

... КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ ... BRIEF COMMUNICATIONS ...

УДК: 577+576.3+576.5

**Порівняльне дослідження експресії деяких груп генів у фібробластах
шкіри та легенів щурів різного віку**
М.А.Гриценко, Н.І.Буланкіна

Проведено порівняльне дослідження експресії трьох різних груп генів та кількості їхніх білкових продуктів в культурі фібробластів шкіри та легенів білих щурів лінії Вістар різного віку (2 тижні, 1, 12 та 24 місяці). Знайдено риси подібності та різниці вікової динаміки для віментину, вінкуліну та декорину. Для цих трьох генів, продукти яких приймають участь у внутрішньоклітинних взаємодіях (віментин) та взаємодіях білків цитоскелету з компонентами міжклітинного матриксу, притаманно зростання експресії з віком як у шкірі, так і в легенях. Кількість продуктів цих генів коливається без якоїсь загальної спрямованості. Найбільш активна експресія вінкуліну, як в шкірі, так і в легенях; кількість білку-продукту також максимальна саме для нього. Найменш активна експресія гену віментину у легенях двотижневих щурів. Для експресії генів факторів росту 1, 2 та 8 знайдено суттєву різницю в характері їхніх змін в онтогенезі. Перші два з них, продукти яких стимулюють синтез однієї з найбільш важливої та розповсюдженої форми колагену 1, експресуються мінімально у старих тварин як у шкірі, так і в легенях. В шкірі вони експресовані значно сильніше, ніж у легенях. Ген фактору росту фібробластів 8 експресований в обох тканинах суттєво слабше, ніж гени факторів росту 1 та 2. Напрямо вікових змін експресії фактору 8 є протилежним тому, що притаманне для експресії генів факторів 1 та 2. Щодо кількості білка-продукту, то вона максимальна для фактору росту 8 у віці 1-го місяця в легенях, а в шкірі – у другій половині онтогенезу. Вивчали деякі гени гомеобоксу – HOX-гени (2, 4, 5, 6, 7). Вони є найбільш важливими для ранніх етапів онтогенезу в зв'язку з впливом їх на органогенез, особливо в ембріональному періоді. Їм в цілому притаманне зменшення як активності експресії, та кількості продукту, особливо у старих тварин. Найбільш активно експресований серед генів гомеобоксу, як у легенях, так і у шкірі, HOX 5. Отримані результати обговорено в зв'язку з функціональними та тканинними особливостями генів, що вивчались, та їхніх продуктів.

Ключові слова: *фібробласти, експресія генів, віментин, вінкулін, декорин, фактори росту, гомеобокс, шкіра, легені, онтогенез.*

**Comparative study of some skin and lung fibroblast genes expression of
rats of different age**
M.A.Gritsenko, N.I.Bulankina

Comparative study of the expression of three different groups of genes and their protein products amount in the culture of skin fibroblasts from Wistar rats of different ages (2 weeks, 1, 12 and 24 months) was carried out. The traits of similarities and differences in age dynamics for vimentin, vinculin, decorin have been found. These three genes, the products of which participate in intracellular interactions (vimentin) and interactions of cytoskeleton proteins with components of the extracellular matrix, are characterized by an increase in the expression with age both in the skin and in the lungs. They are expressed much stronger in the skin than in the lungs. The amount of their products fluctuates without any single direction. The most active is the expression of vinculin, both in the skin and in the lungs; the amount of the product is also the maximal for it. The least effective is the expression of the vimentin gene in the lungs of two-week-old rats. For the gene expression of fibroblast growth factors 1, 2 and 8, significant differences have been found in their changes in ontogenesis. The first two of them, whose products stimulate the synthesis of one of the most common and important forms of collagen 1, are minimally expressed in old animals, both in the skin and in the lungs. The gene of fibroblast growth factor 8 is expressed in both tissues significantly weaker than the genes of factors 1 and 2. The direction of age-related expression of factor 8 is opposite to that which is inherent for the expression of genes 1 and 2. As for the protein product, its amount is maximal in 1 month, and in the skin significantly increased in the second half of ontogenesis. Some homeobox genes, the HOX genes (2, 4, 5, 6, 7), have been studied. They are most important for the early stages of ontogenesis due to their influence on organogenesis, especially in the embryonic period. In general, both their expression and the product amount decrease, especially in old animals. HOX 5 is most expressed among these genes in the lungs and in the skin. The results obtained are discussed in connection with the functional and tissue characteristics of the studied genes and their products.

