
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 57.085

ЛИНИЯ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ – НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ КОЖИ

© 2021 г. Ю.А. Чикиткина¹, Е.В. Сытина¹, А.А. Алексеев², А.А. Пантелеев^{1,*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² ФГБУ «НМИЦ хирургии имени А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия

* E-mail: Panteleev_AA@nrcki.ru

Фибробласты являются основными резидентными клетками соединительной ткани. Многие патологические процессы в коже сопровождаются нарушениями работы этих клеток. Например, плохо поддающиеся лечению грубые рубцы образуются из-за чрезмерной сократительной активности фибробластов при заживлении ран и ожогов. Традиционно в качестве экспериментальной модели *in vitro* используются либо первичные дермальные фибробласты, либо immortalized эмбриональные фибробласты мыши 3T3/N1H. Однако использование первичных клеток ограничено из-за низкой способности к пассированию, а фенотип клеток 3T3/N1H имеет мало общего со специфическим фенотипом дермальных фибробластов. Работа посвящена созданию стабильной линии постнатальных дермальных фибробластов, эффективно сочетающей основные свойства как первичных, так и immortalized клеток. Спонтанная immortalization дермальных постнатальных (P5) фибробластов мышей C57BL/6 в соответствии с протоколом 3T3 была использована для получения новой линии dp3T3. Проведено сравнение dp3T3 с первичными фибробластами мыши и клетками 3T3/N1H с использованием методов экспрессионного анализа (РТ-ПЦР, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимия), кариотипирования и оценки сократительной активности. По морфологии клеток, количеству хромосом, сократительной способности, содержанию гладкомышечного актина, паттерну экспрессии ColI и уровням профибротических цитокинов Lox и CTGF новая линия dp3T3 значительно ближе к первичным фибробластам, чем клетки линии 3T3/N1H, что делает их перспективной экспериментальной моделью для биоинженерии кожи человека и для исследования раневой контракции.

ВВЕДЕНИЕ

Способность восстанавливать ткани после повреждения является жизненно важной для любого организма. Особую значимость эта способность имеет для кожных покровов, защищающих организм от воздействия агрессивных факторов внешней среды. При этом главной проблемой является максимально быстрое восстановление целостности барьеров. Нормальный процесс заживления кожных ран включает в себя целый ряд последовательно сменяющих друг друга событий, слаженное взаимодействие сложных молекулярных каскадов и сигнальных путей, благодаря которым осуществляется миграция клеток, синтез внеклеточного матрикса и его ремоделирование. При отклонениях от нормального процесса заживления наблюдается формирование грубых рубцов и контрактур. Несмотря на успехи современной медицины и развитие новых технологий, рубцовые осложнения

остаются одной из самых сложных, актуальных и обсуждаемых проблем в биомедицине [1].

Фибробласты – основные резидентные клетки соединительной ткани. Синтез и поддержание матрикса и, следовательно, формообразование, механика ткани, заживление – все эти жизненно важные функции находятся в их компетенции. Именно с нарушениями деятельности фибробластов как основного эффекторного звена в конечном итоге связано формирование патологических рубцов и контрактур при заживлении обширных кожных ран и ожогов. Известно, что формирование патологических рубцов связано, в первую очередь, с трансформацией фибробластов в миофибробласты и их чрезмерной активностью [2]. Миофибробласты образуются в конце фазы пролиферации и отвечают за стягивание краев раны и синтез внеклеточного матрикса [3]. Основным маркером миофибробластов является гладкомышечный актин – α (SMA).

Экспрессия α SMA регулируется различными сигнальными молекулами (TGF- β , CTGF) [4] и механическими свойствами микроокружения [5].

В 1961 году Леонард Хейфлик показал, что при длительном субкультивировании фетальных фибробластов человека в среде, богатой всеми необходимыми веществами, к 40–60 пассажам происходит постепенное старение клеточной линии, характеризующееся увеличением времени удвоения популяции и накоплением клеточного дебриса. Этот предел жизни клеточной популяции, называемый лимитом Хейфлика, связан с постепенным укорочением теломерных участков хромосом в процессе митотического деления [6].

Однако, было показано, что при длительном пассировании эмбриональные фибробласты мыши способны к спонтанной иммортализации. Впервые линия иммортализованных фибробластов была получена в 1963 году при культивировании эмбриональных фибробластов мыши согласно 3ТЗ-протоколу (3-day transfer, inoculum $3 \cdot 10^5$ cells) [7]. Спонтанная иммортализация эмбриональных фибробластов мыши сопровождается мутациями в генах ARF и p53, участвующих в регуляции клеточного цикла [8, 9]. Иммортализованные фибробласты никогда не имеют нормального диплоидного кариотипа, у них присутствует контактное ингибирование, они не формируют колонии в мягком агаре и не формируют опухоли при инъекции иммунодефицитным мышам [10]. 3ТЗ-протокол также использовался для иммортализации фибробластов других видов животных: свиньи [11] и эмбриона цыпленка [12].

Традиционно в экспериментальных исследованиях физиологии кожи используется линия иммортализованных эмбриональных фибробластов мыши 3ТЗ/NIH или культура первичных фибробластов [13, 14, 15]. К сожалению, обе модели обладают существенными недостатками. Использование линии 3ТЗ/NIH не позволяет учесть тканевую специфику. Также известно, что до определенного этапа эмбрионального развития у плода рубцов не образуется, следовательно, эмбриональные фибробласты должны значительно отличаться от постнатальных [16, 17, 18]. При использовании в качестве объекта исследования первичных культур клеток взрослого организма, в том числе фибробластов, недостатком является небольшая продолжительность жизни культуры, что требует большого количества материала, а также затрудняет стандартизацию и проведение долгосрочных экспериментов.

