

Влияние поперечно сшитых продуктов гиалуроновой кислоты на пролиферацию фибробластов кожи человека в культуре.

Е. В. Ивановская^{1,2#}, А. Е. Болдова^{1,3}, А. Н. Сидорина⁴, Ю. А. Ивановская⁴, З. И. Газитаева⁴, А. Н. Свешникова^{1,3}.

1. ФГБУН центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия, 109029
2. Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Миусская площадь, 9, Москва, Россия, 125047
3. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, Россия, 117997
4. ООО «Медицинские биоинженерные системы», Ленинградский проспект, 80, Москва, Россия, 125315

Автор для переписки: kivanovskaia27@gmail.com

Получено: 12.05.2023

Принято к публикации: 28.06.2023

Опубликовано: 30.12.2023

EDN: TQCYEA

Аннотация

В настоящее время в эстетической медицине широко используются препараты на основе гиалуроновой кислоты (ГК). Это связано с уникальной особенностью ГК поддерживать структуру межклеточного матрикса и влиять на функционирование стромальных клеток, которые захватывают ГК специфическими рецепторами, в первую очередь CD44, и далее в лизосомах она подвергается разложению гиалуронидазами. Для задержки ГК в матриксе и создания эффектов лифтинга и филлинга в эстетической медицине используют ГК с поперечными связями (кросс-сшиты). Несмотря на то, что основные механизмы синтеза и биodeградации ГК в организме известны, до сих пор остается неисследованным, как продукты на основе ГК с поперечными сшивками деградируют, захватываются клетками и влияют на их пролиферацию и жизнеспособность.

В настоящей работе мы исследовали влияние продукта на основе ГК, сшитой дивинилсульфоном, на пролиферацию фибробластов кожи человека. Первичные фибробласты (3-6 пассаж) культивировали согласно стандартным протоколам в присутствии поперечно-сшитого продукта ГК в объемном соотношении 1:5 в среде ДМЕМ с 10% фетальной бычьей сывороткой. Оценка состояния клеток проводилась с помощью световой и флуоресцентной конфокальной микроскопии.

В результате проведенных исследований, были получены данные о влиянии продуктов на пролиферацию фибробластов, их морфологию, а также продемонстрировано накопление молекул ГК клетками. Захват молекул ГК фибробластами был продемонстрирован методом конфокальной микроскопии с окраской на миозин и ГК. Методом световой микроскопии мы выяснили,

что в присутствии ГК наблюдается ускоренная пролиферация фибробластов. Морфология фибробластов в присутствии ГК изменялась в сторону увеличения их адгезии к субстрату.

Таким образом, поперечно-сшитые продукты на основе ГК активно захватываются фибробластами кожи человека в культуре, предположительно эндоцитозом, что обеспечивает влияние данных продуктов на ускорение пролиферации фибробластов и их морфологию.

Ключевые слова: Гиалуроновая кислота, Дивинилсульфон, Фибробласты

Введение

В современном мире одним из наиболее широко используемых полимеров медико-биологического назначения является гиалуроновая кислота (гиалуронан - ГК). Полимер представляет собой несulfатированный линейный гликозаминогликан с отрицательным зарядом, содержащий повторяющиеся единицы дисахарида β -1,4-D-глюкуроновая кислота- β 1,3-D-N-ацетилглюкозамин- β -1,4[1]. Популярность данного соединения связана с его безопасностью, биосовместимостью и уникальной способностью поддерживать структуру межклеточного матрикса и влиять на функционирование стромальных клеток.

В организме гиалуронан играет важную роль, поскольку принимает активное участие в таких процессах, как адгезия, регенерация, пролиферация, миграция клеток и воспаление [2,3]. ГК в избытке содержится во внеклеточном матриксе клеток, с наибольшим распределением вокруг клеток кожи, в соединительной ткани, суставной ткани и стекловидном теле. На клеточном уровне ГК активно взаимодействует

с различными специфичными рецепторами, запуская сигнальные пути [4]. Одним из важнейших мембранных рецепторов ГК является интегральный гликопептид CD44, который повсеместно экспрессируется и участвует в связывании свободных молекул внеклеточной ГК [5]. ГК может связываться с данным рецептором в двух основных формах: высоко- и низкомолекулярной. Взаимодействие с высокомолекулярной ГК способствует образованию гликокаликса, защищающего клетку от цитотоксических факторов [6]. При этом высокомолекулярная ГК не проникает непосредственно в клетку. Противоположная картина наблюдается при взаимодействии низкомолекулярной ГК и CD44. ГК в данной форме при взаимодействии с CD44 способна проникать внутрь клетки [8].

