

УДК: 576.3;57.085.23

Влияние деформации фибробластов в культуре на молекулярную массу синтезируемой ими гиалуроновой кислоты

Ю.Г.Кот

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

На модели моноаксиальной механической деформации фибробластов легкого, культивируемых на эластичной подложке, при помощи гель-хроматографии изучен спектр молекулярной массы синтезируемого клетками гиалуроната. Показано, что растяжение фибробластов приводит к снижению средней молекулярной массы гиалуронової кислоти, синтезированной деформируемыми фибробластами.

Ключевые слова: деформация фибробластов, гиалуроновая кислота, гель-хроматография.

Вплив деформації фібробластів у культурі на молекулярну масу гіалуронової кислоти, що синтезується ними

Ю.Г.Кот

На моделі моноаксіальної механічної деформації фібробластів легень у культурі методом гель-хроматографії досліджено спектр молекулярної маси гіалуронату, що синтезується клітинами. Показано, що деформація фібробластів призводить до зниження середньої молекулярної маси гіалуронату, що синтезується деформованими клітинами.

Ключові слова: деформація фібробластів, гіалуронова кислота, гель-хроматографія.

The effect of fibroblasts deformation in culture on a molecular mass of synthesized hyaluronic acid

Yu.G.Kot

The spectrum of hyaluronate molecular weight has been studied by gel chromatography on the model of monoaxial mechanical deformation of lung fibroblasts cultured on flexible substrate. It has been shown that fibroblasts stretching leads to a decrease of average molecular weight of hyaluronic acid synthesized by deformable fibroblasts.

Key words: fibroblasts deformation, hyaluronic acid, gel chromatography.

Введение

При культивировании на подложке фибробласты синтезируют структурные биополимеры и другие молекулы соединительной ткани и образуют из них слой, представляющий собой матрикс, несколько упрощенный из-за отсутствия других клеток. В этом слое, как и в нативных тканях, происходит обмен. Часть синтезированных молекул коллагена и гликозаминогликанов, вышедших в него, разрушаются под действием специфичных ферментов распада, которые синтезируются самими фибробластами, и продукты распада выходят в культуральную среду. Деформация фибробластов приводит к значительным изменениям обмена биополимеров, в том числе и гиалуроната (Фальченко, 2011), и, как следствие, к изменениям строения этого слоя. Учитывая важную адгезивную и сигнальную роль гиалуронової кислоти в контактах клетка-клетка и клетка-матрикс, представляет интерес выяснить, изменяется ли при этом молекулярная масса гиалуроната в синтезируемом в культуре клетками матриксе.

Материалы и методы исследования

В работе применена модель моноаксиальной деформации, при которой статическое механическое растяжение эластичной подложки передается культивируемым на ней клеткам (Кот, 2013). Используемые в работе фибробласты легкого крыс 2-недельного возраста (2-й пассаж культуры) были получены стандартными методами (Rittié, Fisher, 2005; Freshney, 2010).

Для выделения гликозаминогликанов, синтезированных монослоем фибробластов, подложку обрабатывали смесью гиалуронидазы и хондроитиназы АБС, как описано в (De Rosa et al., 2007). Фракционирование гликозаминогликанов проводили методом ионообменной хроматографии на Dowex 1×2 согласно (Меркурьева, 1974). В каждом из снимаемых с колонки элюатов определяли концентрацию ГАГ с помощью карбазоловой и орциновой реакции колориметрически (Wei-Chih Huang, 2007; Malmström et al., 2012) на микропланшетном ридере Bio-Tek FL600. С использованием стандартов на гиалуроновую кислоту и хондроитинсульфаты строили калибровочный профиль фракционирования. Аликвоты, соответствующие пику выхода гиалуроновой кислоты с колонки, объединяли. Анализ спектра молекулярных масс гиалуроната проводили методом гель-хроматографии после фракционирования ГАГ ионообменной хроматографией, как описано выше. Гиалуроновую кислоту осаждали 100% этанолом из соответствующих аликвот, осадок отделяли и высушивали при комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл 10% водного раствора ацетата натрия и разделяли методом гель-хроматографии на Сефадекс G200 (Nakano et al., 1982). Элюирующий раствор – 10% водный раствор ацетата натрия, объем аликвоты элюата – 1 мл, размеры колонки 0,5×50 см (Kalbhen, 1967; Vocaturo et al., 1978). Для построения калибровочного профиля проводили гель-хроматографию декстранов с известной молекулярной массой: Dextran Blue (Mw 2000 кД), Dextran T500 (Mw 450 кД), Dextran 150 (Mw 150 кД), Dextran 80 (Mw 75 кД), Dextran T40 (Mw 37 кД), Dextran 5 (Mw 5 кД), Dextran 1 (Mw 1 кД). О выходе гиалуроната с колонки в аликвотах опытной и калибровочной разгонки судили по содержанию D-глюкуроновой кислоты (Wei-Chih Huang, 2007). Сопоставляя профиль разделения опытной пробы с калибровочным профилем, проводили анализ спектра молекулярной массы гиалуроната, синтезируемого фибробластами, раскладывая профили элюции на составляющие пики с помощью пакета программ TotalLab 2.01. Численные результаты измерений обрабатывали статистически (Атраментова, Утевська, 2007).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показан результат гель-хроматографического разделения по молекулярной массе гиалуроновой кислоты, синтезированной фибробластами при их культивировании на недеформируемой и деформируемой подложке. А в табл.1 приведены численные значения распределения молекулярных масс, полученные из соотношения площадей соответствующих пиков.