Таким образом, встает вопрос о получении более специализированной модели, позволяющей изучать молекулярные механизмы заживления, характерные именно для кожи.

В ходе данной работы впервые была получена иммортализованная линия дермальных фибробластов мыши с использованием 3ТЗ-протокола из постнатальных дермальных фибробластов для изучения молекулярных и клеточных процессов, происходящих в дерме кожи, а также для создания тканеинженерных конструкций и для исследования раневой контракции. Было проведено сравнение полученной линии дермальных постнатальных 3ТЗ фибробластов (dp3ТЗ) с линией первичных дермальных фибробластов мыши (MDF) и линией 3ТЗ/NIH, и было отмечено, что по большинству параметров (кариотип, морфология, экспрессия маркеров миофибробластов) новая линия более близка к MDF, чем линия 3ТЗ/NIH.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение, культивирование и иммортализация мышинных дермальных фибробластов

Все эксперименты с животными проводили в строгом соответствии с требованиями Local Ethics Committee on Biomedical Research (NRC «Kurchatov Institute»; Protocol #5, April 5, 2017).

Фибробласты выделяли из дермы пятидневных мышат C57BL/6 (P5) как описано ранее [19] и культивировали в соответствии с 3ТЗ-протоколом [47]. Клетки прошедшие через кризис культуры, выжившие после пассажей p28–30 и сохранившие высокий пролиферативный потенциал были обозначены как фибробласты dp3ТЗ.

Первичные мышинные эмбриональные фибробласты получали как описано ранее [20] и использовали в качестве контрольных при сравнении.

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с 50 мкг/л гентамицина, GlutaMAX™ Supplement (Gibco, MA, USA) и 10% FBS (Gibco). Для фибробластов dp3ТЗ после пассажа p60 концентрация сыворотки была снижена до 5%.

Сравнение контрактирующей способности в коллагеновом геле

$3 \cdot 10^5$ клеток dp3ТЗ (p47 и p76), 3ТЗ/NIH или MDF (p1) высевали в 2.25 мл коллагенового геля (0.1 мг/мл) в лунку стандартного 6-тилуночного планшета как описано ранее [21] и культивировали в течении 7 дней. Ежедневно проводили измерения и вычисляли площадь геля.

МТТ-тест

МТТ-тест в соответствии с инструкцией производителя (Sigma, Darmstadt, Germany). Для исследования 3Т3/NIH, MDF и др3Т3 клетки высевали в лунки 48-луночного планшета в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку. Для оценки динамики пролиферации др3Т3 фибробласты разных пассажей (p27, p33 и p45), также как фибробласты MDF и 3Т3/NIH культивировали в одинаковых условиях, ежедневно проводя МТТ-тест. Полученные данные были представлены в виде графиков (рис. 16).

ПЦР в реальном времени

Клетки высевали в лунку стандартного 6-тилуночного планшета и лизировали по достижении конfluence. Тотальную РНК выделяли, используя реагент ExtractRNA (Евроген, Москва). cDNA синтезировали с использованием набора «MMLV RT kit» (Евроген) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR (Евроген) на амплификаторе CFX96TM Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Список использованных праймеров представлен в табл. 1.

Иммуноцитохимия и окрашивание фаллоидином

Фибробласты ($5 \cdot 10^4$ клеток) культивировали на покровных стеклах в течение 2 дней и фиксировали 4% раствором параформальдегида в ФСБ 10 минут. Иммуноцитохимическое окрашивание и окрашивание с помощью Phalloidin-iFluor 488 Reagent (ab176753, Abcam, MA, USA) проводили в соответствии с протоколом производителя (Abcam

Таблица 2. List of antibodies used

Первичные антитела	Вторичные антитела (иммуноцитохимия)	Вторичные (вестерн-блот)
α SMA (ab7817)	goat anti-mouse (ab150113)	goat anti-mouse HRP (G-21040)
collagen I type (ab34710)	donkey anti-rabbit (ab150076)	goat anti-rabbit HRP (G-21234)
fibronectin (ab6328)	goat anti-mouse (ab150113)	goat anti-mouse HRP (G-21040)
lysyl oxidase (ab31238)	donkey anti-rabbit (ab150076)	goat anti-rabbit HRP (G-21234)
CTGF (ab6992)	donkey anti-rabbit (ab150076)	goat anti-rabbit HRP (G-21234)
β -actin (sc-58673)		goat anti-mouse HRP (G-21040)

ICC and immunofluorescence (IF) protocols). Ядра докрашивали DAPI. После окрашивания препараты заключали в Immu-Mount medium (Thermo Scientific, PA, USA) и просматривали на микроскопе AxioImager-2 Research Microscope (Zeiss). Список использованных антител представлен в табл. 2.

Кариотипирование

Образцы метафазных хромосом готовили как описано [22] с незначительными изменениями. Подсчет хромосом проводили для 30 метафазных пластинок при помощи микроскопа Axio Imager 2 Research Microscope (Zeiss) и программного обеспечения ImageJ (NIH; <https://imagej.nih.gov/ij/>).

