

УДК: 576.3;57.085.23

Влияние механического растяжения фибробластов на содержание структурных биополимеров в культуре Е.В.Фальченко

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

На модели механической деформации фибробластов легкого, культивируемых на эластичной подложке, изучен характер клеточного ответа на действие моноосиального механического растяжения. Показано, что растяжение фибробластов приводит к увеличению скорости их деления *in vitro*, поляризации клеток в направлении действия силы, интенсификации выработки фибробластами коллагена и гликозаминогликанов, увеличению их коллаген- и гиалуронатлитической активности и увеличению экспрессии ими F-актина.

Ключевые слова: деформация фибробластов, коллаген, гликозаминогликаны, eGFP-актин, коллагенолиз, гиалуроноллиз.

Вплив механічного напруження фібробластів на вміст структурних біополімерів в культурі К.В.Фальченко

В культурі фібробластів легенів досліджений характер клітинної відповіді на механічне напруження. Розроблена модель механічної деформації фібробластів, культивованих на еластичному підложці. Показано, що механічне напруження фібробластів призводить до збільшення швидкості їх поділу *in vitro*, поляризації клітин у напрямку дії сили, інтенсифікації напрацювання фібробластами колагену та глікозаміногліканів, збільшенню їх колаген- та гіалуронатлітичної активності та збільшенню експресії ними F-актину.

Ключові слова: деформація фібробластів, колаген, глікозаміноглікани, eGFP-актин, колагеноліз, гіалуроноліз.

The influence of fibroblasts mechanical stretching on the content of structural biopolymers in culture K.V.Falchenko

The character of cell answer on mechanical strain in lung deformable fibroblasts culture was studied. The model of mechanical deformation of cultivated on elastic underlayer fibroblasts was developed. It was shown that mechanical strain of fibroblasts caused increase of their division rate *in vitro*, cell polarization in the direction of underlayer strain, intensification of collagen and glycosaminoglycans production by fibroblasts, increase of collagen and hyaluronatolytic activity of fibroblasts and F-actin expression.

Key words: fibroblasts deformation, collagen, glycosaminoglycans, eGFP-actin, collagenolysis, hyaluronolysis.

Введение

Экстраклеточный матрикс (ЭКМ) соединительной ткани выполняет ряд функций, среди которых одной из важнейших является морфогенетическая (Kleinmana et al., 2008; Rozario, DeSimone, 2010). Она состоит в контроле за прикреплением клеток, их поляризации, изменением формы, клеточным делением, дифференцировкой и, в конечном счете, функцией. Изменение состояния как клеток, так и ЭКМ может быть индуцировано разными химическим и физическими факторами, одним из которых является механическое напряжение в ткани, особенно важное для тех тканей, где постоянное или пульсирующее напряжение связано со специфической функцией (кожа, сосуды, легкие). Ранее, на модели переживающей ткани был показан характер клеточного ответа на действие механической нагрузки, ее влияния на синтез и соотношение конструктивных полимеров (коллагена, эластана, гликозаминогликанов) в коже и аорте (Кот, 2008). Продолжая направление исследования, в данной работе была поставлена цель: изучить в культуре деформируемых фибробластов характер их ответа на механическое растяжение. Для этого решались задачи:

- Разработать модель механического растяжения фибробластов, культивируемых на эластичной подложке.

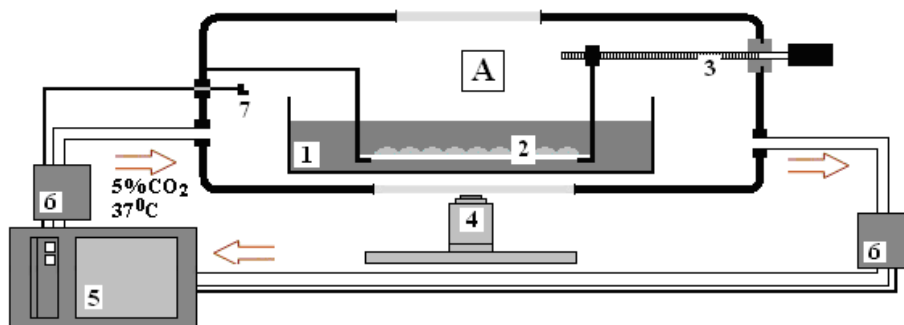
- Оценить морфологию фибробластов, подвергнутых механическому растяжению.
- Оценить параметры роста культуры фибробластов под действием растяжения и без него.
- Исследовать метаболическую активность фибробластов в культуре при их механической деформации. Оценить динамику изменения концентрации внутриклеточного актина, коллагена и гликозаминогликанов, а также коллаген- и гиалуронатлитической активности.

