

Effet *in vitro* du glucose sur le fibroblaste adventitial aortique de *Psammomys obesus*

Billel Chaouad ¹, Fouzia Zerrouk ¹, Adel Ghoul ¹, Khira Othmani-Mecif ¹, Hamid Sahraoui ²,
Samia Neggazi ², Souhila Aouichat-Bouguerra ², & Yasmina Benazzoug ¹

1. Biochimie et remodelage de la matrice extracellulaire. Laboratoire Biologie Cellulaire et Moléculaire. Faculté des Sciences Biologiques. USTHB BP 32 El Alia. Bab Ezzouar. 16111. Alger Algérie.

2. Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire. Laboratoire Biologie et Physiologie des Organismes. Faculté des Sciences Biologiques. USTHB. BP 32 Bab Ezzouar. El Alia. 16111. Alger. Algérie.

Accepté le : 11/07/2011

ملخص

يعتبر مرض تصلب الشرايين المسبب الرئيسي للوفيات في الدول المتقدمة و هو في حالة تطور مستمر في الدول النامية. عدة أبحاث عيادية و وبائية أجريت تبين أن ارتفاع في نسبة الجلوكوز مرتبط بهذا المرض. تقنيات الزراعة الخلوية سمحت لنا بدراسة مفعول الجلوكوز (15mM/l) على تكاثر عدد الخلايا وعلى بعض المعالم الخلوية لدى خلية النسيج الضام (fibroblaste) المتواجدة على مستوى الغشاء الخارجي للشرايين الأبهري لدى جرد الرمال الذي يعد من أحسن الحيوانات دراستا لأمراض القلب و الشرايين. الزراعة الخلوية تبين ارتفاع كبير في تكاثر خلايا النسيج الضام المعالجة بالجلوكوز، ارتفاع في طول المحور الأصغر الخلوي و طول المحور الأصغر و الأكبر النووي إضافة إلى ارتفاع في عدد النويات.

الكلمات المفتاحية : تصلب الشرايين - جلوكوز - خلية النسيج الضام - جدار شرايين - جرد الرمال.

Résumé

L'athérosclérose est la principale cause de décès dans les pays occidentaux et apparaît en nette progression dans les pays en voie de développement. Plusieurs études cliniques et épidémiologiques ont montré que le diabète est associé à cette maladie et pourrait donc représenter un facteur de risque. Nous avons analysé l'effet du glucose à forte concentration (15 mM) sur des fibroblastes adventitiels aortiques en culture à un passage précoce (P6) chez *Psammomys obesus*, excellent modèle pour l'étude des maladies cardio-vasculaires. Cette étude *in vitro* a concerné la prolifération cellulaire ainsi que quelques paramètres cellulaires et nucléaires. Cette étude met en évidence une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes adventitiels incubés en présence d'un milieu enrichi en glucose ainsi qu'une augmentation de leur diamètre, de leurs grands et petits axes nucléaires et du nombre de nucléoles.

Mots clés : Athérosclérose - Fibroblaste adventitial - Glucose - Paroi artérielle - *Psammomys obesus*.

Abstract

The atherosclerosis is the principal cause of death in the Western countries and appears in clear progression in the developing countries in the process of development. Different clinical and epidemiologic studies showed that the diabetes is associated to disease and could thus represent a factor of risk. We analyzed the effect of glucose with strong concentration (15 mM) on aortic adventitial fibroblasts in culture with an early passage (P 6) at *Psammomys obesus*, excellent model for the study of the cardiovascular diseases. This *in vitro* study was related to the cellular proliferation along with some cellular and nuclear parameters of these cells. This study highlights a significant increase in the proliferation of the adventitial fibroblasts incubated in the presence of a medium enriched in glucose as well as an increase by their diameter, their large and small nuclear axes and number of nucleolus.

Key words: Atherosclerosis - adventitial Fibroblast - Glucose - arterial Wall - *Psammomys obesus*.

