенезі з'єднаної тканини важливу роль відіграють молекули, що регулюють її розвиток, зокрема важливі регулятори функціонування фібробластів – цитокіни (Кетлінський, Симбірцев, 2008; Coutoul, Deng, 2003 та ін.). Але досі не було робіт, в яких би досліджували вікові особливості продукції цих регуляторних молекул протягом постнатального онтогенезу. При цьому різні види з'єднаної тканини, в зв'язку з їхніми функціональними особливостями, розвиваються в неоднакових умовах та під впливом різних внутрішніх і зовнішніх факторів.

Тому метою даної роботи було порівняти вікову динаміку експресії генів трьох типів цитокінів – інтерлейкінів (ІЛ), факторів росту фібробластів (ФРФ) і трансформуючих факторів росту (ТФР) та накоплення їх продуктів в культурах фібробластів функціонально відмінних типів з'єднаної тканини – легенів та шкіри, а також відношення продукції про- та протизапальних інтерлейкінів в цих культурах.

### Матеріали та методи

Донори фібробластів – безпородні білі щури 4-х вікових груп (0,5, 1, 3 і 24 місяці). Тканини, що вивчалися, подрібнювали в середовищі DMEM, що містить 1% трипсину. Після 30-хвилинної інкубації при 37°C клітини збирали і сіяли в вентильовані культуральні флакони в живильне середовище DMEM, що містить 10% FBS, та проводили їх культивування при 37°C і вологості 95% в присутності 5% CO<sub>2</sub> (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-мікročіпах виробництва Arrayit (США). РНК з клітин виділяли на спінін-колонках набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Синтез кДНК зворотньою 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. Ампліфікації проводили з використанням термоциклера BIO-RAD iCycler. Кінцеву кількість виробленого білкового продукту вимірювали імунохімічно на

антитіло-кон'югованих ELISA-мікрочіпах з використанням 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 непараметричного методу Wilcoxon-Mann-Whitney. Відмінності вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

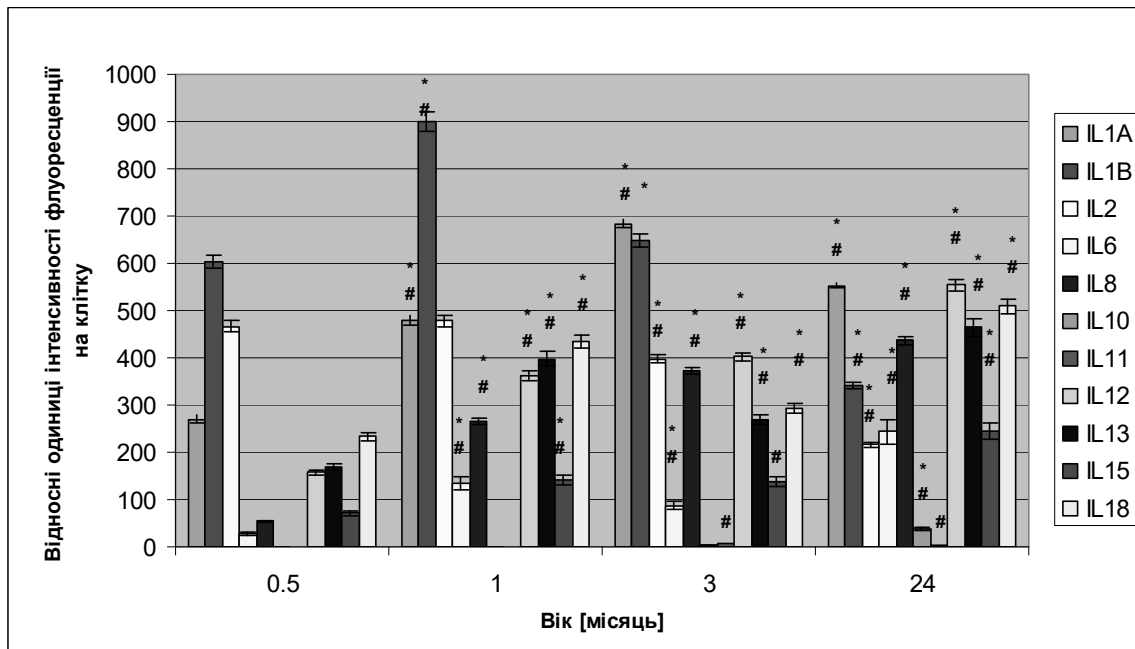
Результати дослідження експресії генів інтерлейкінів і накопичення їх продуктів фібробластами шкіри і легенів представлені на рис. 1–8.