Объект и методы исследования

В работе использовались фибробласты легкого крыс 2-недельного возраста. Получение первичной культуры и субкультивирование проводили согласно (Rittié, Fisher, 2005). Нарботанные клетки на 2-м пассаже замораживали в растворе, содержащем 70% DMEM, 20% FBS и 10% DMSO (Freshney, 2010). При необходимости клетки размораживали (Phelan, 1998) и высевали на эластичную подложку. После распластывания клеток на подложке ее подвергали механическому растяжению моноосиального характера. Подложка (20×15×0,02 мм) представляла собой эластичную пленку из органосовместимого прозрачного латекса (Balabanian et al., 2006; Venkat et al., 2010) с адгезивным покрытием из коллагена и гиалуроната (Hwal Sun, Lee, 2002).

Растяжение подложки с клетками проводили на специально сконструированной установке, поддерживающей в автоматическом режиме параметры культивирования. Условия культивирования клеток на подложке аналогичны условиям субкультивирования (DMEM-10% FBS, 37°C, 95% влажности, 5% CO₂). Удлинение подложки составляло 0,1% ее длины.

Схема установки для деформации клеток



1. Культуральная чашка со средой в герметичной камере (А).
2. Эластичная подложка с клетками на направляющих (9).
3. Микровинт (шаг 1 мкм) с индикатором линейного перемещения (8).
4. Объектив инвертированного микроскопа.
5. CO₂-инкубатор.
6. Воздушные компрессоры.
7. Датчики-контроллеры температуры, влажности, уровня CO₂

Исследовали изменение в зависимости от времени культивирования на эластичной деформируемой подложке: параметров роста культуры, морфологии фибробластов в культуре, концентрации коллагена и гликозаминогликанов в культуре, коллаген- и гиалуронатлитической активности клеток.

Морфологию клеток оценивали фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопией с помощью eGFP-актинспецифичной трансфекции (eGFP-Effectene Transfection Reagent, QIAGEN, (США), эмиссия 495–509 нм, возбуждение 395 нм). По интенсивности флуоресценции eGFP-актина судили об уровне экспрессии F-актина в фибробластах (Ballestrem et al., 1998; Small et al., 1999).

Содержание коллагена в культуре оценивали по оксипролину (Утевская, Перский, 1982), гликозаминогликанов – по D-глюкуроновой кислоте после снятия клеток с подложки трипсинизацией (Freshney, 2010) и обработки подложки последовательно коллагеназой и гиалуронидазой (De Rosa et al., 2007).

О коллаген- и гиалуронатлитической активности клеток судили по выходу в среду продуктов распада предварительно окрашенных эозином и толуидиновым голубым соответственно коллагена и гиалуроната из адгезивного покрытия подложки (Hyllested et al., 2002).

Численные результаты измерений обрабатывали статистически (Атраментова, Утевська, 2007).

Результаты и обсуждение

Кривые роста культуры фибробластов легкого на недеформируемой подложке и при ее деформации (рис. 1) отображают стандартный характер роста клеток в культуре (Freshney, 2006) – фазу адгезии клеток (I), экспоненциальную фазу пролиферации клеток (II), стационарную фазу становления монослоя (III).

Распластывание клеток на недеформируемой подложке заканчивается на 12 час культивирования, после чего начинается активное деление клеток, заканчивающееся образованием монослоя с плотностью, в среднем, 92% на 52-й час культивирования.

Подложку деформировали, когда все посеянные клетки распластались на ней (16-й час культивирования), растягивая ее на 20 мкм. При этом часть клеток (2–5 %) округлялась и уходила в среду с подложки (16–20 час культивирования), что приводило к уменьшению количества распластавшихся клеток.