Auteur correspondant : ybenaz01@hotmail.com ; ybenazzoug@usthb.dz

1. INTRODUCTION

L'athérosclérose est la principale cause de décès dans les pays occidentaux et apparaît en nette progression dans les pays en voie de développement [1]. Cette maladie est associée à plusieurs facteurs dont l'hypercholestérolémie, l'hypothyroïdie, l'hyperhomocystéinémie, l'hypertension artérielle, le tabagisme, l'obésité... Outre ces facteurs, de nombreuses études ont montré l'implication du diabète comme un facteur de risque. D'autre part, des travaux récents ont signalé l'implication des fibroblastes de l'adventice vasculaire dans le développement du processus de l'athérosclérose, les fibroblastes adventitiels sont activés rapidement en réponse à une variété de stimuli physiopathologiques par une augmentation de la production des ROS [2]. En effet, Un changement des concentrations extra- et intracellulaires de ROS peut avoir des effets aigus et chroniques sur la fonction vasculaire [3]. L'activation de fibroblastes adventitiels induit d'une part l'expression des protéines contractiles spécifiques des CMLs responsables de la modulation des fibroblastes en myofibroblastes [4] et d'autre part la prolifération et la migration de ces cellules vers la néo-intima où elles participent à son épaissement [5]. Ainsi, l'adventice est le siège d'une fibrose et d'une expression accrue des métalloproteinases matricielles et de leurs inhibiteurs après des dommages vasculaires [6]. Dans un précédent travail, nous avons mis en évidence des altérations de la structure de l'adventice aortique et en particulier des fibroblastes en réponse à une hyperhomocystéinémie. Cette dernière est considérée comme facteur de risque des maladies cardiovasculaires.

Toutes ces importances fonctionnelles des fibroblastes adventitiels dans les maladies cardiovasculaires expliquent l'intérêt que nous portons à étudier l'effet du glucose à la concentration de 15mM sur ces fibroblastes provenant de la paroi aortique du rat des sables, *Psammomys obesus*,

excellent modèle d'étude du diabète et des complications micro-angiopathiques [7]. Nous avons effectué une étude de la prolifération des fibroblastes adventitiels en culture secondaire à un passage précoce (6^{ème} passage ou P6) et une étude morphométrique pour certains paramètres fibroblastiques.

2. MATERIEL & METHODES

2.1 Matériel biologique

Cette expérimentation a porté sur les rats des sables, *Psammomys obesus*. Ces rats sont des animaux déserticoles rencontrés en Afrique du Nord, en Mauritanie, en Egypte et au Soudan, ainsi qu'à travers la péninsule Arabe [8]. En Algérie, ces animaux se rencontrent dans plusieurs régions du Sahara notamment dans la région de Béni-Abbés. Pour notre expérimentation, nous avons utilisé des rats des sables provenant de la région d'Abbadla (Wilaya de Béchar) dont la capture se fait au mois de décembre.

Cet animal très sensible aux changements climatiques, peut être considéré comme le rongeur saharien le plus exigeant. Nous avons essayé de réaliser des conditions appropriées de captivité afin de réussir à le maintenir en vie au laboratoire. Les *Psammomys* (n = 13, d'un poids moyen de 118g et de sexe male et femelle) sont répartis dans des cages individuelles, munies d'une litière en sciure, renouvelée tous les deux jours et d'une boîte en bois, servant de terrier où ils recréent les conditions d'humidité proches de celles de leur biotope, en y accumulant également des plantes salées riches en eau. La température de l'animalerie est maintenue constante, aux environs de 25°C. Dans la journée, l'éclairage est réalisé par la lumière artificielle. A leur arrivée au laboratoire et afin de déterminer les valeurs moyennes de certaines paramètres morphologiques et biochimiques plasmatiques de ces rats, nous avons effectué des pesées ainsi que des ponctions

réalisées au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée. Ces ponctions sont effectuées sur des tubes héparinés pour le dosage de la glycémie, de la triglycéridémie, de la cholestérolémie et de la protéinémie, sur tubes secs pour le dosage des lipoprotéines et sur tubes citratés pour le dosage de l'homocystéine. Le sang prélevé est centrifugé (3000 tours/min) pendant 10 minutes. Le plasma recueilli est conservé à -80°C.