Вестерн-блот

Конфлюэнтные культуры клеток MDF, 3Т3/NIH и др3Т3 лизировали в 400 мкл буфера RIPA, содержащего 200 мМ PMSF (Sigma). Концентрацию

Таблица 1. Перечень основных характеристик передатчиков S-диапазона

Ген	Номер	Прямой праймер	Обратный праймер	Ссылка
<i>Acta2</i>	NM_007392.3	GAAGGAATAGCCACGCTCAG	TGCTGTCCCTCTATGCCTCT	Wei B., Cai L., Sun D. et al. // Molecules. 2014. №19 (4). C. 4967–4985.
<i>Col1a1</i>	NM_007742.4	CTGCTGGTGAGAGAGGTGAAC	ACCAAGGTCTCCAGGAACAC	Kim S.W., Hur W., Li T.Z. et al. // Exp Mol Med. 2014, 46, e92.
<i>Fn1</i>	NM_010233.2	GTGTAGCACAACTTCCAATTACGAA	GGAATTTCGCCTCGAGTCT	Velden J.L., Alcorn J.F., Guala A.S. et al. // Am J Respir Cell Mol Biol. 2011. №44 (4). C. 571–581.
<i>Ctgf</i>	NM_010217.2	GGGCCTCTCTGCGATTTC	ATCCAGGCAAGTGCAATTGGTA	Varelas X., Samavarchi-Tehrani P., Narimatsu M. et al. // Dev Cell. 2010. №19 (6). C. 831–844.
<i>Actb</i>	NM_007393.5	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	PrimerBank: 6671509a1 https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/
<i>Lox</i>	NM_010728.3	CCAAGGGACATCGGACTTCTTAC	TGAATTCGTCCATGCTGTGGTA	Designed in house

белка в лизатах определяли методом Бредфорда. Образцы наносили в количестве 50–100 мкг белка на дорожку 6–7% полиакриламидного геля. После фореа проводили перенос на PVDF-мембрану.

Перед окрашиванием мембраны антителами проводили блокировку в 5% растворе обезжиренного молока в PBST (PBS – 0.1% Tween) в течение 12 часов при 4°C. Список использованных антител представлен в табл. 2.

Статистический анализ

Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Манна-Уитни (OriginPro 8.0; MA, USA). Величина $p < 0.05$ рассматривалась как соответствующая статистически значимой разнице.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение линии dp3T3 фибробластов

Фибробласты выделили из дермы новорожденной мыши (P5) и вели согласно 3T3-протоколу (3-day transfer, inoculum $3 \cdot 10^5$ cells) [7]. Согласно протоколу, фибробласты, выжившие и сохранившие proliferative capacity после 25–30 пассажей, можно считать иммортализованными [7]. В нашем опыте было отмечено, что на 27 пассаже происходил «кризис культуры»: появлялось большое количество клеточного дебриса, резко замедлялся рост клеток, ускорялся процесс закисления среды. После пересева (p28–p30) в культуре пропадали признаки «кризиса», и время достижения монослоя уменьшилось по сравнению с культурой до 27 пассажа,

то есть уменьшалось время удвоения популяции. Мы предполагаем, что эти изменения связаны с процессом иммортализации.

Для подтверждения перехода фибробластов от нормального к иммортализованному состоянию, при помощи МТТ-теста оценивали уровень суммарной метаболической активности клеток. Количество клеточных делений в культуре ограничено (лимит Хейфлика). Суммарная метаболическая активность первичной культуры постепенно снижается в соответствии с уменьшающимся количеством клеток. При иммортализации культуры этого не происходит, поскольку клетки продолжают активно делиться. Для анализа уровня клеточного метаболизма были выбраны пассажи 27, 33, 45 полученной нами линии dp3T3 и классическая линия 3T3/NIH. (рис. 1). Для каждой временной точки было использовано 6 биологических повторностей, на графике показано среднее значение по шести точкам и стандартное отклонение.

Видно, что дермальные постнатальные фибробласты dp3T3 на 27 пассаже ещё не прошли трансформацию, и суммарная метаболическая активность образца заметно снижена по сравнению 33 и 45 пассажами. Динамика изменения суммарной метаболической активности образца dp3T3 фибробластов на 33 и 45 пассажах сходна, что говорит о стабилизации полученной линии (рис. 1б). Показатели МТТ-теста для дермальных иммортализованных фибробластов значительно выше, чем для фибробластов 3T3/NIH.

Параллельно был проведен анализ времени удвоения: скорость пролиферации dp3T3 фиброб-

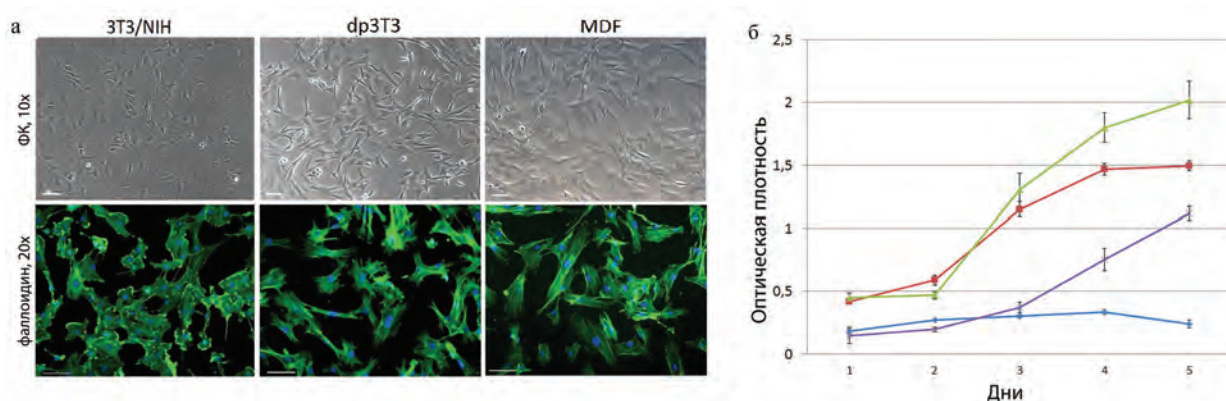


Рис. 1. Получение и характеристика линии dp3T3 фибробластов. а) Сравнение морфологии dp3T3 фибробластов, MDF и 3T3/NIH фибробластов после двух дней культивирования. ФК – фазовый контраст, 10х, 20х, 40х – увеличение объектива. Масштабный отрезок – 100 мкм. б) Результаты МТТ-теста для дермальных фибробластов на разных пассажах и линии 3T3/NIH, показано среднее значение и стандартное отклонение

