

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПЕРВИЧНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

**© И. В. Воронкина, К. М. Кирпичникова, Л. В. Смагина,
И. В. Кожухарова, И. А. Гамалей¹**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Эмбриональные клетки специфически регулируют экспрессию различных матриксных металлопротеиназ (ММП), обеспечивая ремоделирование внеклеточного матрикса, которое необходимо для изменений адгезии клеток и их миграции в процессе развития и дифференцировки. В настоящей работе исследовали изменения активности желатиназ (ММП-2 и ММП-9) и коллагеназ (ММП-1 и ММП-8) в процессе культивирования первичных мышиных эмбриональных фибробластов. Культивирование МЭФ продолжалось на протяжении 6 пассажей; далее со временем культура погибала. Зимография на коллагене и желатине показала, что резкие изменения всех ММП происходят на 3-м пассаже культивирования МЭФ. Появившиеся в середине культивирования активности ММП-1 и ММП-9 к концу культивирования исчезают. Наиболее значимым событием следует считать появление и дальнейшее сохранение у МЭФ в процессе культивирования коллагеназы ММП-8 и активной формы желатиназы ММП-2.

Ключевые слова: желатиназы, коллагеназы, эмбриональные фибробlastы мыши.

Мышьиные эмбриональные фибробlastы (МЭФ) традиционно используют, во-первых, для получения постоянных клеточных линий с помощью спонтанной или индуцированной иммортализации, а во-вторых — в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых клеток (Todaro, Green, 1963; Camarasa et al., 2009). Продолжительность жизни первичных эмбриональных фибробластов видоспецифична, у мышиных число клеточных удвоений невелико — 18—20 (Hayflick, 1979), поэтому культивирование МЭФ непродолжительно. Эмбриональные клетки, в том числе и МЭФ, в отличие от нормальных клеток взрослого организма могут распознаваться и лизироваться естественными киллерными клетками (ЕКК) (Sumitran et al., 1999; Frenzies et al., 2009). ЕКК традиционно рассматривают как клетки, осуществляющие иммунный надзор за состоянием клеточной пролиферации и цитодифференцировки (см. обзоры: Smyth et al., 2005; Caligiuri, 2008).

Недавно мы обнаружили, что по мере пролиферации МЭФ (на протяжении 6 пассажей от получения и начала культивирования) происходит уменьшение их чувствительности к активности ЕКК, что, возможно, отражает те изменения, которые эти клетки претерпевают на пути к остановке или спонтанной иммортализации (Гамалей и др., 2010). Иммортализованные мышиные фибробlastы 3T3 устойчивы к литическому действию ЕКК, как показано нами ранее (Филатова и др., 2006). Основой для различных внутриклеточных молекулярных изменений и изменений функций клетки (например, узнаваться и распознаваться ЕКК) может быть активность матриксных металлопротеиназ (ММП) во внеклеточном матриксе (Во-

ронкина и др., 2008). Активность ММП характеризует степень развития деструктивных процессов во внеклеточном матриксе *in vitro* и в соединительной ткани *in vivo* (Adamson, 1982; Amano et al., 2001; Sternlicht, Werb, 2001).

Поэтому задача настоящей работы заключалась в том, чтобы выяснить, зависит ли активность ММП первичных фибробластов от числа удвоений (количества пассажей), пройденных клетками.

Материал и методика

МЭФ получены в результате эксплантации 14-суточных эмбрионов самок линии СВА, скрещенных с самцами линии C57Bl/6. Для выделения и культивирования МЭФ использовали общепринятую процедуру в соответствии с 3T3-протоколом для выделения первичной культуры фибробластов (<http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/MEFs.html>). МЭФ культивировали в чашках Петри (3 см, Nunc, Дания) в среде ДМЕМ с добавлением 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) и гентамицина. Клетки пересевали 1 раз в 3 сут в соотношении 1 : 2, используя смесь трипсина и ЭДТА, и культивировали до полной остановки пролиферации.