В межклеточном матриксе гиалуроновая кислота постоянно обновляется благодаря непрерывным процессам синтеза и деградации. В основном гликозаминогликаны, строительные блоки ГК, синтезируются в аппарате Гольджи, а конечный продукт в виде гиалуронана производится на поверхности клеточной мембраны гиалуронансинтазами [2]. Гиалуронансинтазы – это белки, интегрированные в плазматическую мембрану фибробластов, макрофагов соединительной ткани, эндотелиоцитов и кератиноцитов эпидермиса. Таким образом происходит синтез ГК и насыщение ей внеклеточного матрикса.

Помимо механизмов синтеза ГК, известны и механизмы её деградации. В этом процессе важную роль играют ферменты семейства эндогликозидаз, состоящих из гомологичных белков, называемых гиалуронидазами (HYAL). Этот тип ферментов специфически гидролизуют связь β -1,4 преимущественно в молекулах ГК. На сегодняшний день известны механизмы биodeградации ГК, катализируемые только двумя типами ферментов: HYAL1 и HYAL2. HYAL2 инициирует деградацию цепи низкомолекулярной ГК на фрагменты до 20 кДа (примерно 50–60 дисахаридных единиц) во внеклеточном матриксе. Данный фермент присутствует и на клеточной мембране, взаимодействуя с рецептором CD44, HYAL2 инициирует захват молекул ГК, формируя эндосомы, которые затем транспортируются в лизосомы [7]. В лизосомах содержится фермент HYAL1 и уже под его действием молекулы ГК разлагаются до тетрасахаридов массой 800 Да, которые являются преобладающим конечным продуктом деградации [4]. Затем данные продукты используются для построения новых молекул ГК.

Несмотря на то, что в межклеточном матриксе происходит непрерывный синтез ГК, с возрастом количество данного соединения уменьшается,

что приводит к появлению различных признаков старения. Поэтому ГК нашла широкое применение в эстетической и хирургической медицине. Однако, гель на основе чистой ГК не обладает достаточной вязкостью и после введения в организм биодеградирует в течение нескольких суток, не обеспечивая необходимые лифтинг- и филлинг-эффекты [9,10].

Для обеспечения данных эффектов и пролонгированного срока нахождения препаратов в организме в косметологии активно разрабатываются модифицированные вещества на основе ГК [11]. Наиболее распространенной модификацией является поперечное сшивание отдельных молекул ГК с образованием гидрогеля [12]. В настоящее время одним из самых применяемых сшивающих агентов является дивинилсульфон (ДВС). В чистом виде ДВС является токсичным веществом, однако после реакции сшивания с ГК он становится безопасным.

Несмотря на популярность и активное применение препаратов на основе поперечно-сшитой ГК, в эстетической медицине на сегодняшний день существует очень мало данных о том, как подобные молекулы поперечно-сшитой ГК воздействуют непосредственно на клетки кожи человека. В настоящей работе мы исследовали действие одного из таких гелей на основе высокомолекулярной ГК, сшитой ДВС, на пролиферацию и морфологию фибробластов кожи человека.

Материалы и Методы

Культивирование фибробластов кожи человека

Первичную культуру фибробластов кожи человека (ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 2-3 пассаж) культивировали в культуральных флаконах 25 см² (SPL Lifesciences, Южная Корея) в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Servicebio, Китай), содержащей 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки – ФБС (Hi-media, Индия), 1 % L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептавидина (Termo FS, США). При достижении 80% монослоя клетки пассировали с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и 0,05% трипсина (ПанЭко, Россия). Доля живых клеток оценивали с помощью камеры Горяева.

Исследование захвата гиалуроновой кислоты из поперечно-сшитого геля фибробластами

Исследуемым образцом являлся гель на основе высокомолекулярной ГК, сшитый ДВС (степень поперечного сшивания 27,4%). Для исследования проникновения образца ГК внутрь фибробластов были получены снимки методом