В соответствии с полученными данными средняя молекулярная масса гиалуроновой кислоты, синтезированной деформируемыми фибробластами, снижается за счёт уменьшения на 17% доли высокомолекулярного (2000–450 кД) гиалуроната и увеличения на 11% и 6% соответственно доли средне- (450–75 кД) и низкомолекулярной (75–1 кД) фракций.

Следует отметить, что биологические эффекты гиалуроната заметно варьируют в зависимости от его молекулярной массы. Так, высокомолекулярные полисахариды, как молекулы пространственного наполнения и гидратации тканей, являются ангиогенными, противовоспалительными и иммуносупрессивными (Hwal, Lee, 2002). Присутствие в культуральной среде гиалуроновой кислоты также оказывает модулирующее действие на метаболизм клеток. Фрагменты гиалуроната с молекулярной массой 20 кДа стимулируют синтез воспалительных цитокинов. Меньшие фрагменты (6–20 кДа) гиалуроновой кислоты оказываются ангиогенными и провоспалительными. Фрагменты с молекулярной массой 200 кДа улучшают *in vitro* выживание эозинофилов периферической крови, а гиалуроновая кислота с молекулярной массой от 3000 до 6000 кДа имеет существенно меньший эффект (Stern, 2004). Фрагменты гиалуроната могут обладать биологической активностью, отличной от полимерной формы. Низко-, но не высокомолекулярный гиалуронат стимулирует продукцию металлоэстеразы в клетках МН-S и экспрессию индуцибельной NO-синтазы в эндотелиальных и купферовских клетках печени крыс (Yanagishita, 1993). Известно, что, независимо от молекулярного веса, при добавлении экзогенной гиалуроновой кислоты (от 0,1 до 1 мг/мл) в культуральную среду фибробластов происходит постоянное снижение экспрессии CD44 на поверхности фибробластов. При этом существуют отдельные работы, в которых показано образование стрессовых волокон в ответ на внесение в культуральную среду гиалуроната (Choquet, 1997).