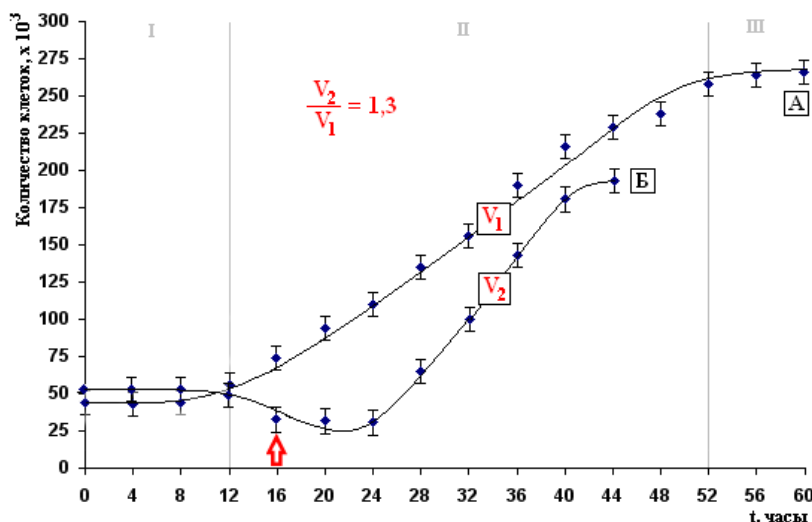


Рис. 1. Кривые роста культуры фибробластов легкого на недеформируемой подложке (А) и при ее деформации (Б). Стрелкой указан момент удлинения подложки

Механическое растяжение подложки приводило к увеличению срока начала экспоненциальной фазы клеточного роста. Активная пролиферация фибробластов, культивируемых на эластичной подложке, начиналась на 24-й час культивирования, в то время как активное деление клеток на недеформируемой подложке начиналось в среднем на 12-й час культивирования. По-видимому, это связано с возникновением каких-то процессов адаптации клеток к механической деформации, предшествующих началу митоза, и как следствие, сдвигающих его начало на поздние сроки.

Несмотря на качественное подобие кривых роста фибробластов на подложках в обоих случаях, количественные показатели, которые можно снять с этих кривых, существенно разнятся. Наиболее четко это видно по разнице крутизны экспоненциального участка роста культуры. В период 24–40 часа культивирования для недеформируемой подложки скорость деления клеток (V_1),

культивуруемых на ней, составила 7×10^3 клеток в час, в то время как для клеток, находящихся на деформируемой подложке, этот показатель составил 9×10^3 клеток в час (V_2).

Показано, что механическое растяжение фибробластов приводит к существенным изменениям их морфологии и пространственной ориентации. Перед посевом клеток на подложку была произведена процедура трансфекции фибробластов вектором eGFP-актина, в результате которой клетки начинали экспрессировать F-актин, обладающий способностью к флуоресценции в зеленом спектре. Причем, в отличие от других методов флуоресцентного окрашивания, требующих фиксации клеток, это метод прижизненного окрашивания, позволяющий в режиме real-time наблюдать за флуоресценцией отдельно взятых клеток длительное время, отслеживать изменение их морфологии.

На рис. 2 приведена покадровая развертка съемки группы фибробластов, культивируемых на эластичной подложке, до и после растяжения подложки.