конфокальной микроскопии. При достижении конфлюента 80%, полную культуральную среду заменяли средой, содержащей 20% (v/v) исследуемого образца на основе ГК. Инкубация проводилась в течение 3 часов при температуре 37°C. При дальнейших манипуляциях между стадиями клетки промывались раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, Thermo FS, США) 3 раза по 5 мин. Фиксация проводилась согласно протоколу [13]. Вкратце, для фиксации использовался раствор параформальдегида (ПФА) в этаноле и безводной уксусной кислоте, для визуализации ГК клетки инкубировали с конъюгированным с биотином гиалурон-связывающим белком (hyaluronic acid binding protein – HABP, Sigma-Aldrich, США) и антителами к немышечному миозину II типа (NMII, Sigma-Aldrich, США) в течение 90 мин при 25°C. Далее проводили инкубацию с вторичными антителами (anti-IGG (rabbit)-Alexa-567), стрептавидином-FITC (Имтек, Россия) и красителем Hoechst – 33342 (Invitrogen, США) в течение 60 мин при 25°C. Последовательная съемка срезов проводилась с шагом по оси z порядка 0.5 мкм. Для определения средней фоновой интенсивности флуоресценции на каждом срезе выбиралось произвольное поле без клеток. Далее рассчитывалась средняя интенсивность флуоресценции области клетки произвольной формы, содержащая не менее половины цитозольного пространства, но не включающая ядро. Из значений для средней флуоресценции клетки на срезе вычитали средняя флуоресценция фона, после чего полученные данные усредняли по количеству срезов.

Влияние поперечно-сшитого геля на основе гиалуроновой кислоты на пролиферацию фибробластов

Исследуемым образцом являлся гель на основе высокомолекулярной ГК, сшитый ДВС (степень поперечного сшивания 27,4%). Для наблюдения влияния геля на деление одиночных клеток, фибробласты локализовались на покровном стекле при помощи капли поли-L-лизина (Sigma-Aldrich, США). Съемка клеток проводилась с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия) через 8 часов после посадки клетки и длилась в течение 12 часов. В течение эксперимента клетки поддерживались при температуре 37°C и содержании CO₂ 5%. Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения ImageJ. Подсчет клеток проводили вручную по фотографии фибробластов в проходящем свете.

Результаты

Захват гиалуроновой кислоты из поперечно-сшитых гелей фибробластами кожи человека

В настоящее время известно, что чистая гиалуроновая кислота, во внеклеточном матриксе непрерывно подвергается процессам синтеза и деградации. В рамках данной работы мы хотели выяснить, проникают ли молекулы ГК из гидрогелей с поперечными сшивками в клетки кожи человека. Для данного эксперимента на покровных стеклах были выращены фибробласты кожи человека (4 пассаж). Клетки выращивали по стандартному протоколу в питательной среде, содержащей 10% FBS. После достижения клетками конфлюентности 70%, часть покровных стекол с клетками использовали в качестве контроля и не подвергали дальнейшим воздействиям, а часть была проинкубирована в течение 3 часов с добавлением в среду 20% гидрогеля на основе ГК, сшитой ДВС. Затем клетки были фиксированы и окрашены биотином гиалурон-связывающим белком, антителами к немышечному миозину II типа. Далее проводили инкубацию со вторичными антителами (anti-IGG (rabbit)-Alexa-567), стрептавидином-FITC и красителем Hoechst. На снимках, полученных методом флуоресцентной конфокальной микроскопии, было обнаружено, что в цитозоле клеток, предварительно проинкубированных в течение 3 часов с исследуемым образцом, присутствуют включения ГК размером 1-6 мкм (рис. 1). Оценка производилась путем измерения уровня флуоресценции HABP. При анализе контрольной группы распределение интенсивности флуоресценции в клетках было однородным. Средний уровень флуоресценции HABP на клетку для контрольной группы был статистически значимо ниже, чем для клеток, проинкубированных с исследуемым образцом ГК (рис. 2).

Влияние геля на основе гиалуроновой кислоты на пролиферацию фибробластов

После подтверждения захвата молекул гиалуроновой кислоты из поперечно-сшитого геля фибробластами кожи человека было исследовано влияние геля на пролиферацию и морфологию клеток. Для этого иммобилизованные одиночные клетки инкубировали в течение 20 часов в присутствии 20% (v/v) исследуемого вещества в полной среде. В качестве контроля к клеткам добавляли полную среду с добавлением HBSS (20% v/v). Методом световой микроскопии были получены снимки фибробластов кожи человека через 8, 13, 16 и 19 часов инкубации. В каждый промежуток времени был произведен подсчет клеток и построен график скорости пролиферации фибробластов в контрольных образцах и с добавлением продуктов на основе ГК (рис. 3А). Было обнаружено, что статистически значимые различия в количестве клеток наблюдаются уже через 13 часов после инкубации с исследуемым

образцом ГК по сравнению с контрольными образцами. За 19 часов среднее количество клеток, подверженных действию геля на основе ГК, увеличилось более чем в 2 раза, в то время как число клеток в контрольном образце значимо не изменилось. Также методом световой микроскопии оценивали влияние гиалуроновой кислоты, сшитой ДВС, на морфологию фибробластов кожи

человека (рис. 3Б). Через 19 часов мы видим значительные изменения между морфологией контрольных образцов и инкубированных с 20% гелем на основе ГК. Фибробласты во второй группе выглядят более распластанными и практически образуют монослой, в отличие от клеток в контроле.