Ген інтерлейкіну (ІЛ) 1 $\alpha$ , одного з найбільш сильних прозапальних факторів з множинною дією (Кетлинский, Симбирцев, 2008; Jun-Ming Zhang, Jianxiong, 2007), активно експресується у фібробластах шкіри молодих тварин, у старості активність експресії знижується на 61% по відношенню до максимального рівня (3 міс.), що зображено на рис. 1.

Кількість його продукту також висока в фібробластах молодих тварин і різко падає у старості, складаючи близько 25% по відношенню до молодих донорів (рис. 2).

Вікова картина експресії ІЛ 1 $\beta$  має подібні риси з такою для ІЛ 1 $\alpha$ .

ІЛ 2 – також потужний прозапальний цитокін з різноманітними ефектами. Зокрема, він стимулює вироблення  $\gamma$ -інтерферону і фактора некрозу пухлин.



**Рис. 1. Динаміка експресії генів інтерлейкінів в культурі фібробластів шкіри**

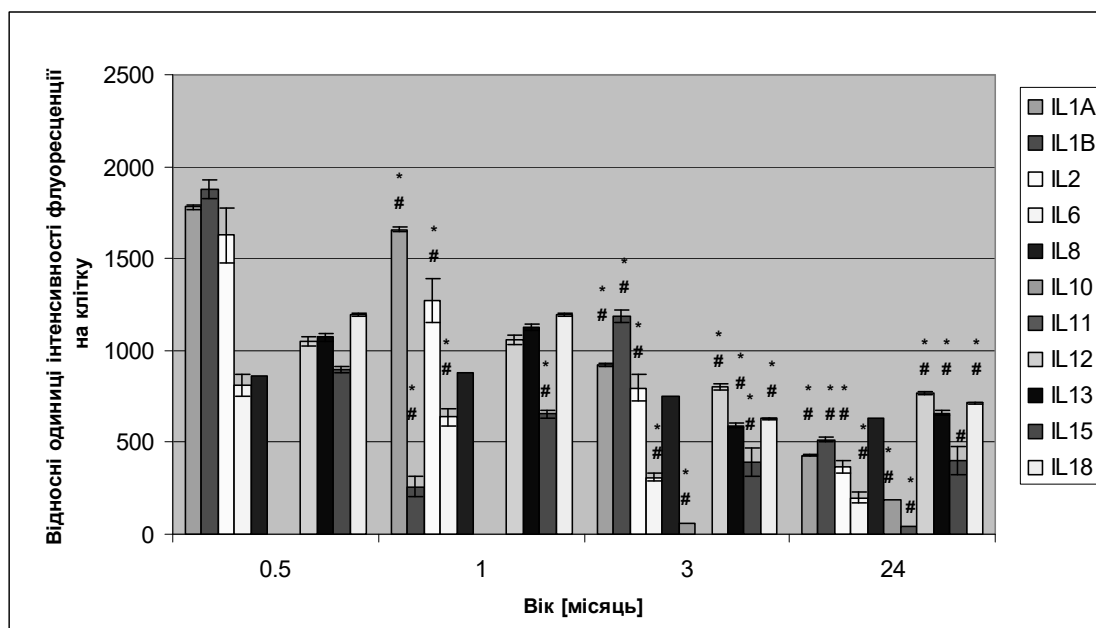
\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Експресія гена ІЛ 2 трохи нижча, ніж ІЛ 1 (особливо порівняно з ІЛ1  $\beta$ ) та істотно знижується з віком, складаючи у віці 3 місяці приблизно 50% від рівня 2-тижневих тварин, а у віці 24 місяців падає приблизно в 5 разів у порівнянні з рівнем у 2-тижневих щурів. Кількість продукту ІЛ-2 підвищується до віку 3-х місяців і далі залишається практично незмінною.