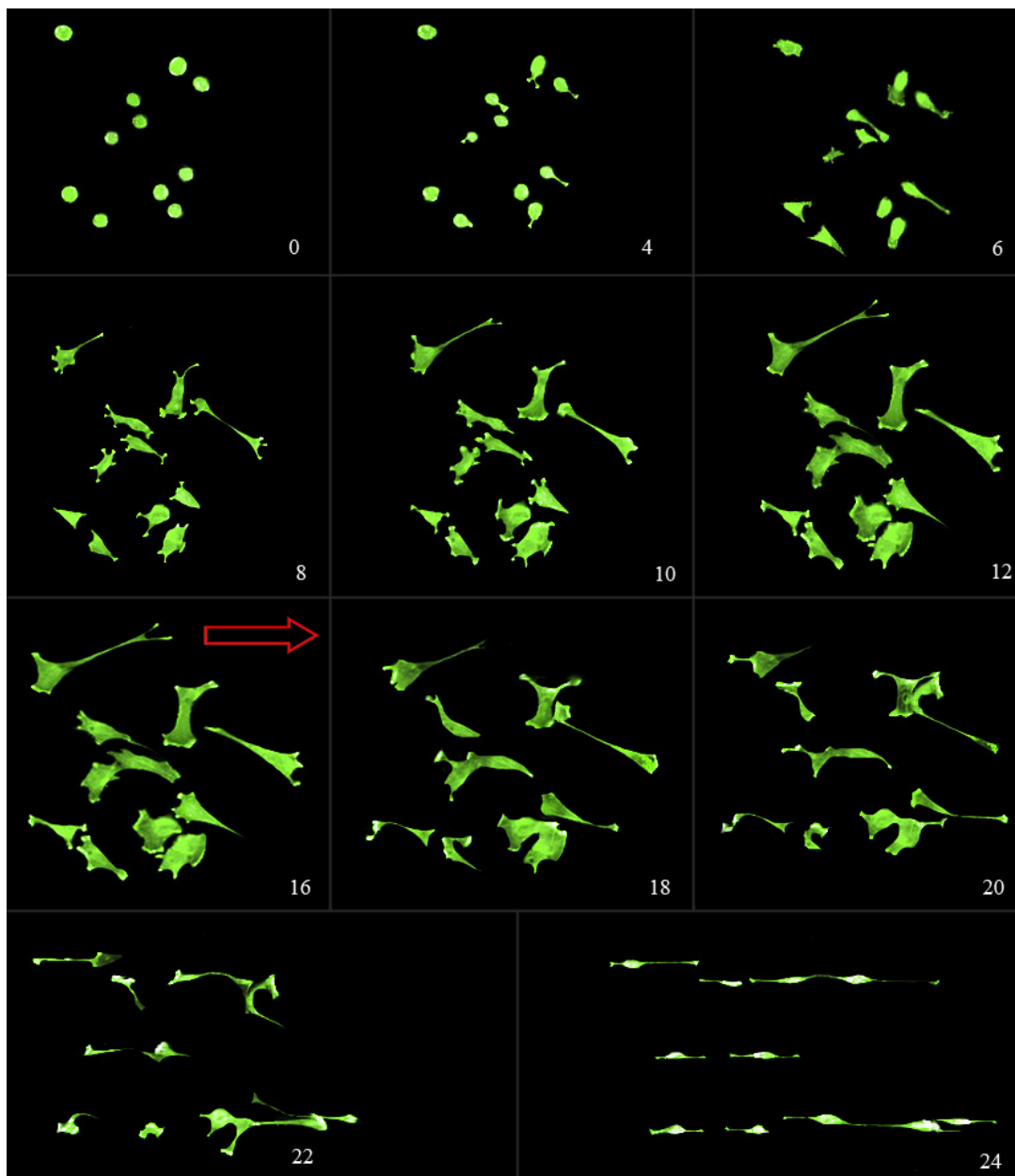


Рис. 2. Изменение морфологии и ориентации фибробластов легкого при деформации подложки. Цифрами указано время культивирования в часах. 0–16 час культивирования – распластывание клеток на подложке. Стрелкой отмечен момент начала растяжения подложки (16 час культивирования). Флуоресцентная микроскопия, eGFP-актин, $\times 400$

Видно, что клетки, культивируемые на недеформируемой подложке, характеризуются четырьмя наиболее характерными для фибробластов формами – треугольной, веретеновидной, трапецевидной и звездчатой. При этом наблюдается многовекторность их ориентации и миграции.

Растяжение подложки приводило к поляризации, одновекторной направленности клеток по направлению растяжения подложки. При этом происходило изменение их морфологии, клетки принимали исключительно веретеновидную форму.

На рис.3 показана общая картина монослоя фибробластов, культивируемых на недеформируемой и деформируемых подложках, на момент окончания экспоненциальной фазы роста культуры (52-й и 44-й час культивирования соответственно).

Проведенные измерения интенсивности флуоресценции GFP-актина в клетках показали резкое увеличение экспрессии F-актина деформируемыми фибробластами (рис. 4). По-видимому, происходит образование актиновых стрессовых фибрилл в ответ на механическое растяжение клеток, что не может не сказываться на синтетической активности клеток.

