

УДК 576.524 + 57.053 + 616-092.18

Новая композиция твердофазных модификаций гиалуроновой кислоты протеиногенными аминокислотами HR-2 увеличивает метаболическую активность фибробластов без выраженных пролиферативных эффектов

Московцев А.А.^{1,2}, Зайченко Д.М.¹, Хабаров В.Н.³, Михайлова Н.П.^{4,5},
Тявин Д.Ю.⁵, Селянин М.А.⁵, Соколовская А.А.¹, Кубатиев А.А.^{1,2}

- ¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8
- ² Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1
- ³ АНО реализации научно-исследовательских программ «Научно-исследовательский центр гиалуроновой кислоты». 119146, Москва, Комсомольский пр., д. 38/16
- ⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1
- ⁵ Группа компаний «Мартинекс». 115093, Москва, ул. Павловская, д. 7

Гетерополисахарид гиалуронан, являясь ключевым компонентом внеклеточного матрикса, играет важную роль в поддержании определенных физико-химических условий в тканях. Кроме того, гиалуронан может модулировать состояние клеток через взаимодействие с рецепторами и эндоцитоз, однако, эти эффекты недостаточно изучены. Благодаря своим уникальным свойствам, гиалуронан нашел широкое применение в разных областях биомедицины, в частности, активно используется в качестве микроимплантатов в дерму для коррекции возрастных изменений кожи. Вместе с тем, нативный гиалуронан нестабилен при инъекции и подвергается быстрой деградации в ткани, что существенно ограничивает продолжительность вызываемых им эффектов. В данной работе исследуется новая композиция на основе гиалуронана — HR-2, которую отличают ковалентные сшивки между цепями, введенные путем разработанной авторами одностадийной технологии твердофазной модификации полисахаридов. Сшивки препятствуют быстрой деградации гиалуронана. Авторами предложена концепция функционирования гиалуронана в ткани в качестве депо протеиногенных аминокислот и витаминов в целях поддержания биосинтетической активности клеток. Ранее было показано, что сшитый по данной технологии гиалуронан более стабилен в дерме, в связи с чем его действие в качестве депо может быть пролонгировано. В данной работе исследуется влияние на эндотелиоцитоподобные клетки и фибробласты препарата HR-2, представляющего собой новую композицию гиалуроната натрия и сополимера гиалуроновой кислоты с аскорбилфосфатом магния с добавлением глицина, пролина, лизина. В работе проводится сравнение с немодифицированным гиалуронатом натрия. Установлено, что композиция HR-2 в сравнительно высоких концентрациях дозозависимо увеличивает активность дегидрогеназ в фибробластах, что может свидетельствовать о метаболическом их стимулировании. Это отличает препарат HR-2 от нативной гиалуроновой кислоты, ингибирующей в этих же концентрациях метаболическую активность фибробластов. Оба препарата — и HR-2, и нативная гиалуроновая кислота — в малых концентрациях вызывают гормезис-подобный, стимулирующий метаболизм эндотелиоцитов эффект. Цитотоксичность композиции HR-2 ниже нативной гиалуроновой кислоты на обоих клеточных типах. Следует также отметить, что не выявлено достоверного пролиферативного действия обоих препаратов. Полученные в работе новые сведения могут быть использованы для оптимизации режимов применения препаратов гиалуроновой кислоты в биомедицине, с целью достижения максимального терапевтического эффекта и снижения нежелательных последствий его применения.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота; твердофазные модификации; фибробласты; эндотелиоциты.

Для цитирования: Московцев А.А., Зайченко Д.М., Хабаров В.Н., Михайлова Н.П., Тявин Д.Ю., Селянин М.А., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Новая композиция твердофазных модификаций гиалуроновой кислоты протеиногенными аминокислотами HR-2 увеличивает метаболическую активность фибробластов без выраженных пролиферативных эффектов. Патогенез. 2018; 16(4): 28-36

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.28-36

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование: Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 16.07.2018

A new composition of hyaluronic acid modifications, HR-2, with proteinogenic amino acids increases the metabolic activity of fibroblasts without pronounced proliferative effects

Moskovtsev A.A.^{1,2}, Zaychenko D.M.¹, Khabarov V.N.³, Mikhailova N.P.^{4,5}, Tyavin D.Yu.⁵, Seljanin M.A.⁵, Sokolovskaya A.A.¹, Kubatiev A.A.¹

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuing Vocational Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

³ Hyaluronic Acid Research Center, Komsomolsky Prospekt 38/16, Moscow 119146, Russian Federation