Таким чином, розглянуті прозапальні цитокіни фібробластів шкіри мають в основному подібну динаміку експресії їх генів і накопичення продуктів в онтогенезі.

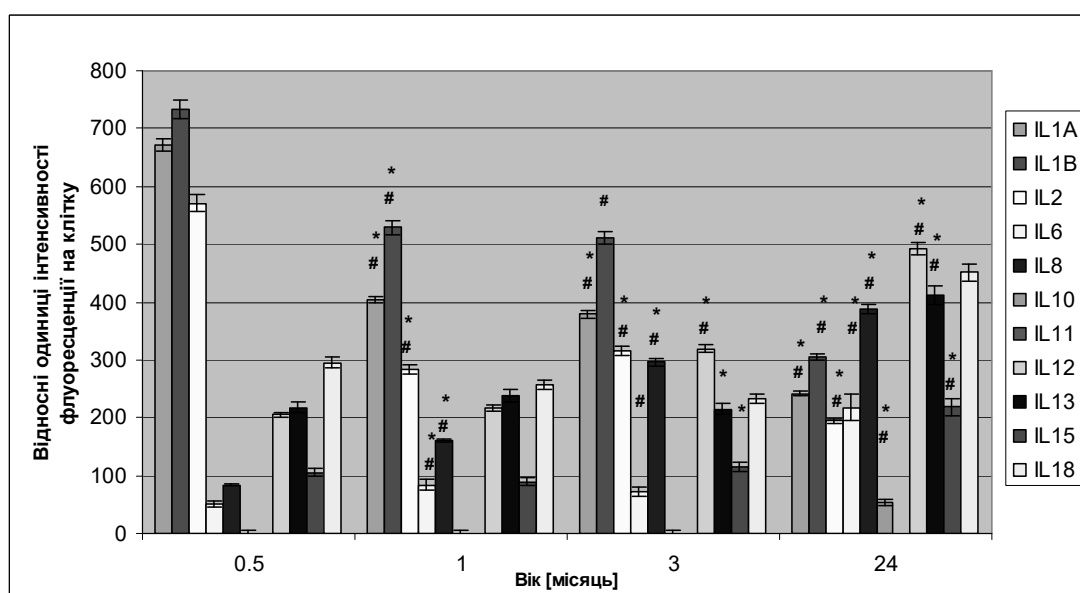
Спрямованість вікових змін експресії генів ІЛ 1 і ІЛ 2 в легенях (рис. 3) не відрізняється від такої в шкірі. Кількість продуктів ІЛ 1 і ІЛ 2 в легенях істотно нижча (рис. 4), ніж у шкірі, і не настільки помітно змінюється з віком.



**Рис. 2. Динаміка накопичення продуктів генів інтерлейкінів в культурі фібробластів шкіри**

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )



**Рис. 3. Інтенсивність експресії генів інтерлейкінів в культурі фібробластів легенів**

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Знижена кількість цих прозапальних білків в легенях може бути пов'язана з особливостями функціонування досліджених тканин: і шкіра, і легені контактують із зовнішнім повітряним середовищем, що містить безліч патогенів, але легені відокремлені верхніми дихальними шляхами і бронхами, а також захисним шаром сурфактанту, що робить їх більш захищеними.