2.2 Dosage des paramètres biochimiques plasmatiques

Les dosages biochimiques plasmatiques sont effectués à l'aide de kits Biosystem. La détermination de la glycémie est évaluée par la méthode enzymatique à la glucose oxydase [9], celle de la protéinémie par la réaction de Biuret, et ceux de la cholestérolémie et de la triglycéridémie par la méthode de Fossati et Prencipe [10].

La détection et la quantification des lipoprotéines plasmatique ont été réalisées par le kit *REP-LIPIDE Lp(a)* par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose selon la méthode de Kalwakami [11].

Le dosage de l'homocystéine totale plasmatique est effectué grâce à la méthode *IMx homocystéine* qui est un dosage immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA) sur analyseur IMx (fabricant : Abbott).

2.3 Technique de la culture cellulaire

Après anesthésie à l'uréthane (0,4ml/100g) et dissection de l'animal, l'aorte est prélevée puis rincée au DMEM à 10% SVF, 1% antibiotiques (streptomycine 50µg/ml, pénicilline 50 UI/ml, Gibco), 5% d'hépès et 1,2% Glutamine. La media et l'intima sont ensuite éliminées et les explants adventitiels sont mis en culture primaire à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'air pendant 15 jours. Le milieu de culture

(DMEM à 15% de SVF, 1% L-glutamine et 1% antibiotiques) est changé tous les deux jours. Lorsque le tapis cellulaire est constitué, la confluence est atteinte. Les cellules sont alors soumises à une trypsination (0,1%), pendant 1 minute puis rincées au PBS à 10%. La suspension cellulaire obtenue est mise en culture afin d'obtenir les différents passages de la culture secondaire. Chaque passage nécessite au moins une période de 15 jours. Toutes les manipulations sont réalisées sous une hotte à flux laminaire verticale.

2.4 Incubation des fibroblastes en présence de glucose (15mM)

Au 6^{ème} passage, après leur trypsination et leur mise en suspension dans du DMEM à 10% de SVF, les fibroblastes adventitiels de *Psammomys* sont répartis dans des plaques multi-puits. Pour l'étude des fibroblastes témoins, une partie de la suspension cellulaire estensemencée à raison de 0,4.10⁶ cellules/ml/puit dans 6 puits, en utilisant le DMEM à 10% de SVF, 1% antibiotiques et 1,2% Glutamine. La deuxième partie de la suspension de fibroblastes adventitiels estensemencée à raison de 0,4.10⁶ cellules/ml/puit dans 6 autres puits, dans du DMEM à 10% de SVF, 1% antibiotiques, 1,2% Glutamine et glucose (15mM), ce sont les fibroblastes incubés en milieu hyperglucosé.

2.5 Etude de la prolifération des Fibroblastes adventitiels

La prolifération des fibroblastes adventitiels de *Psammomys obesus* est estimée par comptage cellulaire, grâce à la cellule de Malassez, après 72 heures d'incubation dans le DMEM supplémenté de 10% de SVF, d'antibiotiques et de glutamine (fibroblastes témoins) et en présence de glucose à raison de 15mM.

2.6 Etude morphométrique

Les fibroblastes adventitiels témoins et incubés en présence de glucose pendant 72 heures, sont fixés au Bouin aqueux pendant

30 minutes puis rincés à l'eau courante. Ils sont ensuite colorés au *May-Grunwald* (10 min) puis au *Giemsa* (10 min). Le tapis de fibroblastes est rincé au PBS à 10% et fait l'objet d'une étude morphométrique cellulaire et nucléaire. Pour chaque paramètre morphométrique étudié, nous avons effectué 50 mesures afin de déterminer le petit axe ou diamètre des fibroblastes, les grands et petits axes nucléaires ainsi que le nombre de nucléoles présent dans chaque noyau.