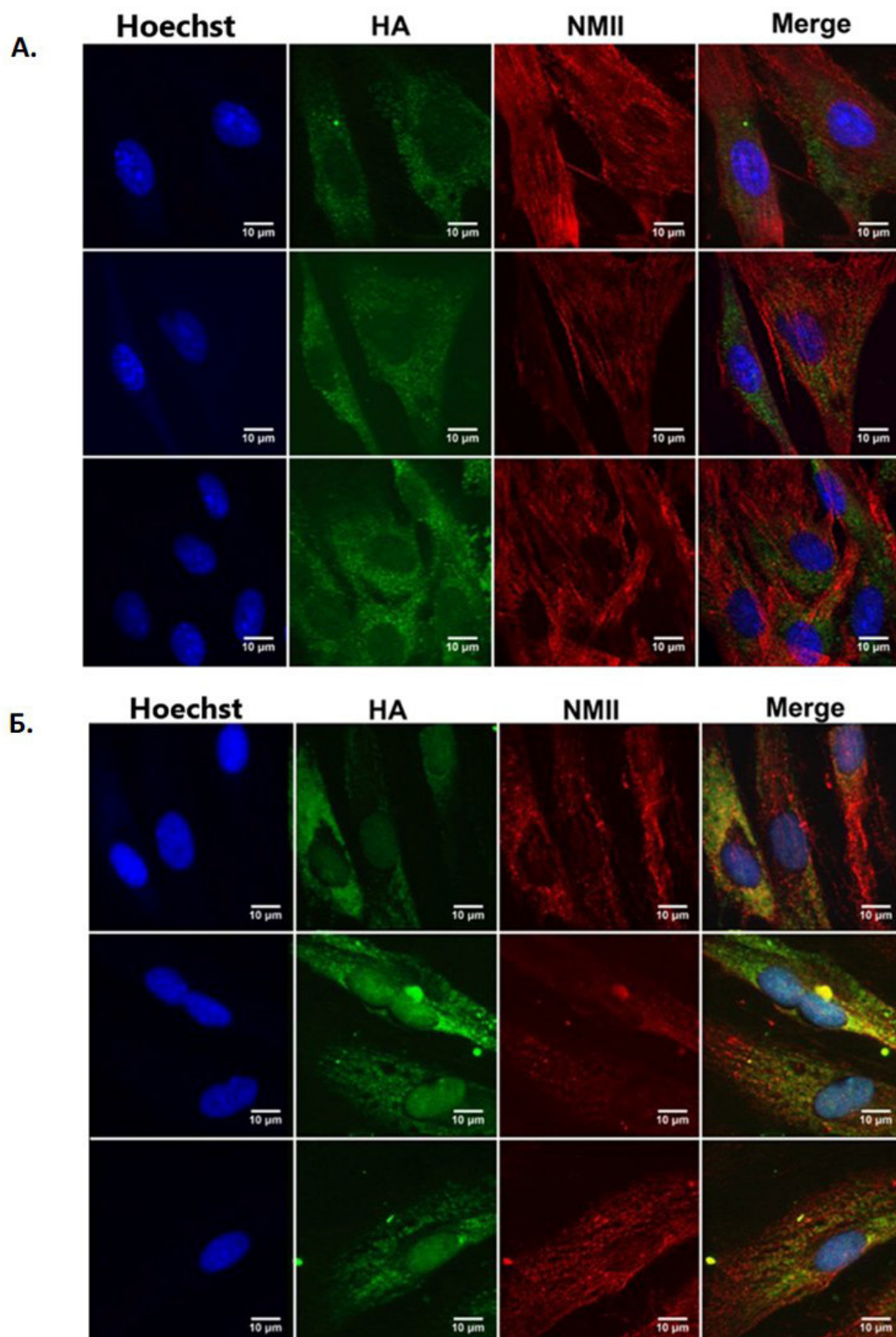


Рисунок 1. Конфокальная микроскопия. Синим Hoechst окрашено ядро, зеленым HA-гиалуроновая кислота, красным NM-миозин, Merge- объединенное. А. Контрольная группа фибробластов. Б. Группа фибробластов, с инкубацией в среде, содержащей 20% (v/v) исследуемого образца ГК (разные поля зрения одного образца).