Оценку протеолитической активности ММП определяли методом зимографии по описанному методу (Oliver et al., 1999) в собственной модификации (Воронкина и др., 2002). При проведении зимографии в качестве субстрата использовали коллаген и желатин (для определения желатиназ ММП-2 и ММП-9) и казеин (для

определения коллагеназ ММП-1 и ММП-8). Пробы кондиционированной среды отделяли от клеток центрифугированием и смешивали с буфером по Лэммли (Laemmli, 1970) без нагревания, после чего проводили электрофорез. Гель (10 % акриламида) содержал 1 мг/мл коллагена, желатина или 0.5 мг/мл казеина. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. Количество белка в пробе определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976). После проведения электрофореза гель промывали 2.5%-ным раствором Тритона X-100 2 раза по 30 мин, после чего инкубировали в течение 12 ч в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 М NaCl, 10 мМ CaCl₂ и 0.05 % Brij 35. После инкубирования гель окрашивали кумасси синим R-250; при этом зоны, содержащие ММП, проявлялись в виде неокрашенных полос. При зимографии для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, в качестве маркера использовали среду, кондиционированную фибробластами линии HT-1080 (Oliver et al., 1999). Для проведения количественного анализа гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan 2.1. Результаты денситометрии представляли в виде гистограмм.

Результаты

В наших экспериментах культивирование МЭФ продолжалось около 3 нед, в течение которых пролиферация МЭФ замедлялась и останавливалась на 6-м пассаже. Со временем культура погибала.

Активность ММП-2 и ММП-9 на протяжении 6 пассажей оценивали, используя разный субстрат для ММП при проведении зимографии — желатин (рис. 1) и коллаген (не показано). Активности коллагеназ ММП-1 и ММП-8 выявляли, используя субстрат казеин (рис. 1). На зимограммах ММП-2 и ММП-9 (рис. 1) четко видны полосы, соответствующие мол. массам их пропептидной (латентной) формы (72 и 92 кДа соответственно) и активной формы (64 и 78 кДа соответственно). На том же рисунке видна и динамика ММП по мере пассажирования клеток. У МЭФ сразу же после получения из эмбриона и посева в культуральную среду (пассаж 0) обнаруживается активность только желатиназ ММП-2 и ММП-9 по отношению к обоим субстратам (коллагену и желатину).

На нулевом пассаже клетки характеризуются значительной активностью ММП-9 и в несколько раз меньшей активностью ММП-2 по отношению к коллагену,

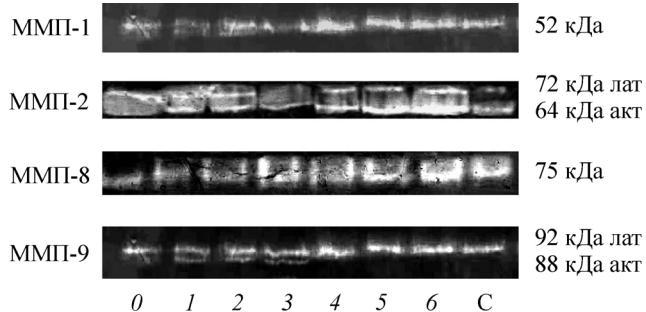


Рис. 1. Зимограммы среды, кондиционированной мышьями эмбриональными фибробластами (МЭФ) в процессе культивирования, на желатине (ММП-2, ММП-9) и казеине (ММП-1 и ММП-8).

Дорожки 0—6 — номер пассажа; С — чистая среда. Для ММП-2 и ММП-9 показаны латентная (лат) и активная (акт) формы фермента.

незначительной активностью ММП-9 и в несколько раз большей активностью ММП-2 по отношению к желатину (рис. 2). Активности коллагеназ ММП-1 и ММП-8 отсутствуют (рис. 1).