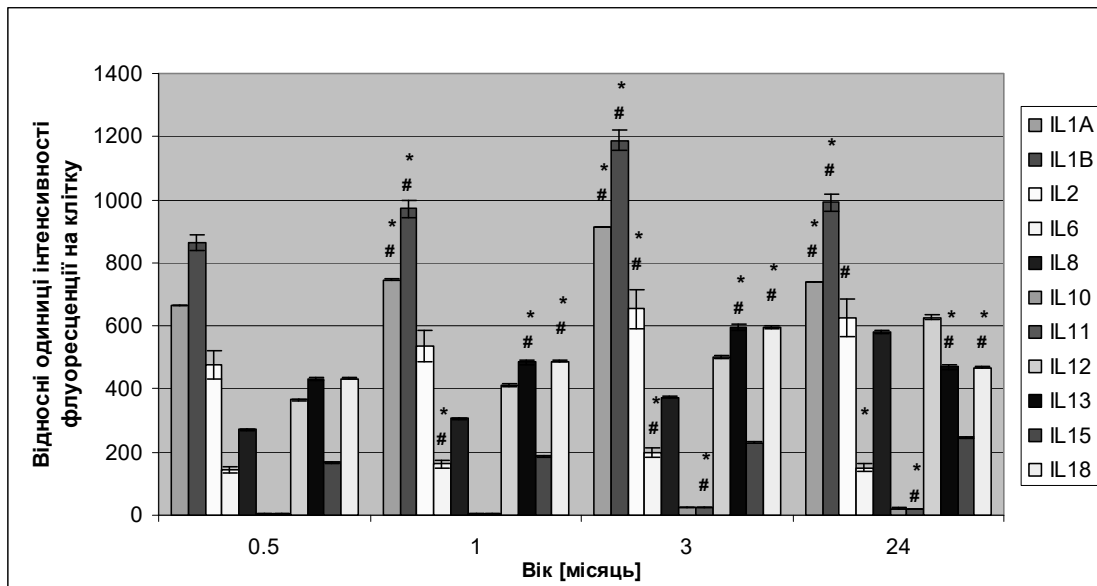


Рис. 4. Динаміка накопичення продуктів генів інтерлейкінів в культурі фібробластів легенів

\* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )

# достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

ІЛ 6 та ІЛ 8 – також прозапальні цитокіни (Bickel, 2003; Brocker et al., 2010), причому ІЛ 6 сильно активує синтез білків гострої фази, може діяти як про-, так і як протизапальний, ІЛ 8 – активний хемокін. Обидва вони – характерні продукти генів фібробластів. Їх експресія в шкірі нижча, ніж ІЛ 1 і 2. Найбільш низькою вона є у 2-тижневих тварин, зростає в онтогенезі, перевищуючи рівень в фібробластах 2-тижневих щурів у 8 разів (ІЛ 8) і у 9 разів (ІЛ 6). Динаміка накопичення продукту в онтогенезі інша, ніж для ІЛ 1 і 2. Для ІЛ 6 характерно зниження кількості продукту з віком – у 4 рази у віці 24 місяців, а для ІЛ 8 – всього у 1,4 разів. Експресія генів ІЛ 6 і 8 у фібробластах легенів нижча в усі досліджені періоди онтогенезу та істотно підвищується у старості, як і в клітинах шкіри.

Гени ІЛ 10 та 11 практично не експресувалися, продукти їх знаходяться в невеликій кількості або відсутні в фібробластах як шкіри, так і легенів.

Експресія прозапальних генів ІЛ 12, 15 і 18 (Кетлинский, Симбирцев, 2008; Coumoul, Deng, 2003) в онтогенезі підвищується. Максимум досягається в різні періоди онтогенезу. Кількість продуктів зазначених генів залишається приблизно на одному рівні після 3-місячного віку. Схожа картина спостерігається і у фібробластах легенів. У легенях вікові зміни експресії цих генів і кількості їх продуктів виражені в меншій мірі, ніж в шкірі.

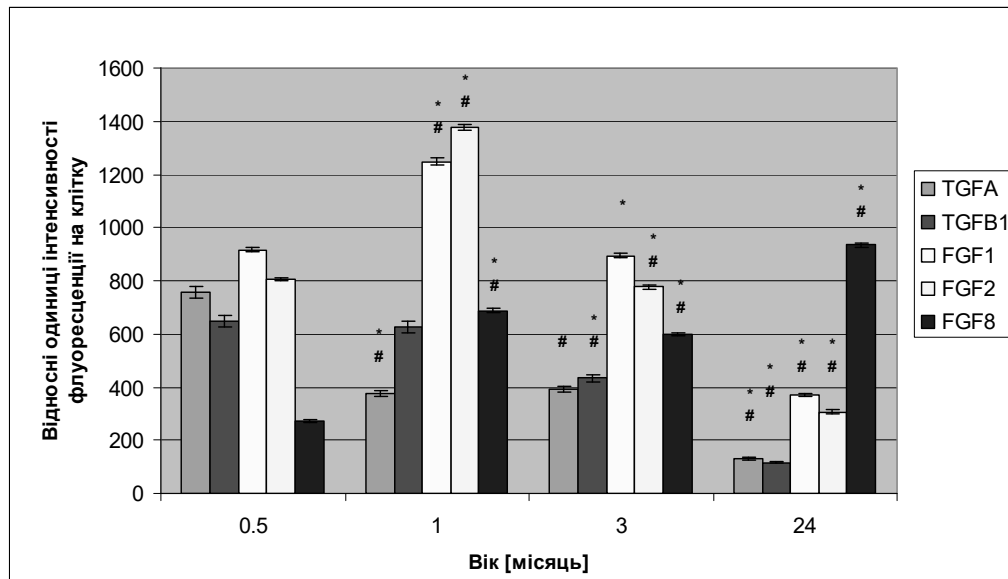
На відміну від розглянутих цитокінів, ІЛ 13 є протизапальним. Експресія його гена і в шкірі, і в легенях підвищується, з деякими коливаннями, до 24 місяців. Кількість продукту цього гена досить висока у 2-тижневих і 1-місячних щурів, але у віці 3-х місяців знижується приблизно в 2 рази і залишається значно нижчою, ніж у молодому віці. Очевидно, це відповідає повільнішому протіканню запальних процесів у старому віці. У легенях коливання кількості ІЛ 13 не настільки значні (максимум знайдений у 3 місяці).