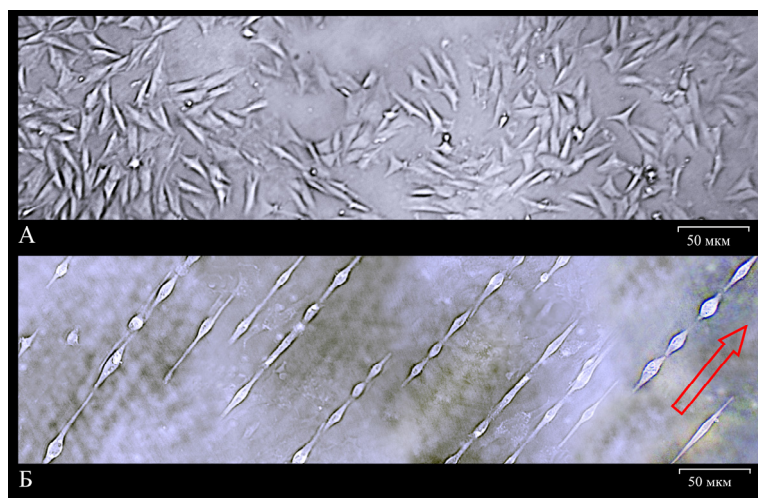


Рис. 3. Морфология и ориентация фибробластов легкого, культивируемых на эластичной подложке без ее механического растяжения (А) и на деформируемой подложке (Б) до образования монослоя (32 час культивирования). Стрелкой показано направление растяжения подложки. Фазово-контрастная микроскопия, $\times 200$

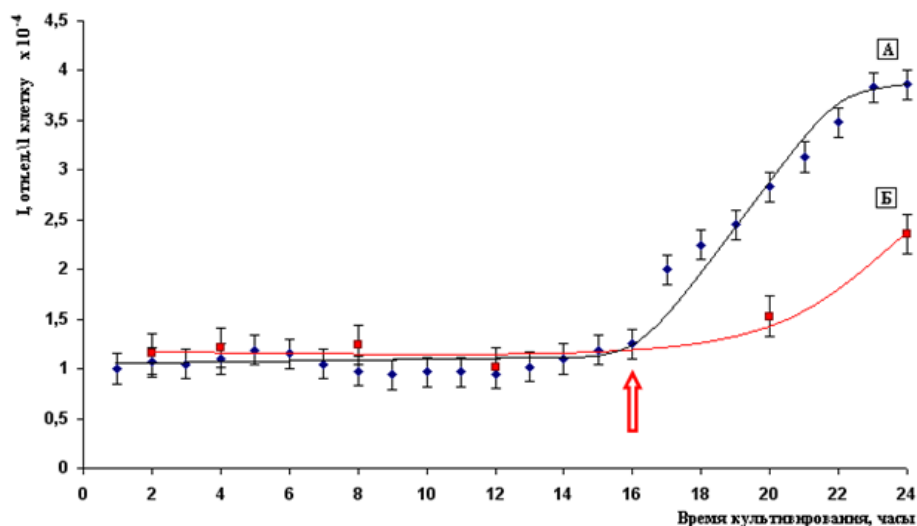


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции eGFP-актина, экспрессируемого фибробластами, культивируемых на недеформированной подложке (Б) и на подложке при ее растяжении (А). Стрелкой отмечен момент (16 часов культивирования) приложения механического напряжения к подложке

Показано, что содержание в монослое фибробластов коллагена, наработанного клетками на 44-й час культивирования на растягиваемой подложке, в 2,7 раза выше, чем содержание коллагена в монослое недеформированных фибробластов даже на 48-й час культивирования (табл. 1).

Таблица 1.

Содержание коллагена в культуре фибробластов легкого в процессе её роста на эластичной подложке при и в отсутствии ее механического растяжения

Без деформации подложки			При деформации подложки		
время культивирования, часы	количество клеток, $\times 10^3$	коллаген на 1 клетку, нг	время культивирования, часы	количество клеток, $\times 10^3$	коллаген на 1 клетку, нг
8	44,3 \pm 7,6*	0	8	52,0 \pm 8,2	0
24	110 \pm 8,4*	0	24	30,2 \pm 8,0*	0
48	238 \pm 7,7*	0,024 \pm 0,002*	44	189,0 \pm 7,9*	0,065 \pm 0,006***

Примечания: * – изменения достоверны ($p < 0,05$) относительно предыдущего часа культивирования; ** – изменения достоверны ($p < 0,05$) относительно отсутствия деформации.

