

... БІОХІМІЯ ... BIOCHEMISTRY ...

УДК: 576.3;57.085.23

Зависимость содержания коллагена и гликозаминогликанов в культуре фибробластов от числа их клеточных делений

Ю.Г.Кот, Е.В.Фальченко, Е.С.Морозова, Е.Э.Перский, К.В.Седова, А.Б.Эль Та'алу

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
kate.falchenko@inbox.ru*

Представлены результаты экспериментальных исследований зависимости содержания коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) от числа клеточных делений в культуре фибробластов роговицы глаза кролика. Установлена зависимость роста культуры от времени культивирования, характеризующаяся снижением пролиферативного потенциала. Определена динамика накопления ГАГ и коллагена в культуральной среде: показано, что накопление ГАГ начинается раньше, чем накопление коллагена. Содержание обоих биополимеров в культуре снижается с числом клеточных делений. На всём протяжении культивирования отношение коллаген/ГАГ <1.

Ключевые слова: *фибробласт, коллаген, гликозаминогликаны.*

Залежність вмісту колагену та глікозаміногліканів у культурі фібробластів від числа їх клітинних поділів

Ю.Г.Кот, К.В.Фальченко, К.С.Морозова, Є.Е.Перський, К.В.Седова, А.Б.Ель Та'алу

Наведені результати експериментальних досліджень залежності вмісту колагену та глікозаміногліканів (ГАГ) від кількості поділів клітин у культурі фібробластів рогівки ока кроля. Встановлено залежність росту культури від часу культивування, яка характеризується зниженням проліферативного потенціалу. Визначена динаміка накопичення ГАГ та колагену в культуральному середовищі: показано, що накопичення ГАГ починається раніше, ніж накопичення колагену. Вміст обох біополімерів у культурі знижується з числом поділів клітин. Протягом усього культивування співвідношення колаген/ГАГ <1.

Ключові слова: *фібробласт, колаген, глікозаміноглікани.*

Dependence of collagen and glycosaminoglycans content in fibroblasts culture on their cells divisions number

Yu.G.Kot, K.V.Falchenko, Ye.S.Morozova, Ye.E.Persky, K.V.Sedova, A.B.El Ta'alu

Results of experimental study of dependence of collagen and glycosaminoglycans (GAG) content on cells divisions number in rabbit eye cornea fibroblasts culture have been presented. Dependence of cell culture growth on the cultivation time has been determined and characterized by decrease of proliferative potential. GAG and collagen accumulation dynamic in the cultural medium has been determined. It has been shown that GAG accumulation begins earlier, than collagen accumulation. Content of both biopolymers in culture decreases with cells divisions number. During all period of cell cultivation the ratio collagen/GAG is <1.

Key words: *fibroblast, collagen, glycosaminoglycans.*

Введение

Фибробласты играют определяющую роль в морфогенезе, развитии, возрастных изменениях функциональных свойств и, по-видимому, старении соединительной ткани.

Об этом, прежде всего, свидетельствует т.н. «предел Хэйфлика» – способность фибробластов делиться лишь ограниченное число раз, причём максимальное число этих делений у человека и разных видов животных коррелирует с их видовой продолжительностью жизни (Hayflick, Moorhead, 1961; Hayflick, 1965; Хэйфлик, 1969). Естественно, что «предел Хэйфлика» должен быть связан с отмеченным в ряде работ возрастным уменьшением удельного количества фибробластов в соединительной ткани и снижением её метаболической активности (Суздальцева и др., 2007; Смирнова, 2004). Однако особенности метаболизма, в частности конструкционных биополимеров соединительной ткани, у фибробластов в зависимости от числа их делений в настоящее время

практически неизвестны. В то же время эти данные чрезвычайно важны для понимания причин возрастных изменений обмена этих биополимеров в соединительной ткани.

В связи со сказанным в работе были изучены изменения концентраций коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) в культуре фибробластов в зависимости от числа их делений.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы фибробласты из периферической (лимбальной) области роговицы глаза (*limbus cornea*) кроликов-самцов 1,5-месячного возраста, любезно предоставленные ООО «Вирола» (г. Харьков). Клетки монослоя первичной культуры (1-й пассаж) были заморожены в среде с 70% DMEM, 20% фетальной сыворотки и 10% диметилсульфоксида (DMSO) в октябре 2008 г. и сохранялись в жидком азоте.