Зависимость суммарной активности ММП-2 и ММП-9 по отношению к желатину от числа пассажей, пройденных МЭФ, показаны на рис. 1 (зимограммы) и на рис. 2, а (соответствующие зимограммы денситограммы). Соотношение суммарных активностей ММП (латентной и активной форм) по отношению к желатину иное, чем по отношению к коллагену у МЭФ в начале культивирования (пассаж 0). Активность ММП-2 на желатине в несколько раз больше, чем активность ММП-9. На протяжении 2 пассажей активности обеих ММП возрастают, хотя значительное превышение активности ММП-2 сохраняется. Ситуация начинает изменяться на 3-м пассаже, когда активность ММП-9 остается высокой, а активность ММП-2 исчезает. На 4-м пассаже она появляется вновь, но при этом значительно падает активность ММП-9. Возникшее соотношение ММП-2 и ММП-9 в пользу ММП-2, равнозначное началу культивирования (пассаж 0), сохраняется до остановки пролиферации МЭФ (пассажи 4—6).

Изменение суммарной активности ММП-2 и ММП-9 по отношению к коллагену по мере пролиферации МЭФ показаны на рис. 2, б. Сразу же после посева полученных МЭФ (пассаж 0) суммарная активность их ММП-9 значительно превышает суммарную активность ММП-2. Превышение активности ММП-9 сохраняется на протяжении 2-х пассажей, после чего, как и в случае с желатином, ситуация начинает изменяться — активности обеих ММП почти выравниваются (3-й пассаж) за счет резкого падения активности ММП-9 и незначительного возрастания активности ММП-2. Принципиальные изменения происходят на 4-м пассаже, когда резко возрастает активность ММП-2, а активность ММП-9 остается низкой. Это соотношение активностей ММП-2 и ММП-9 в пользу ММП-2 сохраняется до остановки пролиферации клеток (6-й пассаж).

Присутствие коллагеназ ММП-1 и ММП-8 в среде, кондиционированной фибробластами, можно выявить, используя казеин в качестве субстрата при зимографии (рис. 1). Анализ полученных результатов показал, что активность ММП-1 и ММП-8 в среде культивирования на начальном этапе (пассаж 0) практически равна активности в интактной среде (рис. 1). В течение первых 2 пассажей активность ММП-8 полностью отсутствует (в любом случае она значительно меньше активности в интактной среде), но резко увеличивается на 3-м пассаже, после чего снижается до постоянных значений (пассажи 4—6). Активность ММП-1, наоборот, резко увеличивается в начале культивирования (пассажи 1—2), после чего снижается на 3-м пассаже и далее практически исчезает (по сравнению со средой).

Таким образом, активности всех исследованных ММП в процессе культивирования МЭФ (от момента их получения до остановки пролиферации) постепенно изменяются. МЭФ, прекратившие пролиферацию на 6-м пассаже, характеризуются следующими изменениями по сравнению с начальным этапом культивирования (пассаж 0): значительным снижением активности ММП-9 и увеличением активности ММП-2 по отношению к коллагену; неизмененной активностью ММП-2 и ММП-9 по отношению к желатину; отсутствием активности ММП-1 и увеличением активности ММП-8.