Аналогичный результат был показан и для гликозаминогликанов (ГАГ) (табл. 2).

Таблица 2.

Содержание гликозаминогликанов в культуре фибробластов легкого в процессе её роста на эластичной подложке при и в отсутствии ее механического растяжения

Без деформации подложки			При деформации подложки		
время культивирования, часы	количество клеток, $\times 10^3$	ГАГ на 1 клетку, нг	время культивирования, часы	количество клеток, $\times 10^3$	ГАГ на 1 клетку, нг
8	45,0 \pm 6,7	0	8	50,5 \pm 4,5	0
24	102 \pm 9,0*	0	24	42 \pm 4,1*	0,14 \pm 0,01***
48	221 \pm 7,0*	0,052 \pm 0,005*	44	199 \pm 6,9*	0,097 \pm 0,007***

Примечания: * – изменения достоверны ($p < 0,05$) относительно предыдущего часа культивирования; ** – изменения достоверны ($p < 0,05$) относительно отсутствия деформации.

Содержание в монослое фибробластов гликозаминогликанов, наработанных клетками на 44-й час культивирования на растягиваемой подложке, оказалось в 1,8 раза выше, чем содержание ГАГ в монослое недеформированных фибробластов по сравнению с более поздним сроком культивирования – 48-м часом. Кроме того, показано, что наработка гликозаминогликанов деформируемыми клетками происходит на более ранних сроках (24 часа) культивирования, в то время как недеформируемые клетки продуцируют достаточное для аналитического определения в монослое количество ГАГ только на 48 час культивирования. Если учесть тот факт, что количество деформированных клеток на момент измерения содержания биополимеров в монослое (44–48 час) меньше (в 1,2 раза), чем недеформированных фибробластов, то, по-видимому, можно говорить о том, что механическое растяжение приводит к интенсификации выработки коллагена и гликозаминогликанов фибробластами.

Показано также, что растяжение подложки приводит к более интенсивному выходу в питательную среду продуктов распада предварительно окрашенных и связанных с подложкой коллагена и гиалуроновой кислоты (рис. 5).

Так, через 8 часов после растяжения подложки оптическая плотность среды над окрашенным эозином коллагеновым субстратом увеличилась в 3,1 раза, в то время как над недеформируемой

подложкой – в 1,7 раза. Аналогичный эффект наблюдался и для окрашенного толуидиновым синим гиалуронат-ассоциированного субстрата. Через 8 часов после растяжения подложки оптическая плотность среды увеличилась в 4,3 раза, а при отсутствии механического растяжения подложки величина оптической плотности практически не изменялась. Это может говорить о увеличении коллаген- и гиалуронатлитической активности фибробластов при их деформации.