Key words: *fibroblasts, gene expression, vimentin, vinculin, decorin, growth factors, homeobox, skin, lung, ontogenesis.*

Сравнительное исследование экспрессии некоторых групп генов в фибробластах кожи и лёгких крыс разного возраста

М.А.Гриценко, Н.И.Буланкина

Проведено сравнительное исследование экспрессии трёх разных групп генов и количества их белков-продуктов в культуре фибробластов кожи и лёгких белых крыс линии Вистар разного возраста (2 недели, 1, 12 и 24 месяца). Найдено черты сходства и различия возрастной динамики для виментина, винкулина, декорина. Для этих трёх генов, продукты которых участвуют во внутриклеточных взаимодействиях (виментин) и взаимодействиях белков цитоскелета с компонентами межклеточного матрикса, характерно повышение экспрессии с возрастом как в коже, так и в лёгких. В коже они экспрессированы существенно сильнее, чем в лёгких. Количество их продуктов колеблется без какой-либо единой направленности. Наиболее активна экспрессия винкулина, как в коже, так и в лёгких; количество продукта также максимально именно для него. Наименее активна экспрессия гена виментина в лёгких двухнедельных крыс. Для экспрессии генов факторов роста фибробластов 1, 2 и 8 найдены существенные различия в характере их изменений в онтогенезе. Первые два из них, продукты которых стимулируют синтез одной из наиболее распространённых и важных форм коллагена 1, экспрессированы минимально у старых животных как в коже, так и в лёгких. Ген фактора роста фибробластов 8 экспрессирован в обеих тканях существенно слабее, чем гены факторов 1 и 2. Направленность возрастных изменений экспрессии фактора 8 противоположна той, которая присуща экспрессии генов 1 и 2. Что касается белка-продукта, то количество его максимально в возрасте 1 месяц, а в коже достоверно повышено во второй половине онтогенеза. Изучены некоторые гены гомеобокса – НОХ-гены (2, 4, 5, 6, 7). Они наиболее важны для ранних этапов онтогенеза в силу влияния на органогенез, особенно в эмбриональном периоде. Им в целом свойственно уменьшение как экспрессии, так и количества продукта, особенно у старых животных. Наиболее активно среди этих генов экспрессирован, как в лёгких, так и в коже, НОХ 5. Полученные результаты обсуждены в связи с функциональными и тканевыми особенностями исследованных генов и их продуктов.

Ключевые слова: фибробласты, экспрессия генов, виментин, винкулин, декорин, факторы роста, гомеобокс, кожа, лёгкие, онтогенез.

Вступ

Метою роботи було вивчення експресії трьох груп генів і накопичення їхніх білків-продуктів у сполучній тканині шкіри та легень що різняться за своєю морфологією, фізіологією та біохімією (Chang et al., 2002).

Досліджено групу генів білків цитоскелету та компонентів, що забезпечують зв'язок цитоскелету та міжклітинного матриксу: виментин (*VIM*), винкулін (*VCL*) та декорин (*DCN*). Виментин грає важливу роль у підтриманні та зміні форми цитоскелету, в закріпленні клітинних органел в необхідній позиції. Він забезпечує сталість цитоскелету та стійкість клітин до дії механічних напруг (Katsumoto et al., 2002). Винкулін є найважливішим білком фокальної адгезії. Він потрібний для прикріплення інтегринів до актинового цитоскелету, для міжклітинних взаємодій та зв'язку клітин з міжклітинним матриксом, для роботи багатьох сигнальних шляхів (Goldmann, Ingber, 2002). Декорин – протеоглікан, що забезпечує зв'язок клітин та міжклітинного матриксу, перш за все, шляхом взаємодії з колагеном 1-го типу. Він приймає участь в фібрилогенезі та взаємодії з багатьма білками, що регулюють функції клітин та тканин (фібронектином, тромбоспондином, С1q-компонентом системи комплементу, рецепторами факторів росту та ін.). Декорин приймає участь також в регуляції клітинного циклу, ангиогенезі тощо (Järveläinen et al., 2015).

Вивчали також експресію генів факторів росту фібробластів (ФРФ – FGF) 1 та 2 (найбільш активні), а також дещо менш розповсюджений в тканинах дорослих організмів, але активний на початку онтогенезу і такий, що активується при злоякісній трансформації – ФРФ 8 (Olsen et al., 2003).

Крім того, вивчені гени гомеобоксу (НОХ-гени), що найактивніші в ембріогенезі, але, вочевидь, деякі з них здібні функціонувати і в постнатальному періоді (Morgan, 2006). Вони контролюють просторовий та часовий розвиток організму, а в дорослому віці, можливо, необхідні для контролю за процесами регенерації.