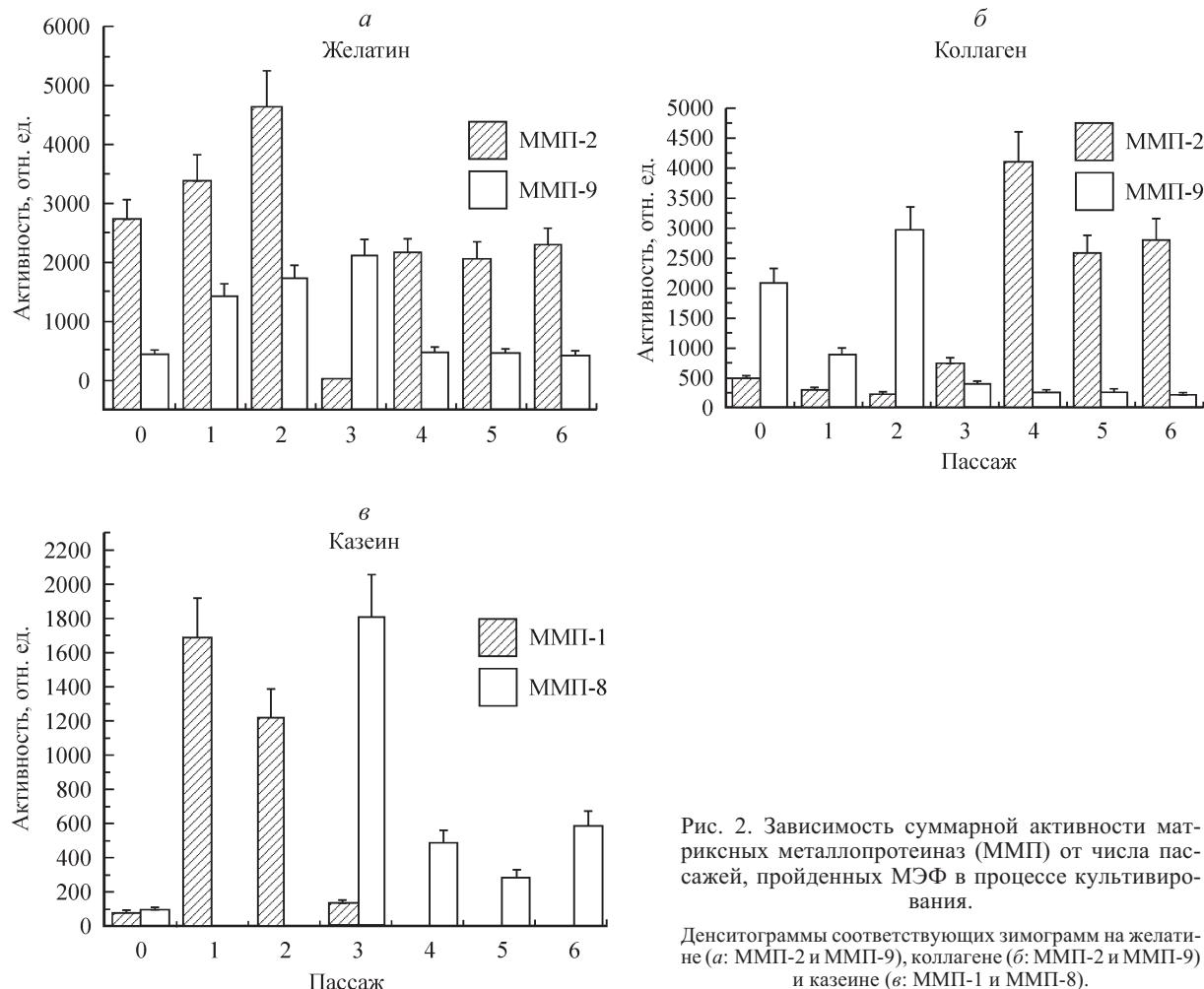


Рис. 2. Зависимость суммарной активности матриксных металлопротеиназ (ММП) от числа пассажей, пройденных МЭФ в процессе культивирования.

Денситограммы соответствующих зимограмм на желатине (*а*: ММП-2 и ММП-9), коллагене (*б*: ММП-2 и ММП-9) и казеине (*в*: ММП-1 и ММП-8).

Мы попытались разделить на зимограммах латентные (пропептидные) и активные формы желатиназ ММП-2 и ММП-9 и оценить раздельно их изменения по мере культивирования МЭФ. Денситометрия соответствующих полос зимограмм на коллагене показывает (рис. 3, *а*, *б*), что только что полученные МЭФ (пассаж 0) характеризуются наличием только активной формы ММП-9 и только латентной формы ММП-2. Уже на 1-м пассаже культивирования латентная форма ММП-2 исчезает и появляется активная. У МЭФ на 6-м пассаже сохраняются активная форма ММП-9 и активная форма ММП-2, хотя частично (начиная с 4-го пассажа) она переходит в латентную.