2.7 Etude statistique

Le test utilisé dans le cadre de notre travail est le test de Student *t*. Pour chaque série d'analyse, la moyenne et l'écart type sont calculés. La valeur de *t* nous donne le degré de signification P lu sur la table de Student. Le degré de significativité utilisé dans les résultats est $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) et $P < 0,0001$ (****).

3. RESULTATS

3.1 Caractéristiques pondérale et biochimique plasmatique des *Psammomys obesus*

Les caractéristiques pondérales et biochimiques plasmatiques des *Psammomys obesus* témoins sont rapportées dans le tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des rats des sables, *Psammomys obesus*.

Paramètres	Rats témoins
Poids (g)	118,20 ± 13,54
Glycémie (mg/dl)	40,63 ± 05,98
Protéïnémie (mg/dl)	40,21 ± 10,33
Triglycéridémie (mg/dl)	32,24 ± 09,61
Cholestérolémie (mg/dl)	44,68 ± 16,17
HDL (%)	55,51 ± 08,32
LDL-VLDL (%)	40,70 ± 07,07
Homocystéïnémie (µM)	1,05 ± 0,49

3.2 Etude de la prolifération

Les résultats de la prolifération des fibroblastes adventitiels de *Psammomys obesus* témoins et soumis au glucose (15mM) pendant 72 heures sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2. Influence du glucose (15mM) sur la prolifération, *in vitro*, des fibroblastes adventitiels aortiques du rat des sables, *Psammomys obesus*.

Nombre des cellules / ml	Témoins	Traités au glucose (15mM)
6 ^{ème} passage	0,4.10 ⁶	0,4.10 ⁶
Après 72 heures d'incubation	(0,517 ± 0,038).10 ⁶	(1,11 ± 0,25).10 ⁶ ***

Les valeurs reportées dans le tableau représentent la moyenne affectée de son écart-type.

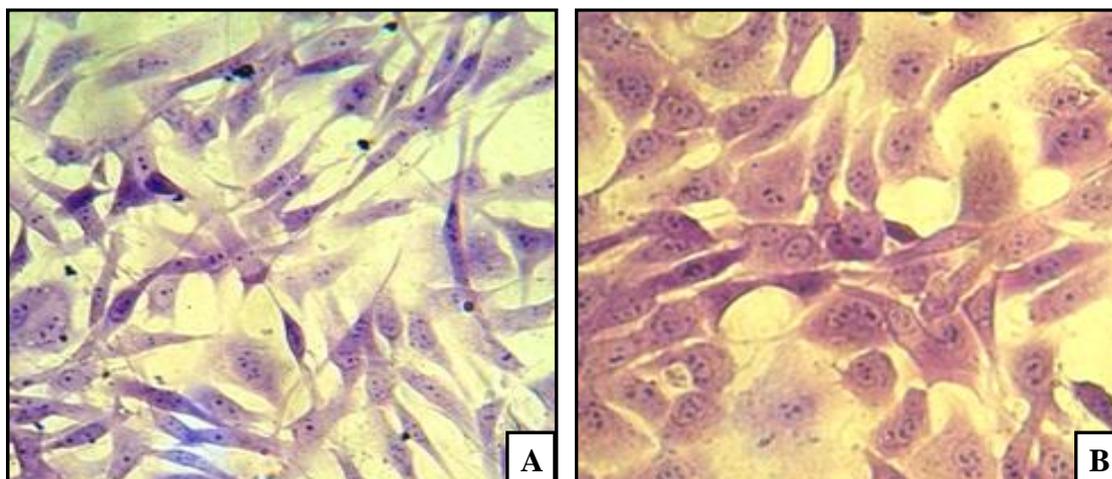
Traité vs Témoin : *** $P < 0.001$

Une prolifération des fibroblastes adventitiels est enregistrée après 72 heures d'incubation dans les 2 conditions expérimentales. Nos résultats montrent que le taux de prolifération est de 29,25% pour les fibroblastes témoins. En présence de glucose, ce taux est significativement ($P < 0.001$) augmenté et atteint une valeur de 177,5%.

La prolifération des fibroblastes adventitiels incubés dans un milieu enrichi en glucose (0,3%) est donc 6 fois plus importante que celle des fibroblastes incubés dans un milieu standard.