⁴ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova Str. 1, Moscow 117997, Russian Federation

⁵ Martinex Group, Pavlovskaya Str. 7, Moscow 115093, Russian Federation

Hyaluronan (HA) is a linear heteropolysaccharide, a key component of the extracellular matrix. It plays an important role in maintaining certain physicochemical conditions in tissues. In addition, hyaluronan can modulate the state of cells through interaction with receptors and endocytosis; however, these effects are not well understood. Due to its unique properties, hyaluronan is widely used in various fields of biomedicine, in particular, as microimplant for correction of age-related skin changes. However, native hyaluronan is unstable when injected and undergoes rapid degradation in the tissue, which significantly limits duration of its effects. In this study, we evaluated a new hyaluronan-based composition, HR-2, which is distinguished by covalent cross-links between the chains. Those cross-links were incorporated using a one-stage technology of solid-phase modification of polysaccharides developed by the authors. The cross-links prevent the rapid degradation of hyaluronan. The authors proposed a concept of injecting hyaluronan into tissue as a depot of proteinogenic amino acids and vitamins in order to maintain the biosynthetic activity of cells. Previously it was shown that hyaluronan produced with this technology was more stable in the dermis, and, therefore, its performance as a depot can be prolonged. In this work, we studied the effect on endotheliocyte-like cells and fibroblasts of HR-2, which is a new composition of sodium hyaluronate and a copolymer of hyaluronic acid with magnesium ascorbyl phosphate supplemented with glycine, proline, and lysine. The study compared HR-2 with unmodified sodium hyaluronate. We found that the composition of HR-2 in relatively high concentrations dose-dependently increased dehydrogenase activities in fibroblasts, that might indicate their metabolic stimulation. This differs HR-2 from native hyaluronic acid, which inhibits the metabolic activity of fibroblasts when added in similar concentrations. Low concentrations of both drugs, HR-2 and native hyaluronic acid, exerted a hormesis-like effect on endotheliocyte metabolism. Cytotoxicity of the HR-2 formulation was lower than of native hyaluronic acid in both cell types. It should also be noted that no reliable proliferative effects of both drugs have been identified. The new information obtained in this study can help optimizing the use of hyaluronic acid drugs in biomedicine to achieve the best therapeutic effect and reduce undesirable consequences of its use.

Keywords: *hyaluronan; solid-phase modification of polysaccharides; fibroblasts; endotheliocyte-like cells.*

For citation: Moskovtsev A.A., Zaychenko D.M., Khabarov V.N., Mikhailova N.P., Tyavin D.Yu., Seljanin M.A., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. [A new composition of hyaluronic acid modifications, HR-2, with proteinogenic amino acids increases the metabolic activity of fibroblasts without pronounced proliferative effects]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 28-36 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.28-36

For correspondence: Moskovtsev Aleksey Aleksandrovich, e-mail: bioinf@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 16.07.2018

Введение

Гиалуронан — природный линейный немодифицированный гетерополисахарид, построенный из регулярно чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных бета-гликозидными связями [1]. Гиалуронан относится к классу гликозамингликанов и является важным компонентом внеклеточного матрикса. Появление в эволюции этого полисахарида, по-видимому, было одним из факторов, способствовавших расцвету хордовых животных, у которых в тканях содержится значительное количество гиалуронана. Это, вероятно, можно объяснить уникальными физико-химическими свойствами молекул гиалуронана: при физиологическом нейтральном значении pH этот анионный гетерополисахарид способен связывать значительное количество воды, 1000кратно превосходящее собственный вес [2].

Кроме структурной и биомеханической функций, гиалуронан играет важную роль как сигнальная молекула:

после установления факта специфического связывания гиалуронана с клетками в культуре [3] и его регуляторного действия на подвижность клеток [4], стало ясно, что гиалуронан способен менять функционирование клеток [5]. За прошедшие три десятка лет накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о комплексной роли гиалуронана в норме и патологии и его участия в таких процессах, как регенерация поврежденных тканей [2], воспаление [6], ангиогенез [7] и других. Вовлеченность гиалуронана в столь важные процессы привлекла значительный интерес к нему в практической биомедицине, и в настоящее время он активно используется в офтальмологии, ревматологии, тканевой инженерии, регенеративной медицине [8], основанные на гиалуронане системы доставки лекарственных препаратов рассматриваются как перспективные в фармакологии [9].

