

УДК: 577.12.577.112.577.2

Порівняльні особливості будови цитоскелету фібробластів шкіри та легенів щурів різного віку**М.А.Гриценко, Н.І.Буланкіна, Т.С.Харченко, Ю.Г.Кот, Є.Е.Перський***Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)*
masha.offshorebox@gmail.com

Проведено порівняльний аналіз зміни інтенсивності експресії генів *Actb*, *Actg1*, *Tubb1*, *Nexn* і вмісту їх продуктів – маркерних білків цитоскелету – β - і γ -актину, тубуліну та нексиліну в культурах фібробластів легенів і шкіри щурів віком 0,5, 1, 3 і 24 місяців. Показано, що динаміка інтенсивності експресії досліджених генів і вмісту їх продуктів має як вікові, так і органні відмінності. В культурі фібробластів обох органів залежність рівня експресії генів актинів β і γ від віку тварин-донорів якісно подібна і являє собою криві з максимумами. Проте є вікові особливості – максимум експресії генів і вмісту актинів у культурі фібробластів легенів відповідає групі тварин-донорів віком 3 місяці, а у культурі фібробластів шкіри – 1 міс. Після досягнення максимумів обидва показники суттєво знижуються з подальшим віком тварин. Це зниження суттєвіше в культурі фібробластів шкіри. При цьому відношення рівня експресії та вмісту β - і γ -актину у культурі фібробластів легенів не залежить від віку тварин. Виявлена різноспрямованість між змінами експресії генів тубуліну та нексиліну та їх вмістом у культурах клітин. Проте, в цілому, вікові зміни вмісту цих білків в культурах клітин з обох органів корелюють зі змінами вмісту актинів. Виявлені зміни експресії та вмісту досліджених маркерних білків цитоскелету свідчать про вікові та органні розбіжності функціональних властивостей фібробластів легенів і шкіри.

Ключові слова: *культура клітин, фібробласти шкіри та легенів, актини, тубулін, нексилін, вік.***Сравнительные особенности строения цитоскелета фибробластов кожи и легких крыс разного возраста****М.А.Гриценко, Н.И.Буланкина, Т.С.Харченко, Ю.Г.Кот, Е.Э.Перский**

Проведен сравнительный анализ изменения интенсивности экспрессии генов *Actb*, *Actg1*, *Tubb1*, *Nexn* и содержания их продуктов – маркерных белков цитоскелета – β - и γ -актина, тубулина и нексиллина в культурах фибробластов легких и кожи крыс возрастом 0,5, 1, 3 и 24 месяцев. Показано, что динамика интенсивности экспрессии исследованных генов и содержания их продуктов имеет как возрастную, так и органную зависимость. В культуре фибробластов обоих органов зависимость уровня экспрессии актинов β и γ от возраста животных-доноров качественно подобна и представляет собой кривые с максимумами. Однако имеются их возрастные особенности – максимум экспрессии генов и содержания актинов в культуре фибробластов легких соответствует группе животных-доноров возрастом 3 месяца, а в культуре фибробластов кожи – 1 месяц. После достижения максимумов оба показателя существенно снижаются с дальнейшим увеличением возраста животного. Это снижение более выражено в культуре фибробластов кожи. При этом отношение уровня экспрессии и содержания β - и γ -актина в культуре фибробластов легкого и кожи не зависит от возраста животных. Показана разнонаправленность между изменениями экспрессии генов тубулина и нексиллина и их содержанием в культурах клеток. Однако, в общем, возрастные изменения содержания этих белков в культурах клеток из обоих органов коррелируют с изменением содержания актинов. Обнаруженные изменения экспрессии и содержания исследованных маркерных белков цитоскелета свидетельствуют о возрастных и органных особенностях функциональных свойств фибробластов легких и кожи.