Для наработки материала фибробласты в количестве 85×10^3 клеток, посеянные на культуральные чашки (Grenier Cellstar, 35×10 мм, США), культивировали при 37°C, 95% влажности и 5% CO₂ (H-550EV CO₂ Sensor, USA) в полноценной среде Дюльбекко с высоким содержанием глюкозы и 10% эмбриональной сыворотки KPC (Sigma, США). Замену среды проводили через каждые 48 часов культивирования (Rittié, Fisher, 2005).

Мониторинг состояния и подсчет количества клеток проводили с интервалом в 12 часов на инвертированном флуоресцентном микроскопе ERGAVAL CARL ZEISS, снабженном цифровой камерой SAMSUNG NV4. Сформировавшийся монослой фибробластов использовали для дальнейшего субкультивирования. Для пересева использовали клетки, находящиеся в начале стационарной фазы роста культуры. Для подсчета количества клеток в монослое питательную среду в культуральном сосуде заменяли раствором, содержащим 0,25% смесь версен-трипсин (Sigma, США), и инкубировали в термостате 10–15 минут при 37°C. Ход трипсинизации контролировали, просматривая культуры под микроскопом. Количество клеток, снятых с подложки трипсинизацией, измеряли в камере Горяева. Клетки окрашивали, добавляя в клеточную суспензию равный объем 0,1%-ного трипанового синего в фосфатном буфере Дюльбекко (Sigma, США). Количество живых клеток подсчитывали, вычитая количество мёртвых (окрашенных) клеток из их общего числа, и по полученным данным рассчитывали число делений в каждом пассаже.

Для определения содержания коллагена и ГАГ клетки, находящиеся в культуральной среде или выделенные из монослоя, осаждали центрифугированием при 500 об/мин. В среду добавляли последовательно 0,4 мг коллагеназы I типа (из *Clostridium histolyticum*, Sigma, США) в 2 мл натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 1мМ CaCl₂ и 0,33 мМ MgCl₂, а затем 1 мг гиалуронидазы (Sigma, США), в 2 мл натрий-фосфатного буфера, pH 7,4. Растворы инкубировали в течение 30 минут при 37°C в обоих случаях и объединяли с осадком клеток.

В полученной смеси определяли концентрацию коллагена по (Утевская, 1982) и общую концентрацию гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и гепарансульфата по D-глюкуроновой кислоте (Слущкий, 1969).

Результаты и обсуждение

Полученные в ООО «Вирола» фибробласты характеризовались стандартными для этих клеток свойствами.

После посева фибробластов рост клеточной культуры был качественно подобен во всех проведенных пассажах. Для иллюстрации сказанного на рис. 1 приведены зависимости роста культуры от времени культивирования в 3-м и 5-м пассажах, а на рис. 2 – микрофотографии фибробластов на разных этапах их культивирования во 2-м пассаже.

Как видно, после прикрепления и распластывания посеянных клеток (фаза 1) начинается экспоненциальное увеличение числа их делений (фаза 2), которое заканчивается образованием монослоя (фаза 3). В этой фазе количество клеток вначале не изменяется, а затем начинает уменьшаться.

Численные значения роста культуры приведены в табл. 1.

Как видно, при одном и том же количестве посеянных фибробластов количество клеток, прикрепившихся к подложке, постоянно во всех пассажах. В то же время их число в стабильном монослое в 5-м пассаже уменьшено по сравнению с предшествующими пассажами.

Такое снижение эффективности пролиферативного потенциала – характерная черта культур фибробластов, получаемых из различных тканей (Зорин и др., 2009).

При этом число клеточных делений в каждом пассаже также одно и то же.

Таким образом, общее число клеточных делений исследованной культуры с учётом 1-го пассажа после выделения первичных фибробластов должно составлять, в среднем до 15 делений, что совпадает с литературными данными для фибробластов кролика (Хэйфлик, 1969).