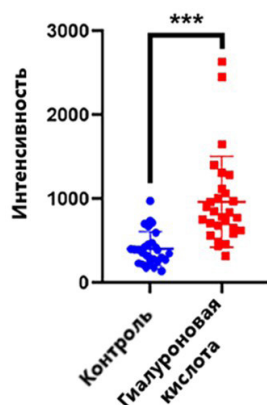
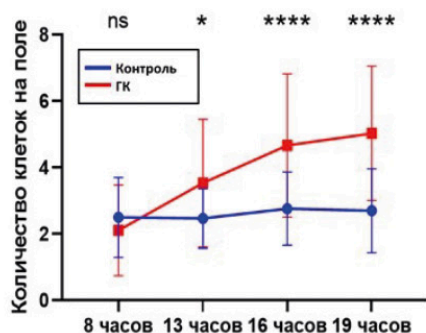


Рисунок 2. Численный анализ флуоресценции гиалурон-связывающего белка в клетках неинкубированных (синий) и проинкубированных (красный) с высокомолекулярной ГК, сшитой ДВС. Статистическая значимость различий оценивалась по критерию Манна-Уитни (***) соответствуют p -value < 0.001).

А.



Б.

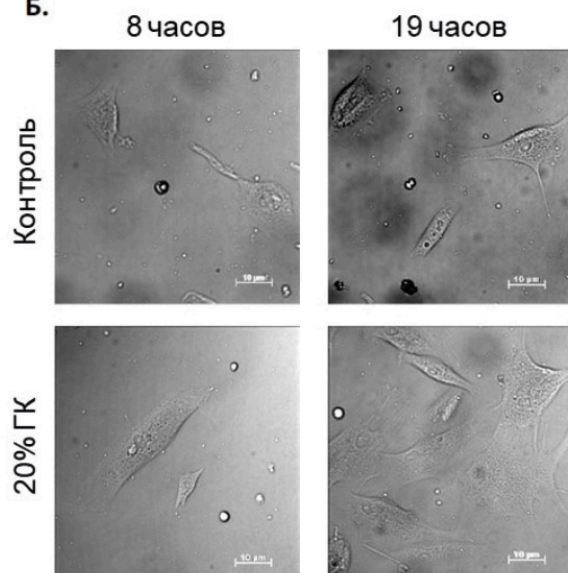


Рисунок 3. Наблюдение пролиферации фибробластов человека в присутствии ГК. (А) График зависимости среднего количества фибробластов от времени. Синим обозначен контрольный образец, красным – образец, инкубируемый в присутствии исследуемого геля ГК. Сколько полей зрения было проанализировано для каждого времени инкубации? Статистическая значимость различий оценивалась по критерию Манна-Уитни при $n = 10$ (* соответствуют p -value < 0.05 , *** соответствуют p -value < 0.001). (Б) Приведены типичные фотографии

фибробластов кожи человека: контрольный образец через 8 часов и 19 часов после начала инкубации. И образец, инкубируемый с 20% высокомолекулярной ГК, сшитой ДВС, через 8 часов и 19 часов после начала инкубации.

Закключение

В настоящее время в эстетической медицине активно применяются продукты на основе ГК для предотвращения возникающих признаков старения и устранения эстетических дефектов. Несмотря на это, в отличие от чистой ГК, влияние поперечно-сшитых продуктов на её основе на клетки остается неисследованным [14, 15]. В работе были проведены исследования, направленные на изучение влияния гидрогеля на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, сшитой ДВС, на проникновение молекул ГК внутрь фибробластов, их пролиферацию и морфологию.

Сначала методом флуоресцентной микроскопии было продемонстрировано, что ГК из поперечно-сшитых продуктов действительно захватывается фибробластами кожи человека. На снимках были зафиксированы отдельные гранулы размером 1-6 мкм, которые окрашивались с помощью специфического гиалурон-связывающим белком и предположительно соответствуют областям локализации, проникнувшей в клетки сшитой ГК. Предположительно, процесс захвата ГК осуществляется путем эндоцитоза или фагоцитоза [5].