Ключевые слова: *культура клеток, фибробласты кожи и лёгких, актины, тубулин, нексиллин, возраст.***Comparative features of the skin and lung fibroblasts cytoskeleton structure in rats of different ages****М.А.Gritsenko, N.I.Bulankina, T.S.Kharchenko, Yu.G.Kot, Ye.E.Persky**

In the article comparative analysis of the changes in the intensity of the *Actb*, *Actg1*, *Tubb1*, and *Nexn* genes expression and the content of their products – marker cytoskeleton proteins – β - and γ -actin, tubulin and nexilin in cultures of lungs and skin fibroblasts of rats aged 0.5, 1, 3 and 24 months has been carried out. It

has been shown that the dynamics of expression intensity of the investigated genes and the content of their products has both age and organ dependence. In fibroblasts culture of both organs the dependence of the level of β - and γ actin expression on the age of donor animals is qualitatively similar and represents curves with maxima. However, there are their age features – the maximum expression of genes and the content of actin in the culture of lung fibroblasts corresponds to a group of animal donors 3 months old, and in the culture of skin fibroblasts – 1 month. After reaching the maximums, both indicators significantly reduced with a further increase in the age of the animal. This decrease is more pronounced in the culture of skin fibroblasts. In this case, the ratio of the level of expression and the content of β - and γ -actin in the culture of fibroblasts of the lung and skin doesn't depend on the age of the animals. The opposite direction between changes in the expression of tubulin and nexilin genes and their content in cell cultures has been shown. However, in general, the age-related changes in the content of these proteins in cell cultures from both organs correlate with a change in the content of actin. The observed changes in the expression and content of the cytoskeleton marker proteins studied indicate the age and organ features of the functional properties of fibroblasts of the lungs and skin.

Key words: *cell culture, skin and lung fibroblasts, actin, tubulin, nexilin, age.*

Вступ

Відомо, що існують тканинні та вікові відмінності адгезивних і міграційних властивостей фібробластів, зокрема фібробластів легенів і шкіри щурів (Chen, Thibeault, 2008; Trepal et al., 2014; Gritsenko et al., 2014). Ці відмінності можуть бути пов'язані із структурно-функціональними особливостями будови цитоскелету клітин, зокрема з якісними змінами білкового складу систем мікротрубочок і актин-міозинового комплексу. До цього часу, однак, не було досліджень, в яких би підтверджувалося або спростовувалося це припущення. У зв'язку з цим у даній роботі *in vitro* досліджені вікові зміни експресії генів, що кодують маркерні білки цитоскелету – актину β , актину γ , тубуліну β , нексиліну (Fletcher, Mullins, 2010; Parsons et al., 2010; Khalili, Ahmad, 2015) та вміст цих білків в фібробластах шкіри і легенів щурів.

Матеріали і методи

Донорами фібробластів були безпородні білі щури 4-х вікових груп (0,5, 1, 3 і 24 місяці). Біоптати органів подрібнювали в середовищі DMEM, що містить 0,25% трипсину (Gibco, США). Після 30-хвилинної інкубації при 37°C клітини збирали, відмивали і сіяли в вентильовані культуральні флакони (TPP, Швейцарія) в поживне середовище DMEM, що містить 10% FBS (Gibco, США), і проводили їх культивування. Клітини культивували при 37°C, 95% вологості, 5% CO₂ (Nuairе 4500, США). За прикріпленням клітин і щільністю клітинної культури стежили за допомогою інвертованого мікроскопу Telaval 31 (Carl Zeiss, Германія). У роботі використовували фібробласти 3-го пасажу. Аналіз експресії генів проводили на ДНК-мікрочіпах Arrayit (США). Загальну РНК з клітин виділяли на спін-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). Ампліфікацію проводили з використанням ампліфікатора BIO-RAD iCycler. Кінцеву кількість білків вимірювали імунохімічно на антитіло-кон'югованих ELISA-мікрочіпах з використанням наборів реактивів Antibody Array Assay Kit (KAS20, Full Moon BioSystems, Inc., США). Отримані результати відображали у відносних одиницях флуоресценції (rFLU) в розрахунку на 1 клітину. Результати обробляли статистично за допомогою критерію Манна-Уїтні. Вірогідними вважали відмінності при $p \leq 0,05$ (Glantz, 2007).

Результати та обговорення

Результати дослідження приведені у табл. 1–3. Інтенсивність експресії генів β - і γ -актинів та вміст цих білків збільшується з віком тварин в культурах фібробластів як легенів, так і шкіри. При цьому максимум обох показників у культурі фібробластів легенів припадає на групу тварин віком 3 місяці, а фібробластів шкіри – 1 місяць. Після досягнення максимумів з подальшим збільшенням віку тварин в культурах клітин з обох органів відбувається зниження як рівня експресії, так і вмісту актинів. Видно, що це зниження значно суттєвіше в культурі фібробластів шкіри.