Одними из наиболее частых применений гиалуронана являются различные варианты местных инъекций микро-

имплантатов из гиалуронана в ткани, например, дерму, с целью прямого и/или опосредованного изменения локальных физико-химических условий внеклеточной среды. Однако особенностью гиалуронана как компонента внеклеточного матрикса является высокая скорость его обмена — так, например, в коже период его полураспада составляет 24-48 ч. [1]. Введение нативного гиалуронана приводит к быстрой его резорбции и непродолжительным эффектам. Для пролонгации действия гиалуроновой кислоты был предложен ряд методов органического синтеза для введения в ее структуру модификаций, в частности, ковалентных поперечных сшивок между цепями [1]. Данные методы, однако, имеют ряд недостатков — таких, как использование токсичных реагентов, большое число этапов синтеза, необходимость в сложной процедуре очистки продукта реакции. В качестве альтернативы авторами, на основе метода твердофазной модификации, была разработана технология твердофазной сшивки гиалуронана с одновременным введением в его состав биологически-активных соединений. Ключевыми параметрами данного способа проведения твердофазных реакций являются высокое давление (от 5 до 1000 МПа) и деформация сдвига — эти условия реализуются в механо-химическом реакторе. С использованием данного подхода была получена композиция сшитой гиалуроновой кислоты с витамином С, пролином, лизином и глицином — HR-2 [10]. Было проведено исследование действия этой композиции на белых лабораторных крысах-самцах, при этом в качестве препарата сравнения был использован раствор нативной гиалуроновой кислоты (контроль). Препараты вводили в межлопаточную область спины: композиция HR-2 — слева, контроль — справа каждому животному. Наблюдение в течение 14 суток показало, что скорость деградации препаратов заметно отличались: гель немодифицированной гиалуроновой кислоты был практически полностью элиминирован из ткани уже на третьи сутки после введения, композиция HR-2 — лишь на четырнадцатые сутки. Деградация гелей происходила путем макрофагальной резорбции, а также бесклеточного ферментативного лизиса.

Было также отмечено, что введение композиции HR-2 способствовало увеличению числа фибробластов и образованию коллагеновых волокон, что позволило предположить индукцию пролиферации фибробластов и увеличение их биосинтетической активности.

Целью данной работы стало сравнение действия композиции твердофазных модификаций гиалуроновой кислоты протеиногенными аминокислотами HR-2 и препарата немодифицированной гиалуроновой кислоты на клетки двух важных клеточных типов с точки зрения биологических эффектов гиалуронана — фибробласты и эндотелиоциты. В качестве моделей этих клеточных типов были использованы эндотелиоцитоподобная линия EA.hy926 и культура фибробластов крайней плоти.

Материалы и методы исследования

Синтез композиции HR-2 на основе гиалуроновой кислоты. В работе в качестве контроля и для модификации использовался идентичный препарат несшитой

натриевой соли нативной немодифицированной гиалуроновой кислоты с средневязкостной молекулярной массой 2 000 000 Да.

Для приготовления композиции HR-2 порошкообразную натриевую соль нативной немодифицированной гиалуроновой кислоты, магниевую соль фосфорнокислого эфира аскорбиновой кислоты, глицин, пролин-L, лизин-L-моноклорид, диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (ДЭБД) гомогенизировали в мельнице при 50°C в течение 10-15 мин [10]. Полученную однородную порошкообразную смесь помещали на нижнюю наковальню Бриджмена (диаметр рабочей поверхности 3 см), накрывали верхней наковальней, наковальни ставили под пресс и подвергали давлению 1000 МПа при 20°C в течение 50 с, при угле поворота нижней наковальни 200°. Далее снимали давление, вынимали наковальни из-под пресса. Конечный состав композиции HR-2 включал в себя гиалуронат натрия 0,5-0,7 % масс., сополимер гиалуроновой кислоты с аскорбилфосфатом магния 0,3-0,8 % масс., глицин 0,1-0,3 % масс., пролин-L 0,1-0,3 % масс., лизин-L 0,1-0,3 % масс., хлористый натрий 0,1-0,2 % масс. в фосфатно-солевом буфере, pH = 7,4.

Контрольный препарат сравнения представлял собой несшитую натриевую соль нативной немодифицированной гиалуроновой кислоты 0,8-1,4 % масс. в фосфатно-солевом буфере, pH = 7,4.

Композицию HR-2 и нативный гиалуронан растворяли в ростовой среде в диапазоне концентраций от 4 мг/мл до 0,125 мг/мл непосредственно перед каждым экспериментом.