Аналогичная зависимость активных и латентных форм ММП по отношению к желатину показана на рис. 3, *в*, *г*. Видно, что МЭФ и в начале культивирования (пассаж 0), и на протяжении 4—6-го пассажей характеризуются одинаково — наличием только латентной формы ММП-9 и наличием обеих форм ММП-2, причем латентная более выражена, чем активная. Однако в процессе культивирования на протяжении только 1—3-го пассажей появляется активная форма ММП-9 и претерпевают изменения обе формы ММП-2.

Итак, изучение активности ММП-2 и ММП-9 по отношению к разным субстратам у МЭФ в зависимости от числа пассажей, пройденных клетками, обнаружило принципиальные изменения активности ММП по отношению к коллагену и казеину. Зимография на всех использо-

ванных субстратах показала, что резкие изменения всех ММП происходят на 3-м пассаже культивирования МЭФ. Появившиеся в середине культивирования активности некоторых ММП (ММП-1 и ММП-9) к концу культивирования исчезают. Наиболее значимым событием следует считать появление и дальнейшее сохранение у МЭФ в процессе культивирования коллагеназы ММП-8 и активной формы желатиназы ММП-2.

Обсуждение

Во время эмбриогенеза млекопитающих эмбриональные клетки определенного типа экспрессируют протеолитические ферменты семейства ММП и их ингибиторы. ММП способны гидролизовать практически все компоненты внеклеточного матрикса: коллагены всех типов, эластин, протеогликаны, ламинин и др. (см. обзоры: Adamson, 1982; Sternlicht, Werb, 2001; Mott, Werb, 2004; Клишо и др., 2005). Коллагеназы специфически гидролизуют фибриллярные коллагены, а желатиназы — коллаген IV типа (Nagase, Woessner, 1999). Эмбриональные клетки специфически регулируют экспрессию различных ММП (коллагеназ, желатиназ и стромалезинов), обеспечивая ремоделирование внеклеточного матрикса, которое необходимо для изменения адгезии клеток и их миграции в процессе развития и дифференцировки (Brenner et al., 1989; Adler et al., 1990; Young, 2004). Данные литературы