ластов (p50) выше (время удвоения $18,6 \pm 1,6$ часа), чем скорость пролиферации ЗТЗ/НИН (время удвоения $24,8 \pm 1,2$ часа) и скорость пролиферации MDF (время удвоения $28 \pm 4,75$ часов).

2. Характеристика линии дрЗТЗ фибробластов

а. Кариотипирование линии дрЗТЗ фибробластов.

При кариотипировании линии дрЗТЗ было проанализировано 30 метафазных пластинок. Обнаружено, что число хромосом варьирует от 39 до 59, среднее количество хромосом 50, медиана 52 хромосомы. Согласно литературным данным, кариотип линии иммортализованных эмбриональных фибробластов ЗТЗ/НИН состоит из 52–82 хромосом (среднее число 75) [23]. Таким образом, кариотип полученной линии дрЗТЗ ближе к нормальному кариотипу мыши, чем кариотип линии ЗТЗ/НИН.

б. Сравнение морфологии фибробластов линий дрЗТЗ, ЗТЗ/НИН и MDF.

Морфология дрЗТЗ фибробластов и эмбриональных фибробластов ЗТЗ/НИН различна. По морфологии ЗТЗ/НИН фибробласты ближе к первичным мышинным эмбриональным фибробластам стадии E18, а дрЗТЗ – к первичным дермальным фибробластам мыши (MDF). Как MDF, так и дрЗТЗ фибробласты имеют веретенообразную форму, в то время как фибробласты ЗТЗ/НИН сильнее распластываются по субстрату, а формы клеток более округлые (рис. 1а). Окрашивание с использованием фаллоидина после двух дней культивирования показало, что в ЗТЗ/НИН фибробластах фибриллярный актин сосредоточен, главным образом, на ведущем краю ламеллоподий и диффузно распределен в цитоплазме, тогда как у MDF и дрЗТЗ филоподии преобладают над ламеллоподиями, и в цитоплазме выявляются характерные сократительные стресс-фибриллы гладкомышечного актина (то есть, наблюдается большее сходство с «сократительным» фенотипом) (рис. 1а).

Таким образом, полученная нами линия дрЗТЗ фибробластов по морфологическим характеристикам ближе к линии MDF, чем классическая линия ЗТЗ/НИН.

3. Сравнительный анализ уровня

экспрессии некоторых ключевых генов, играющих важную роль при заживлении ран, в трех линиях фибробластов (дрЗТЗ, ЗТЗ/НИН и MDF).

а) Гладкомышечный актин- α и сократительная способность фибробластов

Белок гладкомышечный актин- α (α SMA) – основной маркер миофибробластов. Для сравнения

сократительной способности фибробластов дрЗТЗ с ЗТЗ/НИН и MDF анализировали уровень РНК и белка α SMA.

Результаты ПЦР в реальном времени выявили значительную разницу в экспрессии α SMA: в ЗТЗ/НИН фибробластах экспрессия α SMA ниже, чем в дрЗТЗ фибробластах и в MDF (рис. 2г). Результаты Вестерн-блота подтверждают данные ПЦР в реальном времени: количество белка α SMA в дрЗТЗ фибробластах и в MDF выше, чем в ЗТЗ/НИН фибробластах (рис. 2в). Кроме того, было проведено окрашивание антителами к α SMA. Данные иммуноцитохимии подтвердили данные ПЦР и Вестерн-блота, и было отмечено, что в культуре не все клетки положительны по α SMA. В фибробластах ЗТЗ/НИН белок α SMA расположен диффузно в цитоплазме клеток, а в дрЗТЗ и в MDF он находится в составе стресс-фибрилл (рис. 2а) – структур, являющихся характерной чертой миофибробластов, обладающих выраженной сократительной способностью. Таким образом, сравнительный анализ показал, что по экспрессии α SMA полученная линия ближе к первичным дермальным фибробластам мыши, чем линия ЗТЗ/НИН.

Основным методом оценки способности фибробластов к контракции является сокращение коллагеновых гелей *in vitro*.

Для сравнения сократительной способности исследуемых линий, фибробласты сеяли в коллагеновые гели и культивировали в течение 7 дней. Для посева были выбраны MDF p1, ЗТЗ/НИН, а также дрЗТЗ p47 и p76 (рис. 2б).

По графикам зависимости площади коллагенового геля от времени культивирования видно, что фибробласты, полученные из постнатальной дермы (MDF), обладают большей сократительной способностью, чем линия эмбриональных фибробластов ЗТЗ/НИН. Линия дрЗТЗ по своей сократительной способности сходна с MDF. Также сократительная способность дрЗТЗ фибробластов двух разных пассажей (p47 и p76) сходна, что говорит о стабильности полученной линии.