Разом з тим, виявлена різноспрямованість між змінами експресії генів тубуліну та нексиліну та їх вмістом у культурах фібробластів. Але, в цілому, вікові зміни вмісту цих білків в культурі клітин з обох органів корелюють зі змінами вмісту актинів. Кореляція змін вмісту нексиліну з виявленими

віковими змінами кількості γ -актину та тубуліну може бути пояснена тісними структурними та регуляторними взаємодіями цих білків – нексилін є кросс-лінкерним білком, що відіграє провідну роль у полімеризації F-актину з мономерів γ -актину та взаємодії актинових фібрил із системою мікротрубочок цитоскелету (Rodriguez et al., 2003).

Таблиця 1.

Вікові особливості експресії генів білків цитоскелету фібробластів шкіри і легенів щурів, rFLU1/клітину

Білок	Ген	Вік							
		0,5 міс.		1 міс.		3 міс.		24 міс.	
		легені	шкіра	легені	шкіра	легені	шкіра	легені	шкіра
актин β	<i>Actb</i>	615 \pm 1,8	504 \pm 1,7#	623 \pm 1,8*	1062 \pm 3,2*#	671 \pm 1,9*	853 \pm 2,3*#	644 \pm 1,8*	728 \pm 2,1*#
актин γ	<i>Actg1</i>	309 \pm 3,1	245 \pm 2,5#	321 \pm 3,4*	541 \pm 6,2*#	339 \pm 3,8*	428 \pm 4,9*#	303 \pm 3,3*	340 \pm 3,7*#
тубулін β	<i>Tubb1</i>	663 \pm 13,4	545 \pm 11,2#	426 \pm 8,7*	722 \pm 14,7*#	557 \pm 11,2*	707 \pm 14,1*#	390 \pm 8,0*	439 \pm 8,3*#
нексилін	<i>Nexn</i>	492 \pm 0,5	400 \pm 0,4#	518 \pm 0,5*	881 \pm 0,8*#	572 \pm 0,5*	726 \pm 0,7*#	691 \pm 0,7*	781 \pm 0,7*#

Примітки: * – зміни вірогідні відносно попереднього віку; # – зміни вірогідні відносно легенів того ж самого віку.

Таблиця 2.

Вікові особливості вмісту білків цитоскелету фібробластів шкіри і легенів щурів, rFLU1/клітину

Білок	Ген	Вік							
		0,5 міс.		1 міс.		3 міс.		24 міс.	
		легені	шкіра	легені	шкіра	легені	шкіра	легені	шкіра
актин β	<i>Actb</i>	1008 \pm 3,1	1695 \pm 4,8#	1134 \pm 3,3*	2358 \pm 6,9*#	1400 \pm 4,5*	1507 \pm 4,6*#	1300 \pm 3,9*	975 \pm 2,8*#
актин γ	<i>Actg1</i>	540 \pm 2,5	1215 \pm 6,2#	607 \pm 3,0*	1393 \pm 7,3*#	726 \pm 3,6*	842 \pm 5,2*#	662 \pm 3,3*	514 \pm 2,6*#
тубулін β	<i>Tubb1</i>	692 \pm 13,0	1770 \pm 35,2#	778 \pm 15,3*	1747 \pm 35,4*#	962 \pm 19,3*	1278 \pm 25,4*#	1080 \pm 21,6*	631 \pm 12,6*#
нексилін	<i>Nexn</i>	847 \pm 0,8	1502 \pm 1,5#	953 \pm 0,9*	2022 \pm 2,1*#	1153 \pm 1,1*	1308 \pm 0,1*#	1099 \pm 0,1*	1038 \pm 0,1*#

Примітки: * – зміни вірогідні відносно попереднього віку; # – зміни вірогідні відносно легенів того ж самого віку.

Таким чином, динаміка експресії генів досліджених маркерних білків цитоскелету та їх накопичення у культурі фібробластів залежить від віку тварин-донорів.

Таблиця 3.