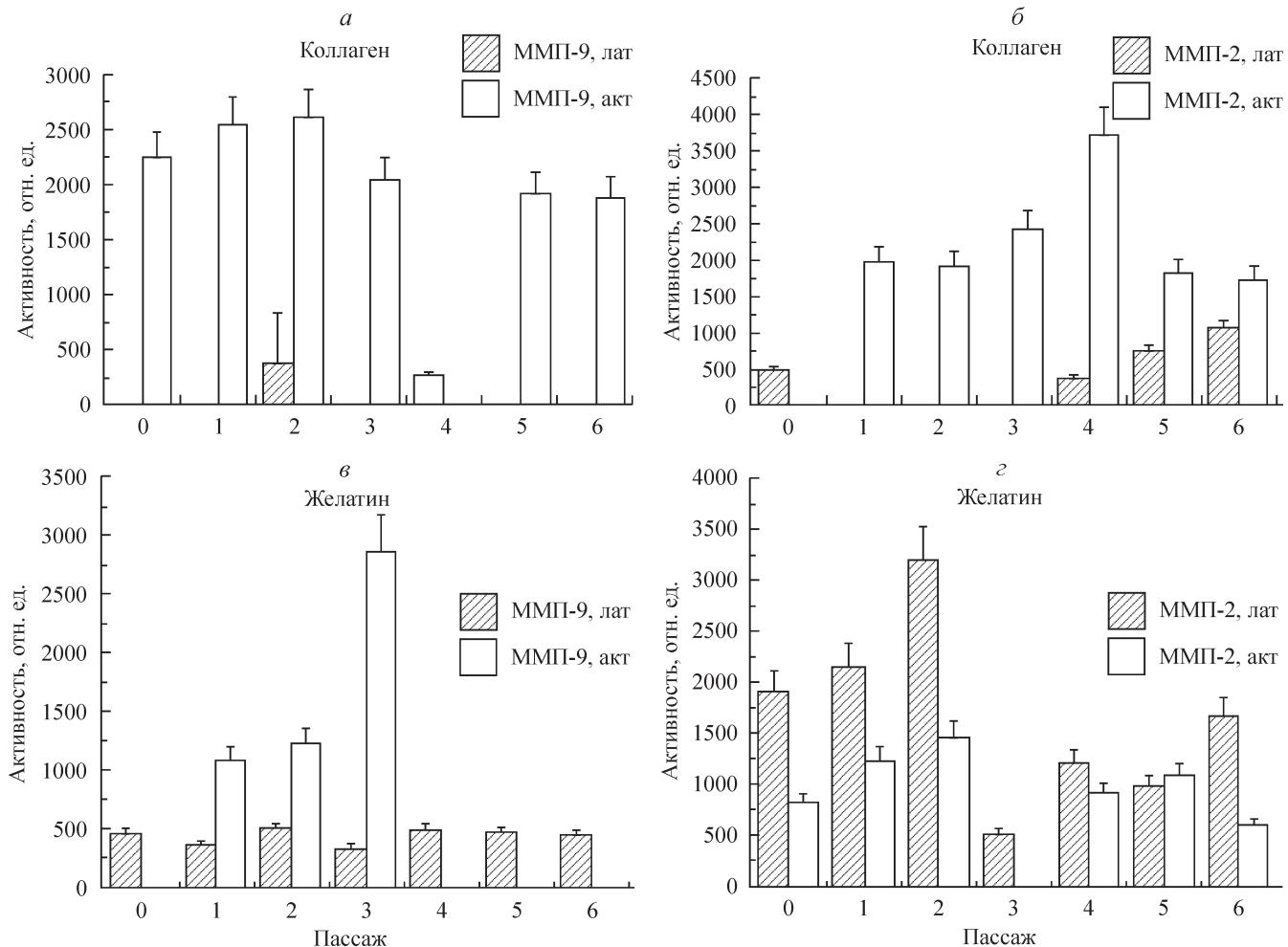


Рис. 3. Динамика латентной (лат) и активной (акт) форм ММП-2 и ММП-9 в процессе культивирования МЭФ.

Денситограммы соответствующих зигомограмм на коллагене (а, б) и желатине (в, г).

свидетельствуют о том, что объектами для исследования ММП у эмбриональных клеток служат различные линии клеток эмбриональных карцином, сохраняющих неизменный пролиферативный потенциал в процессе культивирования (исследования *in vitro*), а также клетки эмбрионов различных стадий развития (исследования *in vivo*). При этом авторов интересует роль ММП в развитии эмбриона и плода, в процессах дифференцировки и канцерогенеза, в возникновении патологий эмбрионального развития (Adler et al., 1990; Goldman et al., 2003) и ряда других патологий тканей взрослого организма (Westermarck, Kähäri, 1999; Tran et al., 2004). Основой всех изменений является ремоделирование внеклеточного матрикса, с которым авторы связывают изменения функций клеток и их поведения. Чрезвычайно мало работ относительно ММП первичных эмбриональных клеток.