б) Коллаген I типа

Результаты ПЦР в реальном времени не выявили статистически значимой разницы в экспрессии коллагена I между фибробластами дрЗТЗ, MDF и ЗТЗ/НИН (рис. 2д). Данные окрашивания культуры антителами к коллагену I подтвердили данные ПЦР в реальном времени. Интересно, что в отличие от распределения коллагена I в фибробластах ЗТЗ/НИН, где он детектируется в одинаковом ко-

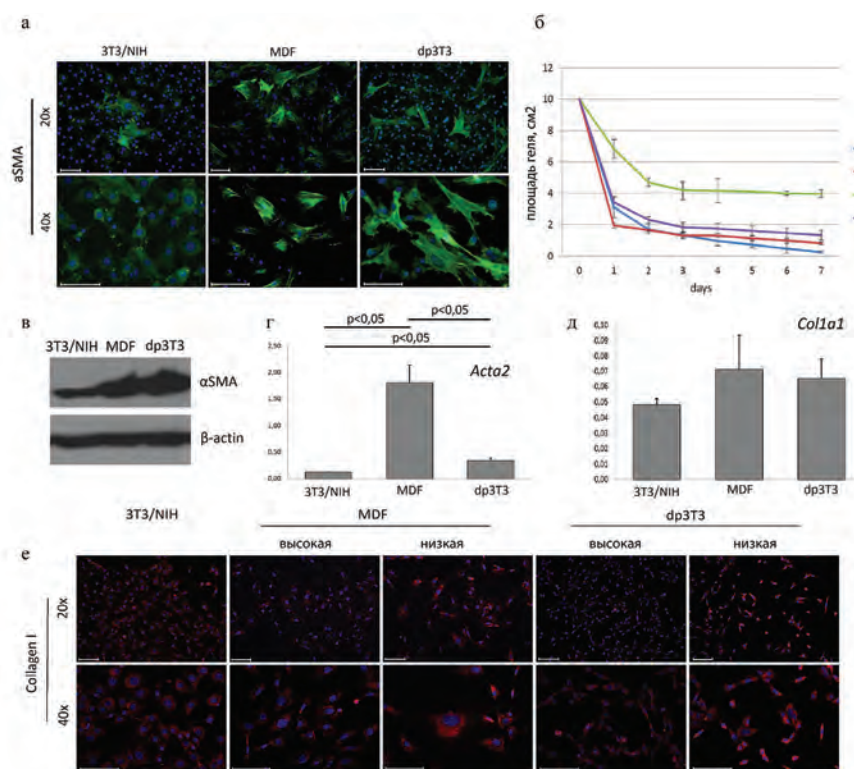


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии αSMA и коллагена I в фибробластах dp3T3, MDF и 3T3/NIH. а) Фибробласты после двух дней культивирования, иммуноцитохимическое окрашивание антителами к αSMA, 20х, 40х – увеличения объектива. Масштабный отрезок – 100 мкм. б) Сравнение контрактирующей способности фибробластов dp3T3, MDF и 3T3/NIH, на графике указано среднее значение площади коллагенового геля и стандартное отклонение. в) Результаты Вестерн-блота по количеству белка αSMA, стандартизация по β-актину. г) Результаты ПЦР в реальном времени по αSMA, стандартизация по β-актину, разница статистически значима при $p < 0.05$. д) Результаты ПЦР в реальном времени по коллагену I, стандартизация по β-актину, не обнаружено статистически значимой разницы при $p < 0.05$. е) Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к коллагену I, 20х, 40х – увеличения объектива. Масштабный отрезок – 100 мкм

личестве во всех фибробластах, в культуре dp3T3 фибробластов отмечалась гетерогенность: на тех участках, где плотность культивирования выше, сила сигнала значительно ниже, чем на участках с меньшей плотностью культивирования (рис. 2е).

с) Фибронектин

По данным ПЦР в реальном времени экспрессия фибронектина в эмбриональных фибробластах 3T3/NIH значительно выше, чем в MDF и dp3T3 фибробластах. Данные иммуноцитохимии и данные Вестерн-блота совпадают, но несколько отличаются от данных реал-тайм-ПЦР для фибронектина (рис. 3б, в): большее количество белка детектируется в MDF, чуть меньше в 3T3/NIH и минимальное количество – в dp3T3 фибробластах. В dp3T3 фибробластах фибронектин диффузно распределен в цитоплазме клеток, а в культуре эмбриональных фибробластов 3T3/NIH и в культуре MDF фибронектин находится в основном вне клеток, и в меньшем количестве в клетках (рис. 3а).

д) Лизилоксидаза

Иммуноцитохимическое окрашивание антителами к lysyl oxidase (Lox) после двух дней культивирования выявило значительную разницу в количестве белка в трех линиях клеток: наибольшее количество белка выявляется в полученной нами линии dp3T3 фибробластов, наименьшее – в линии фибробластов 3T3/NIH (рис. 3а). Данные Вестерн-блота подтверждают результаты окрашивания (рис. 3в). Результаты ПЦР в реальном времени несколько отличаются от данных Вестерн-блота и иммуноцитохимии: наиболее высокий уровень РНК Lox наблюдается в MDF, а самый низкий – в полученной нами линии dp3T3 (рис. 3б). Это согласуется с полученными ранее данными о том, что постнатальные фибробласты более склонны к приобретению фенотипа миофибробластов, чем эмбриональные клетки (рис. 2а).

Во всяком случае, по количеству белка Lox dp3T3 ближе к MDF, чем к эмбриональным клет-

кам, что возможно является следствием сохранения ими тканеспецифических характеристик.