Проведено порівняльне дослідження експресії цих генів та їхніх білків-продуктів в фібробластах шкіри та легень білих щурів в онтогенезі.

Матеріали та методи

Експерименти проведено згідно до Європейської конвенції "About protection of vertebrate animals..." та Закону України «Про захист тварин...». Донорами шкіри та легенів були білі щури лінії Вістар (вік 0,5; 1, 12 і 24 місяці).

Постановка експериментів і методи дослідження наведені у нашій попередній роботі (Kot et al., 2015). Статистичний аналіз результатів виконано за допомогою програми «ORIGIN 6.0». Відмінності є статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Отримані дані представлені в табл. 1 та 2. Як видно з табл. 1, експресія генів віментину, вінкуліну та декорину суттєво різняться в обох видах тканин (вона максимальна для вінкуліну до 24-місячного віку); така ж картина і щодо кількості білка-продукту, що відображає особливості їхніх функцій. Віментин діє виключно всередині клітини, а два інших білка забезпечують взаємодію фібробластів з різноманітними компонентами міжклітинного матриксу.

Таблиця 1.

Експресія деяких генів та кількість їхніх продуктів в фібробластах легенів та шкіри щурів різного віку (в од. Flu на клітину)

Білок	Ген, тканина	Експресія				Білок-продукт			
		0,5 міс.	1 міс.	3 міс.	24 міс.	0,5 міс.	1 міс.	3 міс.	24 міс.
Віментин	VIM легені	418±25	426 ±22	581 ±70 [#]	707 ±71 [*]	701±81	789 ±90 [#]	971 ±101 [#]	1133 ±120 [#]
	VIM шкіра	337±41	722 ±75 [#]	738 ±80 [*]	799 ±90 [*]	1386±150	1729 ±168	1326 ±141	10609 ±8 [*]
Вінкулін	VCL легені	847±90	928 ±110	11353 ±120 [*]	1639 ±170 [*]	1508±171	1696 ±201 [#]	2055 ±220 [*]	2231 ±238
	VCL шкіра	701±69	791 ±75 [#]	1471 ±131 [#]	1859 ±187 [*]	2059±198	1856 ±180 [#]	2472 ±246 [#]	2321 ±240
Декорин	DCN легені	772±68	790 ±81	841 ±90	1157 ±120 [#]	1272±141	1431 ±160	1763 ±180 [#]	1619 ±210 [*]
	DCN шкіра	637±70	674 ±72	1071 ±98 [#]	1311 ±141 [*]	1941±187	1639 ±170	1847 ±185	1669 ±180 [*]
Фактори росту	FGF1 легені	917±88	1248 ±110 [#]	893 ±90 [#]	370 ±40 [#]	2459±245	2702 ±202	1569 [#] ±170	549 ±45 [*]
	FGF1 шкіра	1102±101	731 ±78	702 ±65 [*]	329 ±31 [#]	1207±141	1358 ±160	1659 ±190	1378 ±162
	FGF2 легені	806±78	1376 ±145 [*]	776 ±71 [#]	307 ±29 [*]	2254±210	2939 ±305	1386 ±141 [*]	474 ±36 [*]
	FGF2 шкіра	971±89	805 ±82	611 ±58	274 ±21 [#]	1312±122	1476 ±130	1842 ±156	1222 ±110
	FGF8 легені	270±35	688 ±79 [*]	597 ±62 [*]	934 ±79 [*]	1262±87	1665 ±110 [*]	1106 ±96	1220 ±89
	FGF8 шкіра	339±15	406 ±41 [*]	471 ±40 [*]	825 ±90 [#]	668±60	751 ±67	922 ±80 [*]	920 ±86 [*]

Примітки: * $p < 0,05$ в порівнянні з тваринами 0,5 міс.; # $p < 0,05$ в порівнянні з попереднім значенням.

У 2-тижневих тварин знайдено постійне перевищення експресії всіх трьох генів в легенях порівняльно до такої в шкірі. В інших вікових групах ця тенденція не зберігається. Аналогічні розбіжності знайдено для продуктів цих генів. Можливо, це пов'язано з особливостями фізіології цих двох тканин близького походження з дещо різною захищеністю від зовнішніх чинників. Повітря, компоненти якого впливають на стан легеневої тканини, проходить повз верхні та середні дихальні шляхи перед попаданням у легені. Шкіра ж контактує з оточуючим середовищем напряму і, таким

чином, є більш незахищеною від зовнішніх впливів. Можливо, це може сприяти менш високій експресії даних генів саме в шкірі.