В настоящей работе мы обнаружили, что у нормальных фибробластов, полученных из эмбриона, в процессе культивирования на протяжении 6 пассажей (до остановки пролиферации) изменяется активность желатиназ (ММП-2 и ММП-9) и коллагеназ (ММП-1 и ММП-8). Остановка пролиферации и дальнейшая гибель первичных МЭФ или их спонтанная иммортализация обусловлены различными изменениями клеток и на молекулярном, и на физиологическом уровнях. Очевидно, что выделенные из эмбриона и переведенные в культуральную среду

фибробlastы должны адаптироваться к другим условиям существования, образовывать новые межклеточные контакты и монослои в культуральной посуде. Этим, по-видимому, и объясняются изменения активности всех ММП на 1-х пассажах, в частности кратковременный синтез коллагеназы ММП-1 в течение первых 2 пассажей. На фибробластах кожи человека показано, что активация межклеточных контактов сопровождается экспрессией ММП, в частности ММП-1 (Sirén et al., 2006). Появление активной формы ММП-2 в процессе культивирования МЭФ, возможно, объясняет наши данные о том, что мышиные иммортализованные фибробlastы ЗТЗ имеют выраженную активность ММП-2 и менее выраженную активность ММП-9 (Воронкина и др., 2008). Эти факты подтверждаются данными литературы о том, что нормальные МЭФ обладают активностью ММП-2 (Kajanne et al., 2007) и что иммортализация первичных эмбриональных фибробластов крысы LT-геном вируса полиомы не изменяет активность этой желатиназы (Соловьева и др., 2009).

Ранее мы показали, что по мере пролиферации у МЭФ уменьшается чувствительность к липидической активности ЕКК и на 6-м пассаже она значительно меньше, чем на нулевом (Гамалей и др., 2010). А у иммортализованных мышиных фибробластов ЗТЗ эта чувствительность практически отсутствует (Филатова и др., 2006). Распознавание одних клеток другими отражает прежде всего