3.3 Etude morphométrique

L'augmentation de la prolifération enregistrée et l'aspect des cellules en culture (figure 1) en présence de glucose nous a incité à étudier les caractéristiques morphométriques des fibroblastes adventitiels. Les résultats sont rapportés dans le tableau 3.



A : incubés dans un milieu standard.

B : incubés dans un milieu glucosé (3g/l).

Figure 1. Fibroblastes adventitiels aortiques de *Psammomys obesus* en culture secondaire.

Fixation au Bouin aqueux. Coloration *May-Grunwald-Giemsa*. (G.400).

Tableau 3. Action du glucose (15mM) sur la morphométrie des fibroblastes adventitiels aortiques du rat des sables, *Psammomys obesus*.

Paramètres	Fibroblastes témoins	Fibroblastes soumis au glucose (15mM)
Petits axes cellulaires (μm)	20,40 \pm 8,98	26,45 \pm 6,63 ***
Grand axe nucléaire (μm)	19,80 \pm 4,54	22,85 \pm 3,43 ***
Petit axe nucléaire (μm)	13,35 \pm 3,77	17,20 \pm 3,22 ****
Nombre de nucléoles	3,50 \pm 1,56	7,76 \pm 2,73 ****

Les valeurs reportées dans le tableau représentent la moyenne affectée de son écart-type.

Traité vs Témoin : *** P < 0.001 ; **** P < 0.0001

Après 72 heures d'incubation dans un milieu glucosé (15 mM ou 3g/l), nous avons noté une augmentation significative ($P < 0.001$) de 29,65% des diamètres ou petits axes des fibroblastes adventitiels. En effet la taille de petits axes cellulaires des fibroblastes témoins est $20,40 \pm 8,98 \mu\text{m}$, en présence de glucose elle atteint $26,45 \pm 6,63 \mu\text{m}$.

Nous avons également déterminé les dimensions (petit et grand axes) des noyaux ainsi que le nombre de nucléoles. Nos résultats montrent des modifications nucléaires des fibroblastes incubés dans un milieu enrichi en glucose. En effet, nous avons enregistré une augmentation de 15,4% du grand axe nucléaire statistiquement significative ($P < 0.001$). Une augmentation significative ($P < 0.0001$) de 28,84% est également notée pour le petit axe nucléaire, celui-ci atteint la valeur moyenne de $17,20 \pm 3,22 \mu\text{m}$ (vs $13,35 \pm 3,77 \mu\text{m}$ dans les fibroblastes témoins).

Le dénombrement des nucléoles que nous avons effectué met en évidence une augmentation de 121,71% de ce nombre dans les fibroblastes adventitiels incubés en présence de glucose ($7,76 \pm 2,73$ nucléoles en moyenne) par rapport aux fibroblastes témoins ($3,50 \pm 1,56$ nucléoles). L'analyse statistique révèle que cette différence est significative ($P < 0.0001$). Il apparaît donc qu'en présence de glucose (15mM), les fibroblastes adventitiels subissent une modulation phénotypique marquée par une augmentation de la taille de la cellule et du noyau et marquée également par une activité synthétique importante caractérisée par l'augmentation du nombre de nucléoles.

4. DISCUSSION

Nos résultats *in vitro* montrent une augmentation significative du taux de prolifération des fibroblastes adventitiels incubés dans un milieu enrichi en glucose (15mM). Un effet similaire du glucose sur des fibroblastes cutanés humains [12], sur

des myofibroblastes cardiaques de rats [13], sur des CMLs aortiques de *Psammomys obesus* [14] et sur des fibroblastes humains du cortex rénal [15] a été précédemment rapporté. Certains chercheurs ont rapporté un effet inhibiteur ou toxique de D-glucose (5,5mM et 22mM) sur la prolifération des fibroblastes cutanés humains [16]. Selon Neumann *et al.* [13], cet effet prolifératif du glucose ne serait pas lié aux changements d'osmolarité ou à la production des produits finaux de glycation, car des concentrations équimolaires de L-glucose non métabolisable n'ont pas influencé la prolifération des myofibroblastes cardiaques.