Культирование клеток. Исследования были выполнены на эндотелиоцитарной клеточной линии человека EA.hy926 и фибробластах крайней плоти человека FSK-1. Клеточная линия человека EA.hy926 является гибридом первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC и тиогуанин-резистивного клона линии клеток аденокарциномы легких A549 (рис. 1, А). Клетки линии EA.hy926 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам крупных сосудов. Клетки EA.hy926 были любезно предоставлены доктором Edgel C.J. (Университет Северной Каролины, США). Коллекция ATCC CRL-2922. Фибробласты крайней плоти человека Foreskin получены из Российской коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Все клеточные линии паспортизованы, прошли контроль видовой специфичности (во всех случаях проведен кариотипический анализ), контроль контаминации (бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены).

Клетки EA.hy926 культивировали в среде DMEM с глюкозой 4,5 г/л; 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 50 мкг/мл гентамицина, 2 mM L-глутамин и НАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимидин). Субкультивирование клеточных линий осуществляли 1 раз в 3-4 дня, вызывая дезинтеграцию монослоя 5-минутной экспозицией в растворе трипсина (0,25%) с ЭДТА. В экспериментах использовали клетки 5-12 пассажей. Пассирование клеток осуществляли по достижение культурой 90 % конфлюента. Рост клеток проходил

в атмосфере с 5% CO₂ в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C. Фибробласты крайней плоти человека культивировали в тех же условиях, но без НАТ.

Для экспериментов клетки рассеивали в полной питательной среде с 10% сывороткой, с определенной плотностью для каждой линии в 96-луночные для МТТ-теста или в 24-луночные планшеты для определения клеточного цикла. Через 24 часа проводили полную замену питательной среды на среду с 1 % содержанием FBS. Ещё через 24 часа к клеткам добавляли препараты с различными концентрациями. После добавления препаратов клетки культивировали 24 и 48 часов, затем проводили анализ жизнеспособности, цитотоксичности и анализ клеточного цикла. Клетки, культивируемые без препаратов, использовали как контроль.

Оценка жизнеспособности клеток методом исключения красителя трипанового синего. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего. Аликвоту суспензии объемом 20 мкл от каждого образца смешивали с равным объемом 0,4% раствора красителя трипанового синего и помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на автоматическом счётчике клеток Countess™ («Invitrogen», США). Каждый исследуемый образец клеток был подсчитан в дуплете.

Анализ клеточного цикла. Для исследования изменений клеточного цикла ядерную ДНК окрашивали фенантридиновым флуорофором пропидий йодидом (PI), используя для этой цели коммерческий набор BD Pharmingen™ PI/RNase Staining Buffer и предложенный производителем протокол. Клетки осаждали из ростовой среды центрифугированием на скорости 250 g в течение 5-10 минут (центрифуга «Joan BR4i» с бакет-ротором («Thermo Electron Corporation», США)), отбирали супернатант и промывали осадок охлажденным (+4°C) фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего снова осаждали центрифугированием при тех же параметрах. Отобрав супернатант, фиксировали клетки, добавляя по каплям, при постоянном встряхивании, 0,5-1,0 мл 75% холодного (-20°C) этанола. Фиксированные клетки окрашивали на следующий день, до этого момента образцы хранили при +4°C. Перед окрашиванием клетки отмывали в буфере PBS и осаждали центрифугированием на скорости 200 g в течение 10 минут. Затем отбирали супернатант и, встряхнув осадок, окрашивали клетки, добавляя 0,5 мл PI/RNase Staining Buffer, после чего инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре, в темноте. Анализ суспензии клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованным воздушно-охлаждаемым арговым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце анализировали 25 000 событий. Эмиссию флуоресценции (PI) регистрировали в канале FL2 (563-607 нм). Сбор данных проводили с использованием программного обеспечения CellQuest, версия 6.0, приложенного производителем к прибору. Анализ файловых данных проводили в программе ModFit LT, версия 3.2 («Software House», США).

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность препаратов и влияние на метаболическую активность

определяли с помощью МТТ-теста. Для этого клетки инкубировали (24 ч. и 48 ч.) с препаратами в различных концентрациях в 96-луночном планшете. После инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий). Раствор МТТ (2,5 мг/мл в PBS) стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. После инкубации с МТТ в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и, вращали планшеты на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение 20 мин, до полного растворения кристаллов формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм с помощью фотометра Hidex Chameleon (Hidex Oy, Финляндия).