и) CTGF

По полученным нами данным иммуноцитохимического окрашивания и Вестерн-блота видно, что количество белка CTGF в MDF и фибробластах dp3T3 примерно одинаково, и намного выше, чем в фибробластах 3T3/NIH (рис. 3а, в), что находится в соответствии с данными, полученными ранее (Colwell et al., 2006). По данным ПЦР в реальном времени уровень экспрессии CTGF самый высокий в MDF, средний – в dp3T3 и наименьший в линии эмбриональных фибробластов 3T3/NIH (рис. 3б).

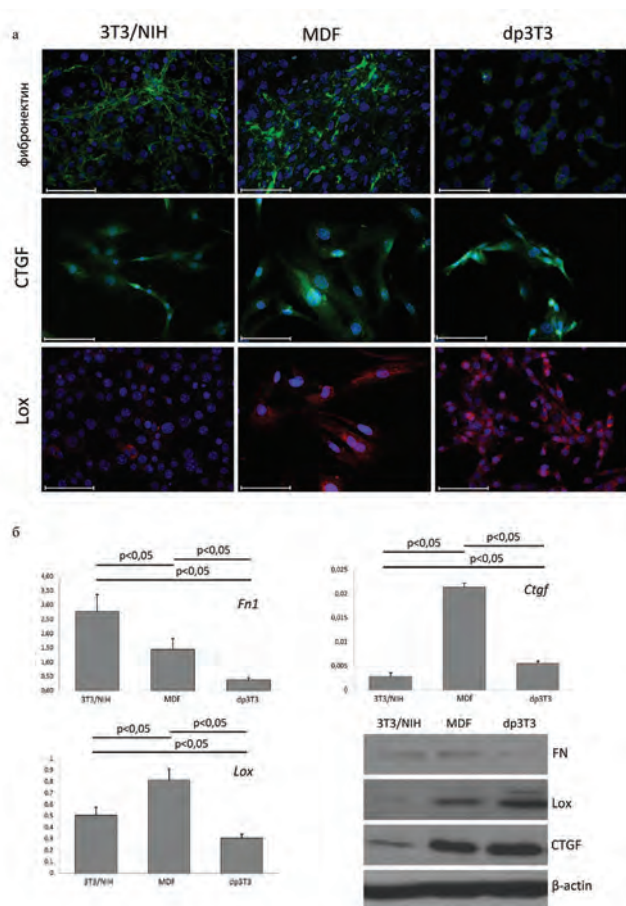


Рис. 3. Сравнительный анализ уровня экспрессии FN, Lox, CTGF, играющих важную роль при заживлении ран, в трех линиях фибробластов (dp3T3, 3T3/NIH и MDF). а) Результаты иммуноцитохимического окрашивания фибробластов dp3T3, 3T3/NIH и MDF антителами к FN, Lox, CTGF в 3T3/NIH, dp3T3 и MDF, 2 дня культивирования. Увеличение объектива – 40х, масштабный отрезок 100 мкм. б) Данные ПЦР в реальном времени, стандартизация по б-актину, различия статистически значимые при $p < 0.05$. в) Данные Вестерн-блота, стандартизация по б-актину

ОБСУЖДЕНИЕ

3T3-протокол использовали для получения иммортализованных линий эмбриональных фибробластов мыши, цыпленка [12] и постнатальных фибробластов свиньи [11]. В данной работе мы представили результаты получения иммортализованных дермальных фибробластов мыши, как наиболее распространенного модельного объекта. В процессе работы над получением линии по 3T3-протоколу на p27 мы наблюдали наступление кризиса в культуре фибробластов, а после него – увеличение пролиферативного потенциала. Таким образом, учитывая характер поведения культуры в момент, являющийся согласно протоколу моментом перехода клеток к иммортализованному состоянию, а так же то, что на момент завершения работы наша линия проходила 100 пассив, и в культуре не наблюдалось признаков старения, полученную нами линию клеток можно считать иммортализованной.

Согласно литературным данным, спонтанная иммортализация эмбриональных фибробластов сопровождается возникновением мутаций в гене p53, что приводит к снятию ареста клеточного цикла [8, 9]. В нашем случае Вестерн-блот не выявил достоверной разницы по количеству белка p53 между линиями, таким образом, для оценки имеющихся нарушений требуются дальнейшие исследования.

Кариотип является одной из основных характеристик и наиболее точным критерием для идентификации линий клеток. Полученные нами клетки, как и другие иммортализованные фибробласты [10] не имеют нормального диплоидного кариотипа и не формируют колонии в мягком агаре. Анализ кариотипа dp3T3 показал, что среднее число хромосом 52 (медиана 50), что даже ближе к норме (40 хромосом), чем у классической линии 3T3/NIH (52–82 хромосомы). Кроме того, анализ морфологии трех линий клеток (3T3/NIH, MDF, dp3T3) показал, что и по морфологическим характеристикам фибробласты линии dp3T3 ближе к MDF, чем 3T3/NIH фибробласты.

Уровень и паттерн экспрессии α SMA в фибробластах напрямую связан с их способностью приобретать характерный для миофибробластов сократительный фенотип, главной морфологической чертой которого является наличие стресс-фибрилл гладкомышечного актина- α . Следует отметить, что традиционное культивирование на жестком субстрате (пластик) способствует формированию сократительного фенотипа, причем для фиброб-

ластов его выраженность зависит от плотности культивирования: чем плотность ниже, тем больше доля α SMA-положительных клеток. Иммуноцитохимия подтвердила эти наблюдения для всех трех исследованных линий. Причем по количеству и локализации этого белка α 3T3 также ближе к MDF (рис. 2).