Les fibroblastes adventitiels de *Psammomys* incubés dans un milieu enrichi en glucose apparaissent moins allongés et plus volumineux que les fibroblastes témoins (fig. 1). Ces mêmes observations ont été signalées précédemment par Benazzoug [12], dans des fibroblastes cutanés humains. Cet effet dû glucose n'est pas dû à un phénomène d'osmose puisque des fibroblastes incubés en présence de mannitol ne montrent pas les modifications observées en présence de glucose.

Par ailleurs, nos résultats morphométriques montrent une augmentation significative du nombre de nucléoles dans les fibroblastes incubés dans un milieu enrichi en glucose. Cette augmentation est un indice de synthèse cellulaire accrue des protéines. En effet, Tokudome *et al.* [17] ont montré que l'exposition de fibroblastes cardiaques à une forte concentration de glucose induit clairement la synthèse d'ADN et de collagènes et stimule l'expression des gènes de la fibronectine et du TGF- β 1. De même, Lee *et al.* [18] suggèrent qu'un taux élevé de glucose (25mM) augmente la production des MMP-2 dans les fibroblastes adventitiels aortiques chez le rat par l'intermédiaire de la voie de signalisation PI3 kinase/Akt en activant le facteur de transcription NF- κ B. Aouichat Bouguerra *et al.* [14] ont noté,

dans des CMLs de *Psammomys* incubés dans un milieu contenant 15mM de glucose, une augmentation du cholestérol cellulaire libre et estérifié, des protéines totales ainsi qu'une augmentation de la biosynthèse des chaînes $\alpha 1(I+III)$ et $\alpha 2(I)$ caractérisant les collagènes fibrillaires contenus dans les CMLs et dans la MEC.

Benazzoug *et al.* [19] ont étudié l'effet de différentes concentrations (2 et 3g/L) de glucose sur la synthèse des collagènes et de fibronectine par des fibroblastes cutanés humains en culture. Ces chercheurs ont signalé une augmentation de la biosynthèse du collagène de type III corrélée à l'augmentation de son ARNm, sans changement de production du collagène de type I. Cette augmentation de la biosynthèse collagénique est associée à une augmentation de la biosynthèse de la fibronectine (glycoprotéine de la MEC). Selon Lemons *et al.* [20], l'augmentation de l'activité métabolique des fibroblastes prolifératifs est orientée vers la synthèse protéique et en partie vers l'excrétion des protéines matricielles. Par ailleurs, Tang *et al.* [21] suggèrent que la thombospondine-1 est impliquée dans la régulation de l'expression du TGF- $\beta 1$ et du collagène de type III, induite par la concentration élevée de glucose, ouvrant ainsi la voie à une éventuelle stratégie thérapeutique.

5. CONCLUSION

Ces résultats montrent l'influence du milieu environnant sur les cellules. Ils suggèrent en particulier que le milieu hyperglucosé induit une modulation phénotypique des fibroblastes adventitiels associée à une synthèse protéique importante. Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes adventitiels leur confèrent un rôle très important au cours des maladies cardiovasculaires, tels le diabète et l'athérosclérose.