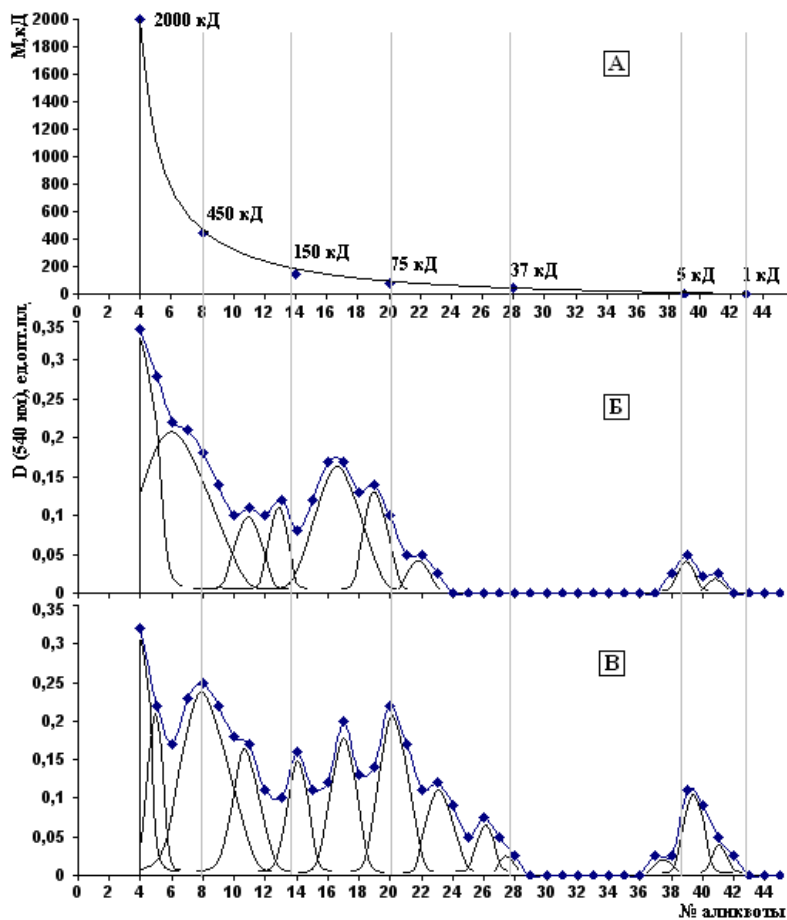


Рис. 1. Калибровочный профиль хроматографического разделения декстранов с известной молекулярной массой (А) и профили элюции гиалуронової кислоти, выделенной из культуры недеформируемых (Б) и деформируемых (В) фибробластов на 60 час культивирования. Гель-хроматография на Сефадекс G200

Таблица 1.
 Относительное содержание гиалуроната с различной молекулярной массой, %

Пределы молекулярной массы, кД	Условия культивирования	
	без деформации	деформация
2000–450	40	23
450–75	47	58
75–5	11	12
5–1	2	7

Обнаруженный эффект снижения молекулярной массы гиалуронової кислоти, синтезируемой фибробластами при их деформации, может быть следствием показанного нами в предыдущей работе (Фальченко, 2011) увеличения гиалуронатлитической активности деформируемых фибробластов.

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 Е.В. Воздействие механического напряжения на метаболизм структурных компонентов соединительной ткани в культуре фибробластов крыс. Дисс. ... канд. биол. наук. – Х., 2013. – С. 40–45. /Kot Ye.V. Vozdeystviye mekhanicheskogo napryazheniya na metabolizm strukturnykh komponentov soyedinitel'noy tkani v kul'ture fibroblastov krys. Diss. ... kand. biol. nauk. – Kh., 2013. – S. 40–45./
- Меркурьева Р.В. Сравнительная оценка методов определения гликозаминогликанов мочи // Лабораторное дело. – 1974. – Т.3. – С. 162–167. /Merkur'yeva R.V. Sravnitel'naya otsenka metodov opredeleniya glikozaminoglikanov mochi // Laboratornoye delo. – 1974. – T.3. – S. 162–167./
- Фальченко Е.В. Влияние механического растяжения фибробластов на содержание структурных биополимеров в культуре // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2011. – Вип.13, №947. – С. 29–35. /Fal'chenko Ye.V. Vliyaniye mekhanicheskogo rastyazheniya fibroblastov na sodержaniye strukturnykh biopolimerov v kul'ture // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2011. – Vyp.13, №947. – S. 29–35./
- Choquet D. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages // Cell. – 1997. – Vol.88. – P. 39–48.
- 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. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized. – 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.
- Kalbhen D.A. The use of gel filtration on sephadex G-200 for investigations of the mucopolysaccharide metabolism in fibroblast cell cultures // Medicina et Pharmacologia Experimentalis. – 1967. – Vol.16. – P. 97–104.
- Malmström A., Bartolini B., Thelin M.A. et al. Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function // J. Histochem. Cytochem. – 2012. – Vol.60. – P. 916–925.
- Nakano T., Thompson J.R., Aherne F.X. Molecular size of chondroitin sulfate from normal and osteochondrotic joint cartilage of adolescent boars // Can. J. Comp. Med. – 1982. – Vol.46 (4). – P. 395–399.
- Rittié L., Fisher G.J. Isolation and culture of skin fibroblasts // Methods in Molecular Medicine. – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.
- Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway // Eur. J. Cell Biol. – 2004. – Vol.83 (7). – P. 317–25.
- Vocaturu A., Rodén L., Bellocchi M. Role of hyaluronic acid in the in vivo aggregation of cartilage proteoglycans // Connective Tissue Research. – 1978. – Vol.5. – P. 237–248.
- Wei-Chih Huang Modeling the microbial production of hyaluronic acid // Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers. – 2007. – Vol.38 (3–4). – P. 355–359.
- Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix // Acta Pathol. Jpn. – 1993. – Vol.43. – P. 283–293.

Представлено: О.П.Белозоров / Presented by: O.P.Belozorov
Рецензент: Н.И.Буланкина / Reviewer: N.I.Bulankina
Подано до редакції / Received: 14.11.2012