Для функциональной оценки сокращающей способности использовали метод культивирования в коллагеновых гелях, подробно описанный Беллом в 1979 году [21]. По графикам зависимости площади коллагенового геля от времени культивирования видно, что фибробласты, полученные из постнатальной дермы (MDF), обладают большей сократительной способностью, чем линия эмбриональных фибробластов 3T3/N1H (рис. 2). Данные полностью согласуются с полученными ранее: на культуре фибробластов кролика было показано, что сокращающая способность эмбриональных фибробластов ниже, чем сокращающая способность дермальных фибробластов [24].

Коллаген является основным компонентом внеклеточного матрикса дермы, составляя от 70% до 80% от сухой массы кожи. Существует несколько типов коллагена, кодируемых разными генами, но преобладающими в соединительной ткани являются коллагены I, II и III типа. Коллагены играют важную роль в процессе заживления ран и контролируют форму клеток, их дифференцировку, миграцию и синтез ряда белков [25]. На начальных этапах заживления раны миофибробласты синтезируют коллаген III, который впоследствии замещается на коллаген I. Было показано, что в составе фиброзной ткани преобладает коллаген I и в небольшом количестве присутствует коллаген VI [26]. Согласно литературным данным статистически значимой разницы в уровне экспрессии коллагена I в фетальных и постнатальных фибробластах человека не обнаруживается [27]. Так как коллаген I типа является таким же маркером миофибробластов, как и α SMA, весьма вероятно, что количество белка коллагена I типа также зависит от плотности культивирования: чем плотность выше, тем белка меньше. Действительно, оказалось, что линии фибробластов 3T3/N1H, MDF и α 3T3 близки по уровню экспрессии коллагена I типа, но зависимость количества белка коллагена от плотности культивирования наблюдается только в нашей линии α 3T3 фибробластов и MDF (рис. 2).

Фибронектин — гликопротеин, представленный в растворимой димерной форме в плазме и в димерной или полимерной форме на поверхности

клеток и во внеклеточном матриксе. Фибронектин экспрессируется в большом количестве разных типов клеток и играет важную роль в клеточной адгезии и миграции. Фибронектин участвует в процессах морфогенеза, процессах заживления ран и свертывания крови. Содержание фибронектина значительно выше в дерме плода, а в дерме взрослого организма фибронектин выявляется в небольшом количестве в зоне дермально-эпидермальных контактов [16].

Известно, что в процессе образования патологических рубцов происходит чрезмерный синтез молекул внеклеточного матрикса, в том числе и фибронектина [28]. Последний служит связующим звеном/мостом между клеткой/сократительным фибриллярным аппаратом клетки и окружающим матриксом (через интегрины). В полученной нами линии уровень экспрессии фибронектина (PHK и белка) намного ниже, чем в 3T3/N1H и MDF. Данные ПЦР в реальном времени, полученные нами, согласуются с данными Coolen et al. [16]: экспрессия фибронектина в эмбриональной дерме значительно выше, чем в постнатальной. Отмечаются различия и в его распределении в клетке: в α 3T3 фибробластах фибронектин диффузно распределен в цитоплазме, а в культуре эмбриональных фибробластов 3T3/N1H и в культуре MDF фибронектин находится в основном вне клеток, и в меньшем количестве в клетках, что говорит о его активном синтезе и немедленной секреции в межклеточное пространство (рис. 3). Как эта разница в нашем случае связана со способностью клеток к миграции, формированию внеклеточного матрикса — этот вопрос требует дальнейших исследований.

Лизилоксидазы семейства Lox обеспечивают возникновение сшивок между коллагеновыми и эластиновыми фибриллами межклеточного матрикса. В литературе встречаются противоречивые данные о том, какую роль играет повышение экспрессии Lox в клетках. В некоторых работах отмечается, что повышение экспрессии Lox характерно для раковых клеток и способствуют метастазированию [29]. Другие исследователи считают, что наоборот, повышение экспрессии Lox приводит к подавлению роста опухолей [30]. Ингибирование лизилоксидаз Lox и LoxL приводит к снижению жесткости субстрата и уменьшению количества миофибробластов [31]. По количеству белка Lox клетки α 3T3 вновь оказались ближе к нормальным фибробластам дермы, чем к эмбриональным 3T3/N1H (рис. 3). Этот результат кажется вполне оправданным, с учетом того, что в эмбриогенезе

созревание фибриллярных белков межклеточного матрикса дермы протекает на поздних стадиях развития [32].

Белок CTGF, также известный как CCN2, принадлежит к семейству белков CCN1-CCN6, играющих важную роль в контроле экспрессии молекул внеклеточного матрикса. Белок CTGF активно экспрессируется в процессе развития организма и участвует в контроле клеточной адгезии, пролиферации, выживания, миграции и продукции внеклеточного матрикса многими типами клеток [33], играет важную роль в заживлении ран. Экспрессия CTGF индуцируется через TGF- β – сигнальный путь. Было показано, что ингибирование CTGF с использованием антисмысловых олигонуклеотидов способствует нормальному процессу заживления через подавление чрезмерной активности миофибробластов, уменьшение экспрессии тканевого ингибитора протеиназ TIMP-1 и коллагенов I и III, но не препятствует затягиванию раны [34]. Интересно, что мыши, дефицитные по CTGF, развиваются нормально, и отсутствие CTGF не влияет на заживление раны, что предполагает присутствие какого-то компенсаторного механизма [35]. Ранее было проведено сравнение эмбриональных фибробластов мыши на разных стадиях развития и фибробластов, выделенных из дермы взрослой мыши, и показано, что уровень экспрессии CTGF в эмбриональных фибробластах мыши на стадиях E17 и E19, ниже, чем в фибробластах, выделенных из постнатальной дермы [36]. По нашим данным, действительно, зрелой формы белка CTGF намного меньше в эмбриональных 3T3/NIH, чем в dp3T3 или MDF (рис. 3). Таким образом, уровень экспрессии CTGF, одного из профибротических цитокинов, согласуется с полученными нами данными относительно способности исследуемых клеточных линий дифференцироваться в миофибробласты.