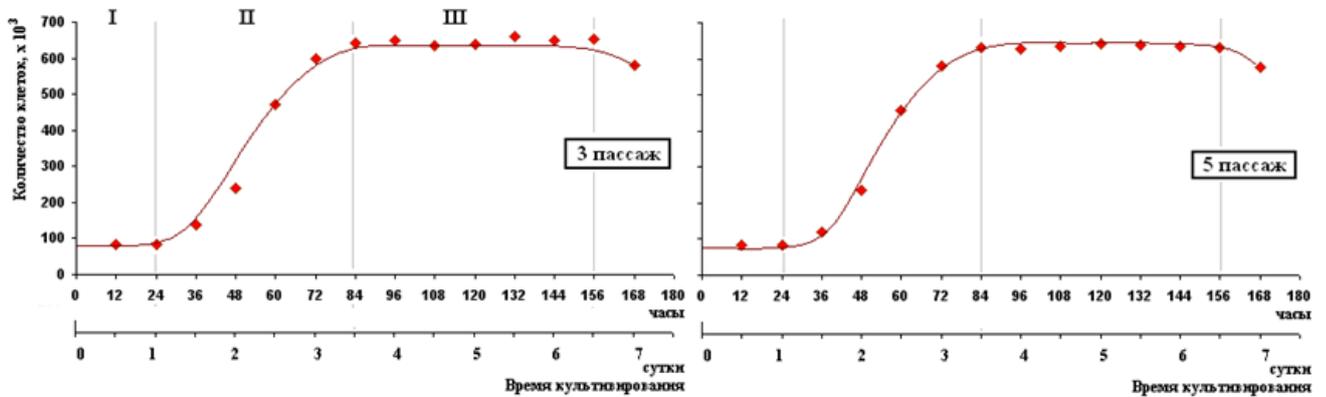


Рис. 1. Кривая роста культуры фибробластов роговицы кролика в 3-м и 5-м пассажах

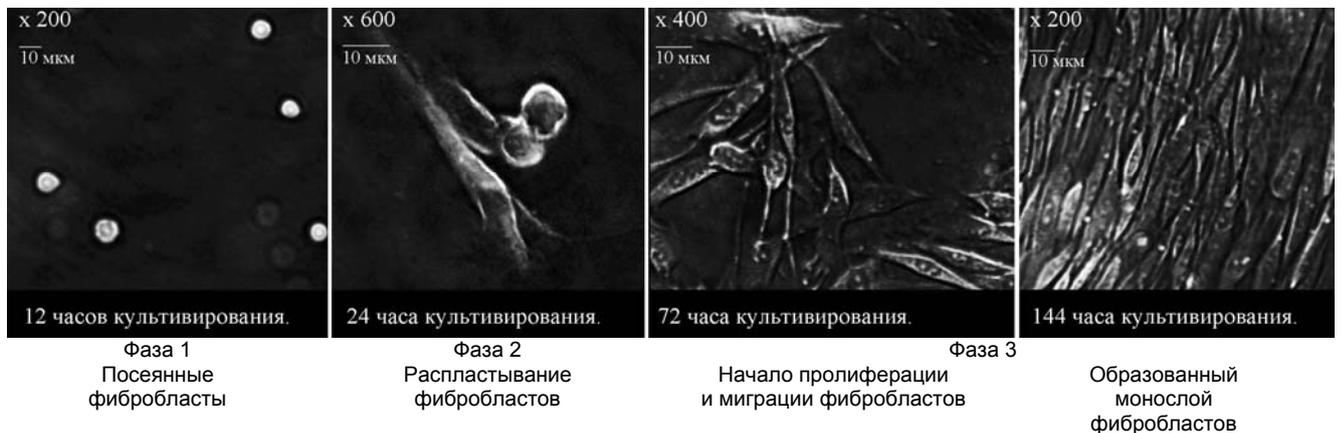


Рис. 2. Рост культуры фибробластов роговицы кролика и образование монослоя во 2-м пассаже

Таблица 1.
 Количество делений фибробластов роговицы кролика в пассажах со 2-го по 5-й

№ пассажа	Количество посеянных клеток, $\times 10^3$	Количество прикрепившихся клеток, $\times 10^3$	Количество клеток в стабильном монослое, 144 часа культивирования, $\times 10^3$	Количество делений клеток в каждом пассаже	Общее количество делений
2	84,7 \pm 2,2	82,8 \pm 2,0	659,1 \pm 3,4	3	12
3	85,0 \pm 3,1	82,5 \pm 2,0	649,6 \pm 3,9	3	
4	85,1 \pm 2,4	81,8 \pm 2,2	654,4 \pm 4,1	3	
5	85,3 \pm 2,2	83,7 \pm 2,1	634,8 \pm 3,3*	3	

Примечание: 1 пассаж, доведенный до образования монослоя первичной культуры сразу же после выделения клеток, проводился в ООО «Вирола». * – достоверно ($p < 0,05$) относительно пассажей 2–4.

На рис. 3 приведены результаты исследования изменения содержания коллагена и гликозаминогликанов в культуре фибробластов роговицы кролика в 3-м и 5-м пассажах.

Как видно, обе зависимости имеют одну и ту же форму. В фазе II роста культуры начинается увеличение содержания обоих биополимеров, оно достигает максимума в стационарной фазе III монослоя, после чего начинает снижаться.