Зупинимося на представлених цитокінах, які є факторами росту.

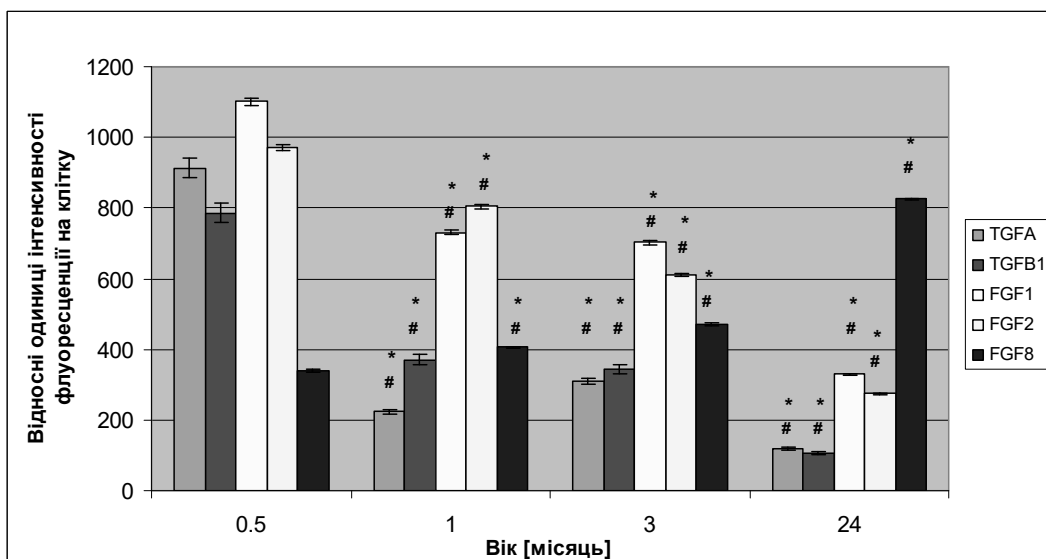
Одна з важливих функцій факторів росту фібробластів (ФРФ) 1 і 2 – стимуляція росту ендотеліальних клітин і організація їх в трубчасту структуру. Вони прискорюють як ріст нових кровоносних судин в ході розвитку організму, так і відновлення судин при регенерації тканин (Ornitz, Itoh, 2001; Böttcher, Niehrs, 2005).

Експресія генів ФРФ в шкірі має різні вихідні значення (рис. 5) – у 2-тижневих тварин вона максимальна для ФРФ 1 і мінімальна для ФРФ 8. Експресія гена ФРФ 8 продовжує зростати аж до

24 місяців. У легенях експресія зазначених генів (рис. 6) носить подібний характер, з деякими відмінностями для ФРФ 8.