Статистический анализ и представление данных. Обработка данных проводилась с использованием критерия Краскела-Уоллиса и программного обеспечения Statistica, построение графиков осуществлялось в программной среде Origin Pro 9.0, аппроксимация кривых проводилась с использованием 3-параметрического логарифмического уравнения, а также 4-параметрического логистического уравнения сигмоидальной зависимости доза-ответ. Для анализа эффекта гормезиса нами была построена специальная аппроксимирующая линейно-логистическая модель.

Результаты исследования

Влияние на метаболическую активность. Цитотоксическое действие препаратов ГК и HR-2 на эндотелиальные клетки EA.hy926 невелико (рис. 1). Следует отметить, что с ростом концентрации цитотоксический эффект обоих препаратов становится более выраженным.

Цитотоксичность препаратов и влияние на метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста. После инкубации клеток (24 часа и 48 часов) с препаратами в каждую лунку вносили раствор МТТ инкубации. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм, референс-волна 620 нм.

IC10 (концентрации препарата, при которой гибнет 10% клеток) для гиалуронана при 24-часовой инкубации находится в диапазоне 0,25-0,50 мг/мл. IC10 для ГК при 48-часовой инкубации — в диапазоне 0,50-1,00 мг/мл; IC10 препарата HR-2 при 24-часовой инкубации находится в диапазоне 0,50-1,00 мг/мл, при 48-часовой инкубации — в диапазоне 1,0-2,0 мг/мл. Цитотоксический эффект препарата HR-2 на клетки линии EA.hy926 по сравнению с немодифицированной гиалуроновой кислотой, в целом, менее выражен. Интересно, что с увеличением длительности инкубации цитотоксичность падает как для ГК, так для HR-2. Возможно, это связано с дестабилизацией компонента, обуславливающего цитотоксичность, а также с адаптивными процессами, протекающими в клетках.

Интересным обнаруженным фактом является увеличение продукции формазана в клетках, инкубированных с низкими концентрациями ГК. Для препарата контрольной ГК такой эффект был выражен через 24 часа в

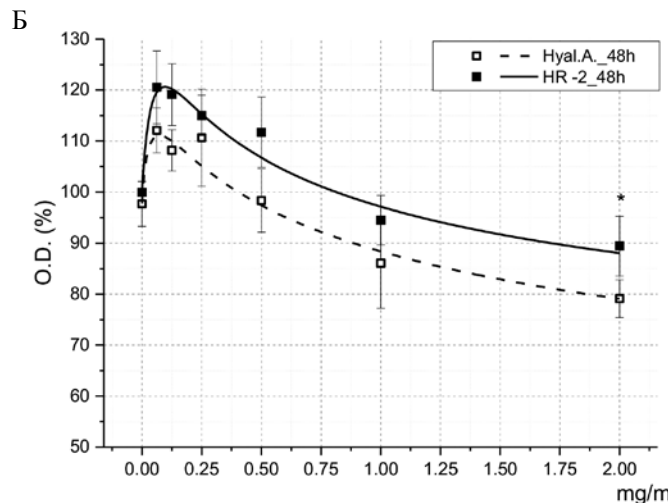
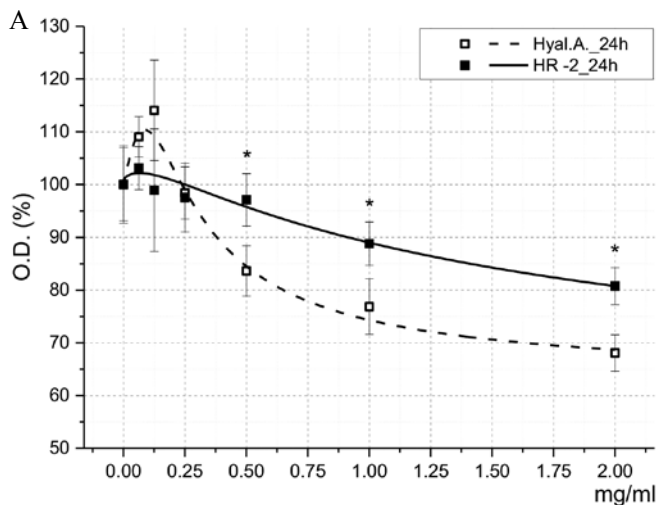


Рис. 1. Влияние препаратов на метаболическую активность эндотелиоцитов EA.hy926. при 24- (А), 48-часовом (Б) действии препаратов ГК (Hyal.A) и HR-2.