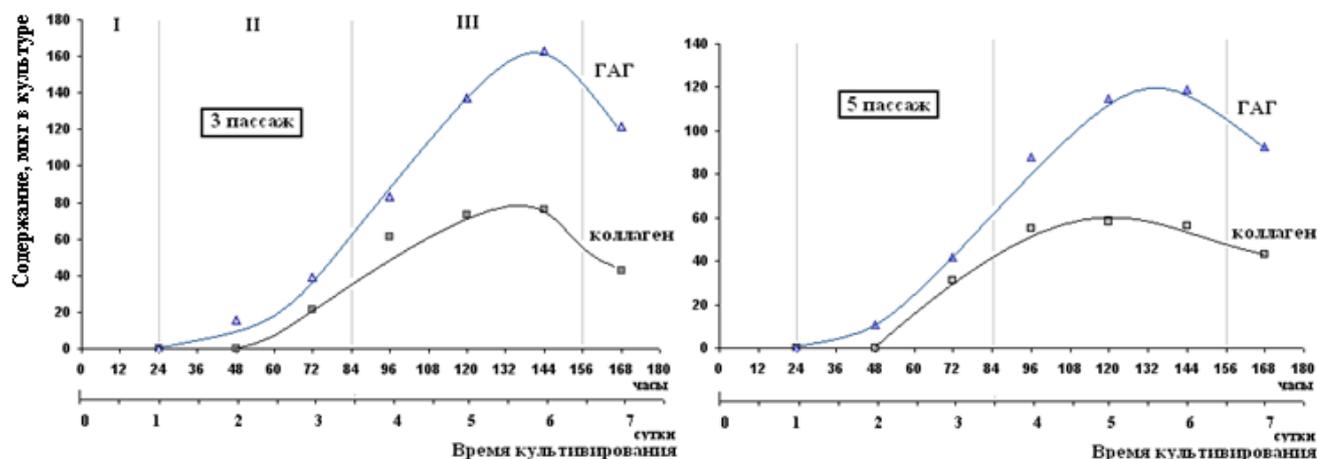


Рис. 3. Содержание коллагена и гликозаминогликанов в культуре фибробластов роговицы кролика в процессе её роста

Численные значения этих динамик приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Динамика содержания коллагена и гликозаминогликанов в культуре фибробластов в 3-м и 5-м пассажах

Фаза культивирования	Время культивирования	Содержание коллагена				Содержание ГАГ				Коллаген/ГАГ	
		3 пассаж		5 пассаж		3 пассаж		5 пассаж		3 пассаж	5 пассаж
		мкг /мл среды	на 1 клетку, пг	мкг /мл среды	на 1 клетку, пг	мкг /мл среды	на 1 клетку, пг	мкг /мл среды	на 1 клетку, пг		
I	12	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
II	48	0	0	0	0	16,7 ± 2,4	0,066 ± 0,010	11,5 ± 1,3	0,046 ± 0,008	-	-
	72	21,0 ± 3,6	0,035 ± 0,007	31,3 ± 4,1	0,053 ± 0,009	39,6 ± 4,6	0,065 ± 0,013	42,8 ± 4,9	0,072 ± 0,018	0,538 ± 0,063	0,731 ± 0,080
III	96	61,2 ± 5,8	0,093 ± 0,022	55,0 ± 5,3	0,087 ± 0,020	83,7 ± 7,4	0,127 ± 0,031	88,3 ± 8,0	0,140 ± 0,040	0,732 ± 0,081	0,621 ± 0,072
	120	73,6 ± 6,1	0,114 ± 0,028	58,1 ± 5,9	0,090 ± 0,021	137,2 ± 10,3	0,214 ± 0,042	115,5 ± 8,6	0,179 ± 0,31	0,532 ± 0,060	0,502 ± 0,053
	144	76,2 ± 6,5	0,117 ± 0,026	56,2 ± 4,9	0,088 ± 0,021	163,4 ± 13,3	0,250 ± 0,046	119 ± 9,2	0,187 ± 0,36	0,468 ± 0,51	0,470 ± 0,48
	168	43,4 ± 4,2	0,074 ± 0,050	43,0 ± 4,2	0,074 ± 0,052	122,4 ± 10,3	0,209 ± 0,038	93,8 ± 7,1	0,161 ± 0,041	0,354 ± 0,049	0,459 ± 0,044

Следует отметить, что изменения содержания биополимеров в культуре отчётливо зависят от возраста фибробластов – номера пассажа и числа клеточных делений.