После подтверждения захвата сшитой ГК фибробластами методом световой микроскопии нами было проведено исследование влияния поперечно-сшитого продукта ГК на пролиферацию и морфологию клеток. Выяснилось, что добавление в питательную среду исследуемого геля ГК привело к ускорению пролиферации фибробластов в течении первых 13 часов. Через 19 часов количество клеток по сравнению с контрольными образцами увеличивалось примерно вдвое. Эти результаты соотносятся с данными из литературных источников, которые также подтверждают ускорение пролиферации клеток под действием ГК и описывают нескольких механизмов, за счет которых это происходит [14,15]. Авторы объясняют ускорение пролиферации тем, что ГК участвует в регуляции активности факторов роста, таких как фактор роста фибробластов (FGF) и эпидермальный фактор роста (EGF). ГК может связываться с этими факторами роста и увеличивать их стабильность, что приводит к длительному воздействию этих факторов роста на клетки и, за счет этого, стимуляции их пролиферации. Также гиалуронан влияет непосредственно на адгезию клеток, что ускоряет сам процесс клеточного роста и деления [14,15].

Помимо влияния геля ГК на пролиферацию фибробластов в работе методом световой микроскопии было продемонстрировано влияние поперечно-сшитой ГК на морфологию клеток. Через 19 часов, по сравнению со снимками контрольного образца, фибробласты кожи человека, инкубированные с гелем, выглядят более распластанными и практически образуют монослой. Это может быть обусловлено, либо влиянием самой ГК на адгезию клеток, о чем свидетельствуют некоторые литературные источники [13], либо влиянием вязкого геля, создающего имитацию внеклеточного матрикса.

Недостатками настоящего исследования являются низкая статистика результатов, использование культуры фибробластов от единственного донора и нехватка сравнительных исследований о влиянии чистой не сшитой ГК. В дальнейших исследованиях планируется более подробное изучение механизмов поглощения молекул ГК клетками, влияние вязкости и других характеристик поперечно-сшитых гидрогелей на жизненный цикл клеток и повторение экспериментов с дополнительным контролем в виде чистой не сшитой ГК.

Конфликт интересов

Работа была проведена при финансовой поддержке ООО «МЕДБИОСИСТЕМ».

Финансирование

Исследование проведено в рамках договора на НИР между ЦТП ФХФ РАН и ООО «МЕДБИОСИСТЕМ».

Список литературы

1. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;120:1682–95.
2. Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, et al. Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *The FEBS Journal* 2011;278:1419–28.
3. Dovedytis M., Liu Z. J., Bartlett S. (2020). Hyaluronic Acid and its Biomedical Applications: A Review. *Eng. Regen.* 1, 102–113. 10.1016/j.engreg.2020.10.001
4. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2014;1840:2452–9.
5. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in*

- Immunology* 2015;6.
6. J. M. Tarbell, L. M. Cancel. The glycocalyx and its significance in human medicine. (Review). *J Intern Med* 2016; 280: 97–113.
7. Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a Human Gene Expressed in Many Cells, Encodes a Lysosomal Hyaluronidase with a Novel Type of Specificity *. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:22466–70.
8. Chiesa E, Greco A, Riva F, Dorati R, Conti B, Modena T, Genta I. CD44-Targeted Carriers: The Role of Molecular Weight of Hyaluronic Acid in the Uptake of Hyaluronic Acid-Based Nanoparticles. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Jan 17;15(1):103.
9. Цепилов ПН, Белодед АВ. Гиалуриновая кислота – «старая» молекула с «новыми» функциями: биосинтез и деполимеризация гиалуриновой кислоты у бактерий и в тканях позвоночных, в том числе в процессах канцерогенеза. *Биохимия* 2015;80:1315–33.
10. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* 2006;85:699–715.
11. Borzacchiello A, Russo L, Malle BM, Schwach-Abdellaoui K, Ambrosio L. Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *BioMed Research International* 2015;2015:e871218.
12. Mondal S., Haridas N., Letha S. S., Vijith V., Rajmohan G., Rosemary M. J. (2016). Development of Injectable High Molecular Weight Hyaluronic Acid Hydrogels for Cartilage Regeneration. *J. Macromol. Sci. Part A* 53 (8), 507–514.
13. C. A. de la Motte and J. A. Drazba, 'Viewing Hyaluronan', *J Histochem Cytochem*, vol. 59, no. 3, pp. 252–257, Mar. 2011,
14. Greco RM, Iocono JA, Ehrlich HP. Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *J Cell Physiol* 1998;177:465e73.
15. Mast BA, Diegelmann RF, Krummel TM, et al. Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix* 1993;13:441e6.