Вікові особливості відношення рівня експресії генів і вмісту β - та γ - актинів фібробластів шкіри і легенів щурів

Показник	Легені				Шкіра			
	Вік							
	0,5 міс.	1 міс.	3 міс.	24 міс.	0,5 міс.	1 міс.	3 міс.	24 міс.
Експресія	1,9	1,9	1,9	2,1	2,0	1,9	2,0	2,0
Продукт	1,8	1,8	1,9	1,9	1,3	1,7	1,7	1,8

Відношення рівня експресії та накопичення двох досліджених маркерних білків актин-міозинового комплексу, актину β та актину γ , у культурі фібробластів легенів є однаковим незалежно від віку тварин-донорів, що свідчить про консервативність якісного складу актинового компоненту цитоскелету фібробластів легенів з віком (табл. 3). Отримані дані, в цілому, корелюють з інформацією низки дослідників про те, що відношення вмісту актинів β та γ у нем'язових клітинах

підтримується на постійному рівні (Хайтлина, 2007), і в процесах міграції та адгезії основною є регуляція їх просторового розподілу в залежності від органу.

Загалом така ж сама картина спостерігається і для фібробластів шкіри, проте, з суттєвим винятком – відношення вмісту актинів β та γ для фібробластів 0,5-місячних тварин значно менше, ніж для клітин віком 1–24 міс., і це на фоні незмінності показника експресії їх генів в усіх вікових групах (табл. 3). Таке збільшення долі актину β повинно призводити і до особливостей міграційної здатності фібробластів шкіри цього віку. Таке припущення підкріплюється результатами досліджень *in vitro*, які виявили зміни у міграційній здатності фібробластів легенів і шкіри у процесі пасивування клітинної культури – із зростанням кількості пасажів міграційні властивості фетальних фібробластів легенів не змінювались, а дермальних суттєво зменшувались (Kondo, Yonezawa, 1992). Зменшення долі γ -актину в цитоскелеті фібробластів з шкіри тварин віком 0,5 міс., у порівнянні зі фібробластами легенів того ж віку, може призводити до різного характеру або інтенсивності відповіді фібробластів на зовнішні стимули, оскільки γ -актин є компонентом стрес-фібрил (Dugina et al., 2009).

Висновки

Інтенсивність експресії генів *Actb*, *Actg1*, *Tubb1*, *Nexn* та вміст їх продуктів – маркерних білків цитоскелету β - і γ -актину, тубуліну та нексиліну в культурах фібробластів залежить від органу та віку тварин. Виявлені особливості експресії та вмісту досліджених маркерних білків цитоскелету в фібробластах легенів і шкіри повинні впливати на структуру їх актинового кортексту та системи мікротрубочок, взаємну структурну та регуляторну взаємодію цих систем і, як наслідок, – на функції, зокрема – на характер відповіді клітини на внутрішні та зовнішні стимули.

Список літератури

- Хайтлина С.Ю. Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке // Цитология. – 2007. – Т.49, №5. – 348с. /Khaytlina S.Yu. Mekhanizmy segregatsii izoform aktina v kletke // Tsitologiya. – 2007. – Т.49, №5. – 348s./
- Chen X., Thibeault S.L. Characteristics of age-related changes in cultured human vocal fold fibroblasts // Laryngoscope. – 2008. – Vol.118 (9). – P. 1700–1704.
- Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G. et al. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity // Journal of Cell Science. – 2009. – Vol.122 (16). – P. 2980–2988.
- Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell mechanics and the cytoskeleton // Nature. – 2010. – Vol.463 (7280). – P. 485–492.
- Glantz S.A. Primer of biostatistics. – McGraw-Hill, 2007. – P.298.
- Gritsenko M.A., Kot K.V., Kot Yu.G. et al. A comparative study of the growth of primary cultured skin and lung fibroblasts from rats of different ages // The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series “Biology”. – 2014. – No. 1126, issue 22. – P. 158–163.
- Khalili A.A., Ahmad M.R. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol.16 (8). – P. 18149–18184.
- Kondo H., Yonezawa Y. Changes in the migratory ability of human lung and skin fibroblasts during in vitro aging and in vivo cellular senescence // Mechanisms of Ageing and Development. – 1992. – Vol.63, issue 3. – P. 223–233.
- Parsons J.T., Horwitz A.R., Schwartz M.A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2010. – Vol.11 (9). – P. 633–643.
- Rodriguez O.C., Schaefer A.W., Mandato C.A. et al. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis // Nat. Cell. Biol. – 2003. – Vol.5 (7). – P. 599–609.
- Trepast X., Chen Z., Jacobson K. Cell migration // Compr. Physiol. – 2012. – Vol.2 (4). – P. 2369–2392.

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

Рецензент: В.А.Бондаренко / Reviewer: V.A.Bondarenko

Подано до редакції / Received: 02.05.2017