В обоих пассажах максимумы содержания обоих типов биополимеров в каждом пассаже отмечаются в промежуток времени между 120 и 144 часом культивирования. Однако абсолютные величины этих максимумов в 3-м и 5-м пассажах различны. В 3-м пассаже (6 делений клеток) максимумы содержания коллагена и ГАГ превышают эти максимумы в 5-м пассаже (12 делений клеток, табл. 2) на 35,7% и 37% соответственно.

Характерно, что динамика накопления коллагена и ГАГ в культуральной среде неодинакова. В обоих пассажах накопление ГАГ начинается уже на 48 часе культивирования, а коллагена – только на 72 часе.

По-видимому, фибробласты синтезируют ГАГ более интенсивно, чем коллаген. Об этом свидетельствует и более высокое удельное содержание ГАГ в расчёте на одну клетку, и величина отношения коллаген/ГАГ, меньшая единицы.

Аналогичные взаимоотношения интенсивностей синтеза коллагена и ГАГ отмечены и в различных разновидностях соединительной ткани (Schaefer, Roux, 1996; Galambos, 1977).

Возможно, эти взаимоотношения, которые в значительной степени определяют функциональные свойства ткани, запрограммированы в фибробластах.

Выводы

1. В изученной клеточной культуре пролиферативный потенциал фибробластов достоверно снижается с каждым последующим пассажем.

2. Накопление коллагена и ГАГ в клеточной культуре фибробластов достоверно уменьшается с увеличением числа клеточных делений.

Благодарности

Авторы признательны директору ООО «Вирола» Ю.Е.Микулинскому за предоставленную культуру фибробластов, консультации и помощь в работе.

Список литературы

Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С., Черкасов В.Р. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т.IY, №4. – С. 26–40. /Zorin V.L., Zorina A.I., Petrakova O.S., Cherkasov V.R. Dermal'nyye fibroblasty dlya lecheniya defektov kozhi // Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. – 2009. – T.IY, №4. – S. 26–40/

Слущкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 375с. /Slutskiy L.I. Biokhimiya normal'noy i patologicheskii izmenennoy soedinitel'noy tkani. – L.: Meditsina, 1969. – 375s./

Смирнова И.О. Функциональная морфология старения кожи // Успехи геронтологии. – 2004. – Т.13. – С. 44–51. /Smirnova I.O. Funktsional'naya morfologiya stareniya kozhi // Uspekhi gerontologii. – 2004. – T.13. – S. 44–51/

Сuzдальцева Ю.Г., Бурунова В.В., Вахрушев И.В. и др. Сравнительный анализ цитофенотипов, способности к дифференцировке и иммунологические свойства клеток мезенхимного ряда в культурах постнатальных органов и тканей человека // Всероссийская и международная научная конференция «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении». – Москва, 2007. (<http://rsmu.ru/1344.html>) /Suzdal'tseva Yu.G., Burunova V.V., Vahrushev I.V. i dr. Sravnitel'nyy analiz tsitofenotipov, sposobnosti k differentsirovke i immunologicheskiye svoystva kletok mezenkhimnogo ryada v kul'turakh postnatal'nykh organov i tkaney cheloveka // Vserossiyskaya i mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya «Stvolovyye kletki i perspektiva ikh ispol'zovaniya v zdravookhraneni». – Moskva, 2007/

Утевская Л.А. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. – 1982. – №226. – С. 18–20. /Utevsкая L.A. Prostoi metod opredeleniya summarnogo i svobodnogo oksiprolina // Vestn. Khar'k. un-ta. – 1982. – №226. – S. 18–20/

Хэйфлик Л. Клетки человека и старение // Молекулы и клетки. – М.: Мир, 1969. – Вып.4. – С. 215–222. /Heiflik L. Kletki cheloveka i starenie // Molekuly i kletki. – M.: Mir, 1969. – Vyp.4. – S. 215–222/

Galambos J.T. The rate of synthesis of glycosaminoglycans and collagen by fibroblasts cultured from adult human liver biopsies // The Journal of Clinical Investigation. – 1977. – Vol.60. – P. 107–114.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. – 1965. – Vol.37. – P. 614–636.

Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. – 1961. – Vol.25. – P. 585–621.

Rittié L., Fisher G.J. Isolation and culture of skin fibroblasts // Methods in Molecular Medicine. – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.

Schaefer T., Roux M. Glycosaminoglycans modulate cell-matrix interactions of human fibroblasts and endothelial cells in vitro // Journal of Cell Science. – 1996. – Vol.109. – P. 479–488.

Представлено: В.В.Давидовим / Presented by: V.V.Davydov

Рекомендовано до друку: В.В.Клименком / Recommended for publishing by: V.V.Klimenko

Подано до редакції / Received: 1.10.2010