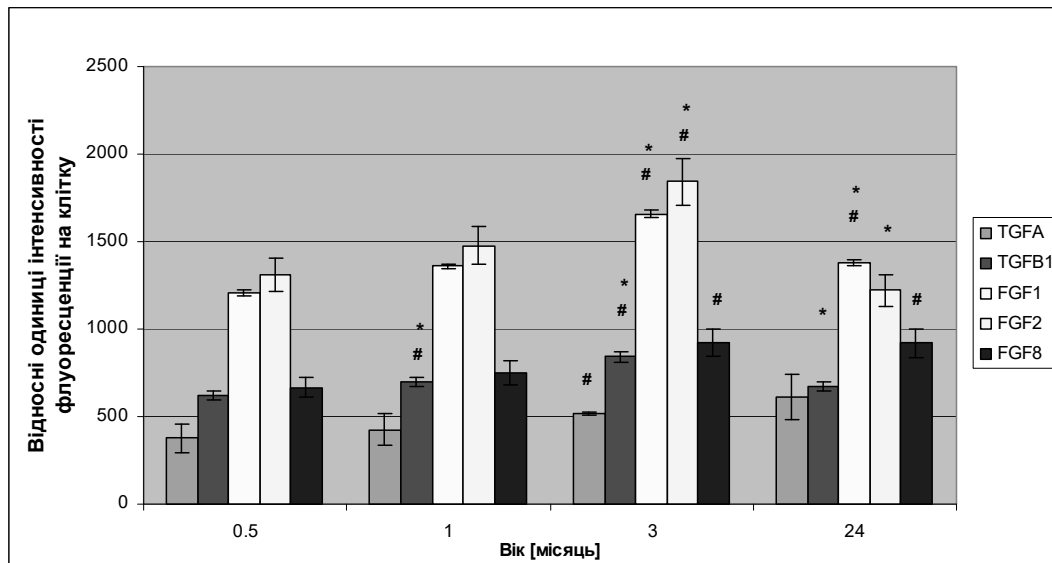


**Рис. 5. Динаміка експресії генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів шкіри**  
 \* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )  
 # достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

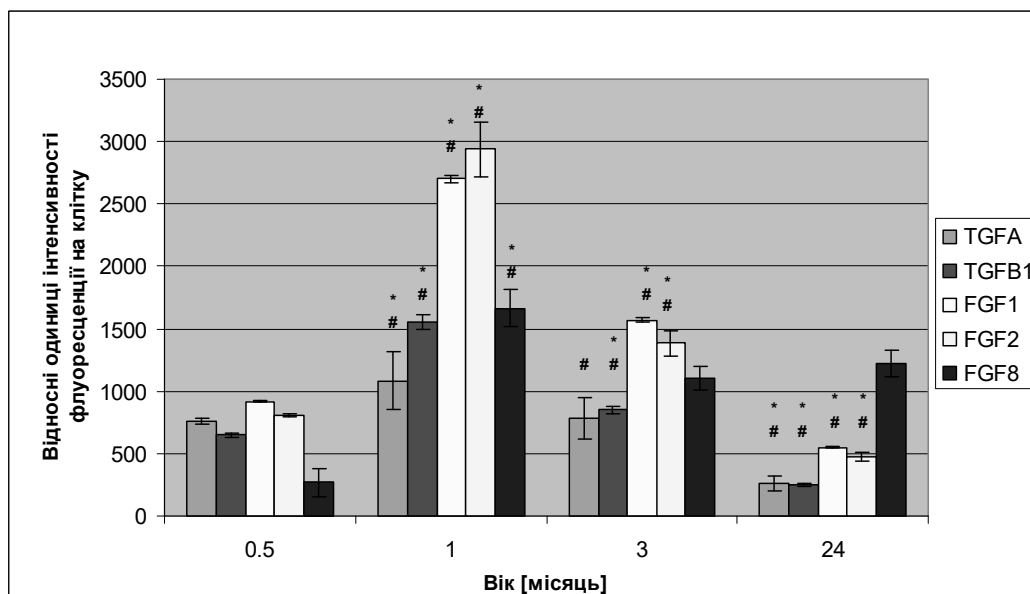


**Рис. 6. Інтенсивність експресії генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів легенів**  
 \* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )  
 # достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Кількість продуктів – ФРФ (рис. 7, 8) – висока для всіх трьох ФРФ з досягненням максимуму ФРФ 1 і 2 в 3 місяці; ФРФ 8 продовжує зростати і у старості, що, можливо, компенсує біологічний ефект від падіння ФРФ 1 і 2 у старому організмі.