REFERENCES

- [1] Bonnet J., 2005. Atherosclerosis. *EMC-Cardiol Angéiol.*, 2, 436-458.
- [2] Pagano P.J., Chanock S.J., Siwik D.A., Colucci W.S. & Clark J.K., 1998. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension.*, 32, 331-337.
- [3] Liu J., Ormsby AOja-Tebbe., N. & Pagano P.J., 2004. Gene transfer of NAD(P)H oxidase inhibitor to the vascular adventitia attenuates medial smooth muscle hypertrophy. *Circ. Res.*, 95, 587-594.
- [4] Wilcox J.N., Okamoto E.I., Nakahara K.I., & Vinten-Johansen J., 2001. Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis: a role for circulating myofibroblast precursors? *Ann NY. Acad. Sci.*, 947, 68-90.
- [5] Shi Y., O'Brien J., Fard A. & Zalewski A., 1996. Transforming growth factor beta1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16, 1298-1305.
- [6] Bradley Strauss H. & Rabinovitch M., 2000. Adventitial Fibroblasts : Defining a Role in Vessel Wall Remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Vol. 22, 1-3.
- [7] Benazzoug Y., 1981. Approche biologique d'un modèle expérimental pour l'étude du diabète : le rat des sables. Morphologie, histologie et ultrastructure du rein, du myocarde et de la peau. Mise en évidence de microangiopathies. *Thèse 3^{ème} cycle*, USTHB, Alger. 192 p.
- [8] Harrison D., 1972. The Mammals of Arabia. *Londo n: Ernest Benn Limited* Vol. 3, 98
- [9] Trinder P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24.

- [10] Fossati P. & Prencipe L., 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, 28, 2077-2080.
- [11] Kalwakami K., 1989. A rapid electrophoretic method for the detection of serum Lp (a) lipoprotein. *Clin. Chem. Acta.*, 185, 147-156.
- [12] Benazzoug Y., 1994. Vieillesse et biosynthèse de la matrice extracellulaire. Effet du glucose et des polysaccharides anioniques. *Thèse de doctorat*, USTHB, Alger. 176 p.
- [13] Neumann S., Huse K., Semrau R., Diegeler A., Gebhardt R., Buniatian G.H. & Scholz G.H., 2002. Aldosterone and D-Glucose Stimulate the Proliferation of Human Cardiac Myofibroblasts in Vitro. *Hypertension.*, 39, 756-760.
- [14] Aouichat Bouguerra S., Benazzoug Y., Bekkhoucha F. & Bourdillon M.C., 2004. Effect of High Glucose Concentration on Collagen Synthesis and Cholesterol Level in the Phenotypic Modulation of Aortic Cultured Smooth Muscle Cells of Sand Rat (*Psammomys obesus*). *Exper. Diab. Res.*, 5, 227-235.
- [15] Jones S.C., Saunders H.J., & Pollock C.A., 1999. High glucose increase growth and collagen synthesis in cultured human tubulo-interstitial cells. *Diabet. Med.*, 16, 932-938.
- [16] Sibbitt W.L., Mills R.G., Bigler C.F., Eaton R.P., Griffey R.H., Vander Jagt D.L., 1989. Glucose inhibition of human fibroblast proliferation and response to growth factors is prevented by inhibitors of aldose reductase. *Mech. Agei. Dev.*, 47, 265-279.
- [17] Tokudome T., Horio T., Yoshihara F., Suga S., Kawano Y., Kohno M. & Kangawa K., 2004. Direct Effects of High Glucose and Insulin on Protein Synthesis in Cultured Cardiac Myocytes and DNA and Collagen Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Metabolism.*, Vol. 53 (6), 710-715.
- [18] Lee S.J., Bae S.S., Kim K.H., Lee W.S., Rhim B.Y., Hong K.W. & Kim C.D., 2007. High glucose enhances MMP-2 production in adventitial fibroblasts via Akt1-dependent NF- κ B pathway. *FEBS Letters.*, 581, 4189-4194.
- [19] Benazzoug Y., Borchiellini C., Labat-Robert J., Robert L. & Kern P., 1998. Effet of high glucose concentrations on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in culture. *Exper. Gerontol.*, Vol. 33 (5), 445-455.
- [20]. Lemons J.M, Feng X.J., Bennett B.D., Lagesse-Miller A., Johnson E.L., Raitman I., Pollina E.A., Rabitz H.A., Rabinowitz J.D. & Coller H.A. 2010. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biology.*, Vol. 8 (10), Online First™
- [21] Tang M., Zhou F., Zhang W., Guo Z., Shang Y., Lu H., Lu R., Zhang Y., Chen Y & Zhong M., 2010. The role of thrombospondin-1-mediated TGF- β 1 on collagen type III synthesis induced by high glucose. *Molec. Cell. Biochem.*, Online First™.