Обобщая полученные данные, следует отметить, что по всем пунктам dp3T3 имеют большее сходство с MDF, чем с 3T3/NIH, что говорит в пользу сохранения ими тканеспецифических характеристик.

Работа по созданию новой клеточной линии является сложной и многокомпонентной задачей, требующей проведения большого количества тестов. Нами был успешно осуществлён первый этап этой важной и актуальной для дальнейшего развития исследований кожи работы – получение линии immortalized дермальных постнатальных фибробластов. Вместе с тем, работа требует даль-

нейшего развития: планируется продолжить анализ полученной клеточной линии, в том числе необходимо оценить ее опухолевый потенциал, миграционные свойства клеток, а также найти адекватный критерий оценки степени immortalization линии, так как в литературе достаточных данных по этому вопросу нет.

Работа поддержана внутренним финансированием НИЦ Курчатовский институт (приказ 1058), а также грантом РФФИ № 19-015-00306.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Strong A.L., Neumeister M.W., Levi B. // *Clin Plast Surg*. 2017, №44(3), p. 635–650.
2. Darby I.A., Zakuan N., Billet F., Desmouliere A. // *Cell Mol Life Sci*. 2016, №73(6), p. 1145–1157.
3. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y. et al. // *Nature*. 2008, №453(7193), p. 314–321.
4. Hinz B. // *J Invest Dermatol*. 2007, №127(3), p. 526–537.
5. Yeung T., Georges P.C., Flanagan L.A. et al. // *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005, №60(1), p. 24–34.
6. Hayflick L., Moorhead P.S. // *Exp Cell Res*. 1961, №25(3), p. 585–621.
7. Todaro G.J., Green H. // *J Cell Biol*. 1963, №1, p. 299–313.
8. Harvey D.M., Levine A.J. // *Genes Dev*. 1991, №5(12B), p. 2375–2385.
9. Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H. et al. // *Genes Dev*. 1998, №12(15), p. 2424–2433.
10. Stepanenko A.A., Kavsan V.M. // *Tsitol Genet*. 2012, №46(2), p. 36–75.
11. Oh H.Y., Jin X., Kim J.G. et al. // *BMC Cell Biol*. 2007, №8, p. 20.
12. Christman S.A., Kong B.W., Landry M.M. et al. // *BMC Cell Biol*. 2006, №7, p. 27.
13. Immonen J.A., Zagon I.S., McLaughlin P.J. // *Exp Biol Med*. 2014, №239(10), p. 1300–1309.
14. Sakar M.S., Eyckmans J., Pieters R. et al. // *Nat Commun*. 2016, №7, p. 11036.
15. Thangavel P., Ramachandran B., Kannan R. et al. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016, №105B, p. 1401–1408.
16. Coolen N.A., Schouten K.C.W.M., Middelkoop E. et al. // *Arch Dermatol Res*. 2010, №02(1), p. 47–55.
17. Ellis I., Banyard J., Schor S.L. // *Development*. 1997, №124(8), p. 1593–1600.
18. Moulin V., Tam B.Y., Castilloux G. et al. // *J Cell Physiol*. 2001, №188(2), p. 211–222.
19. Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001, №2(2.1).

20. Xu, J. *Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts*. *Curr. Protoc Mol Biol.* 2005, Chapter 28, Unit 28.1.
21. Bell E., Ivarsson B., Merrill C. // *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1979, №76, p. 1274–1278.
22. Bates S.E. // *Methods Mol Biol.* 2011, №767, p. 177–190.
23. Leibiger C., Kosyakova N. Mkrtchyan H. et al. // *J Histochem Cytochem.* 2013, №61(4), p. 306–312.
24. Satish L., Johnson S., Wang J.H.-C. et al. // *PLoS One.* 2010, №5(4), e10063.
25. Brett D. // *Wounds.* 2008, №20(12), p. 347–356.
26. Sabatelli P., Gualandi F., Gara S.K. et al. // *Matrix Biol.* 2012, №31, p. 187–196.
27. Rolfe K.J., Irvine L.M., Grobbelaar A.O., Linge C. // *Wound Rep Reg.* 2007, №15, p. 897–906.
28. To W.S., Midwood K.S. // *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011, №4, p. 21.
29. Wang T.-H., Hsia S.-M., Shieh T.-M. // *Int J Mol Sci.* 2017, №18(1), p. 62.
30. Kaneda A., Wakazono K., Tsukamoto T. et al. // *Cancer Res.* 2004, №64, p. 6410–6415.
31. Van der Slot A.J., Zuurmond A.M., van den Bogaerdt A.J. et al. // *Matrix Biol.* 2004, №23(4), p. 251–257.
32. Yamazaki Y., Mikami Y., Yuguchi M. et al. // *Anat. Histol. Embryol.* 2012, №41, p. 68–74.
33. Faith H.-G., Karen M.L. // *Cell Mol Life Sci.* 2011, №68(19), p. 3209–3217.
34. Sisco M., Kryger Z.B., O'Shaughnessy K.D. et al. // *Wound Repair Regen.* 2008, №16(5), p. 661–673.
35. Liu S., Thompson K., Leask A. // *Wound Rep Reg.* 2014, №22, p. 119–124.
36. Colwell A.S., Krummel A.S., Longaker T.M. et al. // *Plastic & Reconstructive Surgery.* 2006.