поверхностные свойства клеток, изменение которых трудно представить без участия ММП и структуры внеклеточного матрикса. Хотя в наших экспериментальных условиях спонтанной иммортализации МЭФ не происходило, все-таки можно связать данные, полученные на первичных МЭФ и на иммортализованных фибробластах, и заключить, что в изменениях свойств и поведения МЭФ по мере их культивирования обязательно участвуют ММП. При этом наиболее значимым конечным изменением нам кажется появление активной формы ММП-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00467), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2008. Изменение активности матриксных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология. 50 (10) : 879—883.
- Воронкина И. В., Харисов А. М., Блинова М. И., Парамонов Б. А., Потокин И. Л., Пинаев Г. П. 2002. Исследование протеолитической активности раневых экссесудатов на модели воздушного пузыря у мышей. Цитология. 44 (3) : 270—276.
- Гамалей И. А., Кирпичникова К. М., Вахромова Е. А., Филатова Н. А. 2010. N-ацетилцистеин уменьшает чувствительность трансформированных и эмбриональных клеток к лизическому действию естественных киллерных клеток. Цитология. 52 (7) : 555—561.
- Клишио Е. В., Кондакова И. В., Чойнзонов Е. Л., Васильева О. С. 2005. Прогностическая значимость протеаз у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. Бюл. СО РАМН. 2 (116) : 82—91.
- Соловьева Н. И., Винокурова С. В., Рыжакова О. С., Гуреева Т. А., Цветкова И. В. 2009. Экспрессия желатиназ А и В и их эндогенных регуляторов в иммортализованных и трансформированных фибробластах. Биомед. химия. 55 (4) : 44—50.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3T3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.
- Adamson E. D. 1982. The effect of collagen on cell division, cellular differentiation and embryonic development. In: Collagen in health and disease. Edinburgh: Churchill Livingstone. 218—243.
- Adler R. R., Brenner C. A., Werb Z. 1990. Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors is developmental regulated during endoderm differentiation of embryonal carcinoma cells. Development. 110 : 211—220.
- Amano S., Akutsu N., Matsunaga Y., Nishiyama T., Champliaud M. F., Burgeson R. E., Adachi E. 2001. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. Exp. Cell Res. 271 : 249—262.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Brenner C. A., Adler R. R., Rappolee D. A., Pedersen R. A., Werb Z. 1989. Genes for extracellular matrixdegradingmetalloproteinas and their inhibitor, TEMP, are expressed during early mammalian development. Genes and Development. 3 : 848—859.
- Caligiuri M. A. 2008. Human natural killer cells. Blood. 112 : 461—469.
- Camarasa M., Brison D., Kimber S. J., Handyside A. H. 2009. Naturally immortalized mouse embryonic fibroblast lines support human embryonic stem cell growth. Cloning Stem Cells. 11 : 453—62.
- Frenzies L. P., Abdullah Z., Kriegeskorte A. K., Dieterich R., Lange N., Busch D. H., Krönke M., Utermöhlen O., Hescheler J., Saric T. 2009. Role of natural-killer group 2 member D ligands and intercellular adhesion molecule 1 in natural killer cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Stem Cells. 27 : 307—316.
- Goldman S., Weiss A., Eyali V., Shalev E. 2003. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. Mol. Hum. Reprod. 9 : 367—373.
- Hayflick L. 1979. The cell biology of aging. J. Invest. Dermatol. 73 : 8—14.
- Kajanne R., Miettinen P., Mehlem A., Leivonen S. K., Birrer M., Foschi M., Kähäri V. M., Leppä S. 2007. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. J. Cell. Physiol. 212 : 489—497.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—683.
- Mott J. D., Werb Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Cur. Opin. Cell Biol. 16 : 558—564.
- Nagase H., Woessner J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 274 : 21 491—21 494.
- Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: Handbook of proteolytic enzymes. San Diego: Acad. Press. 61—76.
- Sirén V., Salmenperä P., Kankuri E., Bizik J., Sorsa T., Tervahartiala T., Vaheri A. 2006. Cell-cell contact activation of fibroblasts increases the expression of matrix metalloproteinases. Ann. Med. 38 : 212—220.
- Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J. A., Streit S. E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S. L., Degli-Esposti M. A., Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. Mol. Immunol. 42 : 501—10.
- Sternlicht M. D., Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu. Rev. Cell Development. Biol. 17 : 463—516.
- Sumitran S., Anderson P., Widner H., Holgersson J. 1999. Porcine embryonic brain cell cytotoxicity mediated by human natural killer cells. Cell Transplant. 8 : 601—610.
- Todaro G. J., Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell Biol. 17 : 299—313.
- Tran K. T., Griffith L., Wells A. 2004. Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. Wound Repair Regen. 12 : 262—268.
- Westermanck J., Kahari V. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J. 13 : 781—792.
- Young D. A., Gavrilov S., Pennington C. J., Nuttall R. K., Edwards D. R., Kitsis R. N., Clark I. M. 2004. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322 : 759—765.

Поступила 20 IX 2010

DYNAMICS OF MATRIX METALLOPROTEINASES ACTIVITY OF PRIMARY MURINE
EMBRYONIC FIBROBLASTS DURING CULTIVATION

I. V. Voronkina, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, I. V. Kozhucharova, I. A. Gamaley¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

Embryonic cells regulate the expression of matrix metalloproteinases (MMP) providing remodulation of extracellular matrix, which in turn provides the changes in cell adhesion and migration during the cell development and differentiation. In present work we studied the changes of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and collagenases (MMP-1 and MMP-8) activities in the process of cultivating the primary murine embryonic fibroblasts (MEF). Cultivation was continued for 6 passages, after that the culture died in time. According to gelatin and collagen zymography results, drastic changes of all MMPs activities occurred during the third passage of cell cultivation. The MMP-1 and MMP-9 activity appears in the middle of cultivation and then disappeared at the end. The most important event MEF cultivation is appearance and subsequent reservation of collagenase MMP-8 and active form of gelatinase MMP-2.

Key words: gelatinases, collagenases, primary murine embryonic fibroblasts.