З віком як експресія вивчених генів, так і кількість їхніх продуктів збільшується, сягаючи максимуму, але не завжди синхронно, бо деталі їхніх функцій суттєво відрізняються. Взагалі для трьох досліджених генів та їхніх білків-продуктів спостерігається подібна картина змін в онтогенезі як у шкірі, так і в легенях.

Пік експресії генів ФРФ 1 та 2 в фібробластах обох тканин припадає на молодий вік. Суттєве падіння цих величин в старості корелює з віковим напруженням синтезу багатьох білків сполучної тканини. Для ФРФ 8 притаманні менші величини експресії гену та кількості білка-продукту порівняно з ФРФ 1 та 2. Коливання експресії гену ФРФ 8 та його продукту не мають чіткої вікової тенденції. Це може бути пов'язаним з вищезгаданою особливістю функції ФРФ 8.

Вивчено також деякі гени групи *HOX B* (експресія генів групи *D* не була знайдена в наших експериментах. Можливо, він є активним лише на ранніх – ембріональних – етапах онтогенезу).

Таблиця 2.

Експресія деяких генів *HOX* в фібробластах легенів та шкіри щурів різного віку (в од. Flu на клітину)

Гени <i>HOX</i>	Легені				Шкіра			
	0,5 міс.	1 міс.	3 міс.	24 міс.	0,5 міс.	1 міс.	3 міс.	24 міс.
<i>B2</i>	331±2,9	352±3,7	233±2,5*#	120±2,0*#	410±4,6	211±1,9*	187±1,9*	109±1,2*
<i>B4</i>	297±2,5	362±4,3	249 ±9,5#	135±13*	371±4,3	217±4,6	200±1,7*	122±1,8*
<i>B5</i>	419±6,4	871±7,8*#	475±4,5	236±6,3*	514±6,6	512±7,1	376±4,9	211±3,0*
<i>B6</i>	81±6,8	1161±0,1	135±14*	91±8,3	116±11	103±8,9	111±13,2	84±6,9
<i>B7</i>	165±12	148±13,6	89±6,5*#	43±3,6*#	215±10,2	93±8,7*	75±6,4*	41±5,5*#

Примітки: * $p < 0,05$ в порівнянні з тваринами 0,5 міс.; # $p < 0,05$ в порівнянні з попереднім значенням.

Найбільша експресія та кількість продукту в усі вікові періоди були притаманні *HOX 5* шкіри. В ході онтогенезу, як і можна було очікувати, обидва показники знижуються і в шкірі, і в легенях. Мінімальні величини, як експресії, так і кількості продукту, близькі для обох тканин, знайдено у старих тварин.

Таким чином, експресія досліджених нами генів та їхніх продуктів виявила риси подібності та різницю вивчених показників в різних групах генів в онтогенезі, як в абсолютних величинах, так і в тканинних та вікових тенденціях динаміки.

Список літератури / References

- Chang Y.Y., Chi J.T., Dudot S. et al. Diversity, topographic differentiation and position memory in human fibroblasts // PNAS USA. – 2002. – Vol.99 (20). – P. 12877–12882.
- Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning // Trends Genet. – 2006. – Vol.22. – P. 67–69.
- Katsumoto T., Mitsushima A., Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction // Biol. Cell. – 2002. – Vol.68 (2). – P. 139–146.
- Kot Y.G., Kot E.V., Morozova E.S. et al. Comparison of gene expression of metallothioneins, ubiquitin and p53 in fibroblasts from lung and skin of rats of different age // Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2015. – Vol.6 (2). – P. 161–164.
- Järveläinen H., Sainio A., Wight T.N. Pivotal role for decorin in angiogenesis // Matrix Biology. – 2015. – Vol.43. – P. 15–26.
- Goldmann W.H., Ingber D.E. Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and rac-dependent lamellipodia formation // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2002. – Vol.290 (2). – P. 749–755.

Olsen S.K., Garbi M., Zampieri N. et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol.278 (36). – P. 34226–34236.

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

Рецензент: Ю.Г.Кот / Reviewer: Yu.G.Kot

Подано до редакції / Received: 08.11.2018

About the authors: 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>

N.I.Bulankina – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, nibulanka@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9393-4739>

Про авторів: 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>

Н.І.Буланкіна – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, nibulanka@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9393-4739>

Об авторах: 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>

Н.И.Буланкина – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, nibulanka@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9393-4739>