**Рис. 7. Динаміка накопичення продуктів генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів легенів**  
 \* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )  
 # достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )



**Рис. 8. Динаміка накопичення продуктів генів ФРФ та ТФР в культурі фібробластів шкіри**  
 \* достовірна зміна цього ж показника відносно попередньо зафіксованого віку ( $p \leq 0,05$ )  
 # достовірна зміна цього ж показника відносно віку 0,5 місяців ( $p \leq 0,05$ )

Досліджені нами трансформуючі фактори росту (ТФР  $\alpha$  і  $\beta 1$ ) лімітують запальні процеси, діючи на прозапальні цитокіни ІЛ 1 і 6, і прискорюють загоєння ран, стимулюючи поділ фібробластів і синтез білків міжклітинного матриксу (Derynck et al., 1985). TGF  $\beta$  ініціює апоптоз у більшості типів клітин і пригнічує дію ІЛ 1 (Wahl et al., 1988; Martellosi Cebinelli et al., 2016).

Експресія генів ТФР  $\alpha$  і  $\beta 1$  і в шкірі, і в легенях з віком достовірно знижується, як і кількість їх продуктів.

Таким чином, нами виявлено риси як подібності, так і відмінності експресії генів цитокінів і кількості їх продуктів в фібробластах шкіри і легенів щурів різного віку.

#### Висновки

1. Для генів всіх досліджених типів цитокінів – ІЛ, ФРФ та ТФР було зафіксовано зміну інтенсивності експресії та накопичення їх продуктів у постнатальному онтогенезі.
2. Динаміка як інтенсивності експресії досліджуваних генів, так і накопичення їх продуктів якісно подібна в культурах клітин обох тканин, але для фібробластів шкіри вікові та кількісні коливання даних показників виражені сильніше.
3. При цьому максимумами експресії і концентрацій всіх трьох типів вивчених цитокінів знаходяться в інтервалі між 0,5 і 3 місяцями з істотними кількісними відмінностями як між цитокінінами різних типів, так і між культурами фібробластів легенів і шкіри.
4. Значення відношення як експресії, так і накопичення продуктів генів протизапальних інтерлейкінів до прозапальних в онтогенезі зростає, що може відображати особливості як розвитку, так і зниження здатності до регенерації сполучної тканини з віком.

#### Список літератури / References

- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – Спб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – С. 369–378. //Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. – Spb: ООО "Publishing House Foliant", 2008. – P. 369–378./
- Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation // J. Periodontol. – 1993. – Vol.64 (5 Suppl). –P. 456–460.
- Böttcher R.T., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development // Endocr. Rev. – 2005. – Vol.26 (1). – P. 63-77.
- Brockner C., Thompson D., Matsumoto A. et al. Evolutionary divergence and functions of human interleukin (IL) gene family // Human Genomics. – 2010. – Vol.5 (1). – P. 30–55.
- Coumoul X., Deng C.X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases // Birth Defects Res. C. Embryo Today. – 2003. – Vol.89 (4). – P. 286–304.
- Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y. et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells // Nature. – 1985. – Vol.316 (6030). – P. 701–705.
- Jun-Ming Zhang, Jianxiong A.N. Cytokines, inflammation and pain // Int. Anesthesiol. Clin. – 2007. – Vol.45 (2). – P. 27–37.
- Martelossi C.G.C., Paiva T.K., Badaró G.S., Brajão de Oliveira K. TGF- $\beta$ 1 functional polymorphisms: a review // Eur. Cytokine Netw. – 2016. – Vol.27 (4). – P. 81–89.
- Ornitz D.M., Itoh N. Fibroblast growth factor // Genome Biology. – 2001. – Vol.2 (3). – REVIEWS3005.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wong H.L. et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation // J. Immunol. – 1988. – Vol.140 (9). – P. 3026–3032.

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 02.05.2018*

**About the author:** M.A.Gritsenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, gricenkomarija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8766-7032>

**Про автора:** М.А.Гриценко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, gricenkomarija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8766-7032>

**Об авторе:** М.А.Гриценко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, gricenkomarija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8766-7032>