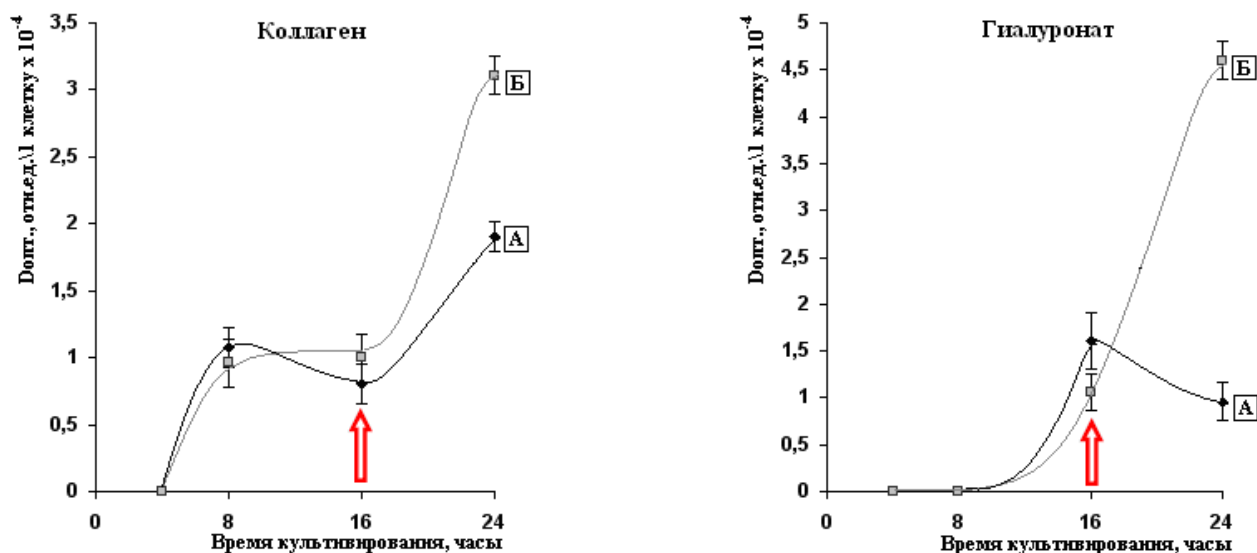


Рис. 5. Динамика выхода в среду окрашенных продуктов распада коллагена и гиалуроновой кислоты из подложки при культивировании на ней клеток при (Б) и в отсутствие (А) механической деформации. Стрелкой отмечен момент (16 часов культивирования) приложения механического напряжения к подложке

По-видимому, такое изменение метаболической активности фибробластов на действие механической нагрузки является результатом увеличения эффективности клеточного ответа на действие механического напряжения за счет «усиления» внутриклеточной цепи передачи сигнала о механическом напряжении образуемыми актиновыми стресс-фибриллами.

Список литературы

- Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ імені В.Н.Каразіна, 2007. – 288с. /Atramentova L.O., Utevska O.M. Statystychni metody v biologii: Pidruchnyk. – Kh.: KhNU imeni V.N.Karazina, 2007. – 288s./
- Кот Ю.Г. Структурно-метаболична відповідь сполучної тканини на дію розтягуючого механічного напруження. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2008. – 20с. /Kot Yu.G. Strukturno-metabolichna vidpovid' spoluchnoi tkanyny na diyu roztyaguuyuchogo mekhanichnogo napruzheniya. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – Kharkiv, 2008. – 20s./
- Утевская Л.А., Перский Е.Э. Простой метод определения суммарного и свободного оксипролина // Вестн. Харьк. ун-та. – 1982. – №226. – С. 18–20. /Utevskaia L.A., Perskiy Ye.E. Prostoy metod opredeleniya summarnogo i svobodnogo oksiprolina // Vestn. Khar'k. un-ta. – 1982. – №226. – S. 18–20./
- Balabanian A.C., Carvalho T.L., Lacerda S.A. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats // Journal of Oral Science. – 2006. – Vol.48, №4. – P. 201–205.
- Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Imhof B. Actin dynamics in living mammalian cells // Journal of Cell Science. – 1998. – №111. – P. 1649–1658.
- De Rosa C.S., Rotta J., Barreto P.L., Beirao L.H. Extraction, quantification, and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest // Alim. Nutr. – 2007. – Vol.18, №3. – P. 237–240.
- Freshney R.I. Basic principles of cell culture. – John Wiley & Sons Inc, 2006. – P.13.
- Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. – Wiley-Blackwell Inc., 2010. – P.163.
- Hwal S., Lee J. Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix // Yonsei Medical Journal. – 2002. – Vol.43, №2. – P. 193–202.

Hyllested J.L., Veje K., Ostergaard K. Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage – a review // Journal of Osteoarthritis Research Society International. – 2002. – Vol.10. – P. 333–343.

Kleinmana H.K., Philpa D., Hoffmana M.P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis // Current Opinion in Biotechnology. – 2008. – Vol.14, Issue 5. – P. 526–532.

Phelan M.C. Basic techniques for mammalian cell tissue culture. Current protocols in cell biology. – John Wiley & Sons Inc., 1998. – P. 82–83.

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

Rozario T., DeSimone D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // Dev. Biol. – 2010. – Vol.341 (1). – P. 126–140.

Small J., Rottner K., Hahne P., Anderson K. Visualizing the actin cytoskeleton // Microscopy research and technique. – 1999. – №47. – P. 3–17.

Venkat K.V., Lin W., Sitaraman K. Polymer thin films for biomedical application // Nanomaterials for the Life Sciences. – 2010. – Vol.5. – P. 122–134.

Представлено: Є.Р.Грабовецька / Presented by: Ye.R.Grabovetskaya

Рецензент: Т.В.Бараннік / Reviewer: T.V.Barannik

Подано до редакції / Received: 17.05.2011