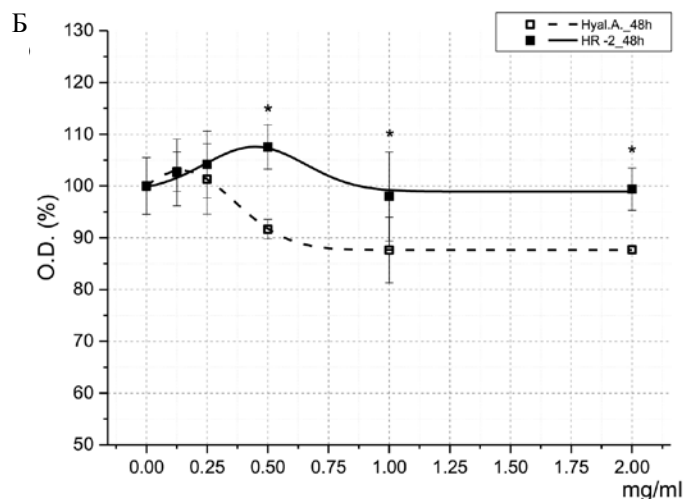
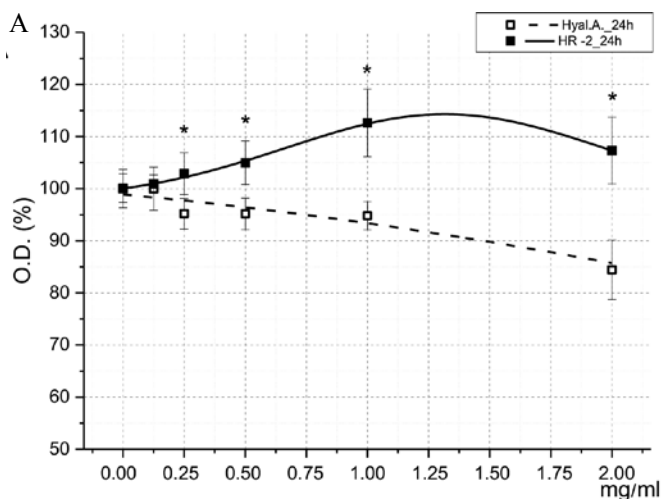


Рис. 2. Влияние на метаболическую активность фибробластов при 24- (А), 48-часовом (Б) действии препаратов ГК (Hyal.A.) и HR-2. Цитотоксичность препаратов и влияние на метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста. После инкубации клеток (24 часа и 48 часов) с препаратами в каждую лунку вносили раствор МТТ инкубации. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм, референс-волна 620 нм. Результаты статистически достоверны (* – $p < 0,05$).

концентрации 0,0625 мг/мл и через 48 часов в диапазоне концентраций 0,0625-0,25 мг/мл (рис. 1, А). Похожий двухфазный характер кривой цитотоксичности, только более ярко выраженный на длительных инкубациях, имеет место и для препарата HR-2. Так, после 48-часовой инкубации нами показан данный эффект для диапазона концентраций 0,0625-0,5000 мг/мл, причем он превосходит действие ГК (рис. 1, Б). Однако при 24-часовой инкубации с HR-2 рост оптической плотности на малых концентрациях не определялся.

Таким образом, гормезис-подобный эффект препарата HR-2 на эндотелиальные клетки имеет отсроченный характер: почти не выражен при 24 часовой инкубации, однако, обнаруживается на 48 часах. Данный эффект может быть ассоциирован с пролиферацией клеток или стимуляцией метаболической активности.

Действие гиалуроновой кислоты и композиции HR-2

на фибробласты характеризуется минимальной цитотоксичностью, и, в отличие от эндотелиальных клеток, заметных изменений в величине цитотоксического эффекта с увеличением времени инкубации также не происходит. Препарат HR-2 показал дозозависимое стимулирование на фибробластах после 24 часовой инкубации (рис. 2, А). Небольшие по величине стимулирующие фибробласты гормезис-подобные эффекты также отсрочены, как и для эндотелиоцитов, и проявляются после 48 часовой инкубации для малых концентраций препарата немодифицированной гиалуроновой кислоты (0,125 и 0,500 мг/мл) (рис. 2, Б). Гормезис-подобные эффекты препарата HR-2 на фибробласты не наблюдались.

Влияние на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Следующим этапом нашей работы было исследование распределения клеток по фазам клеточного

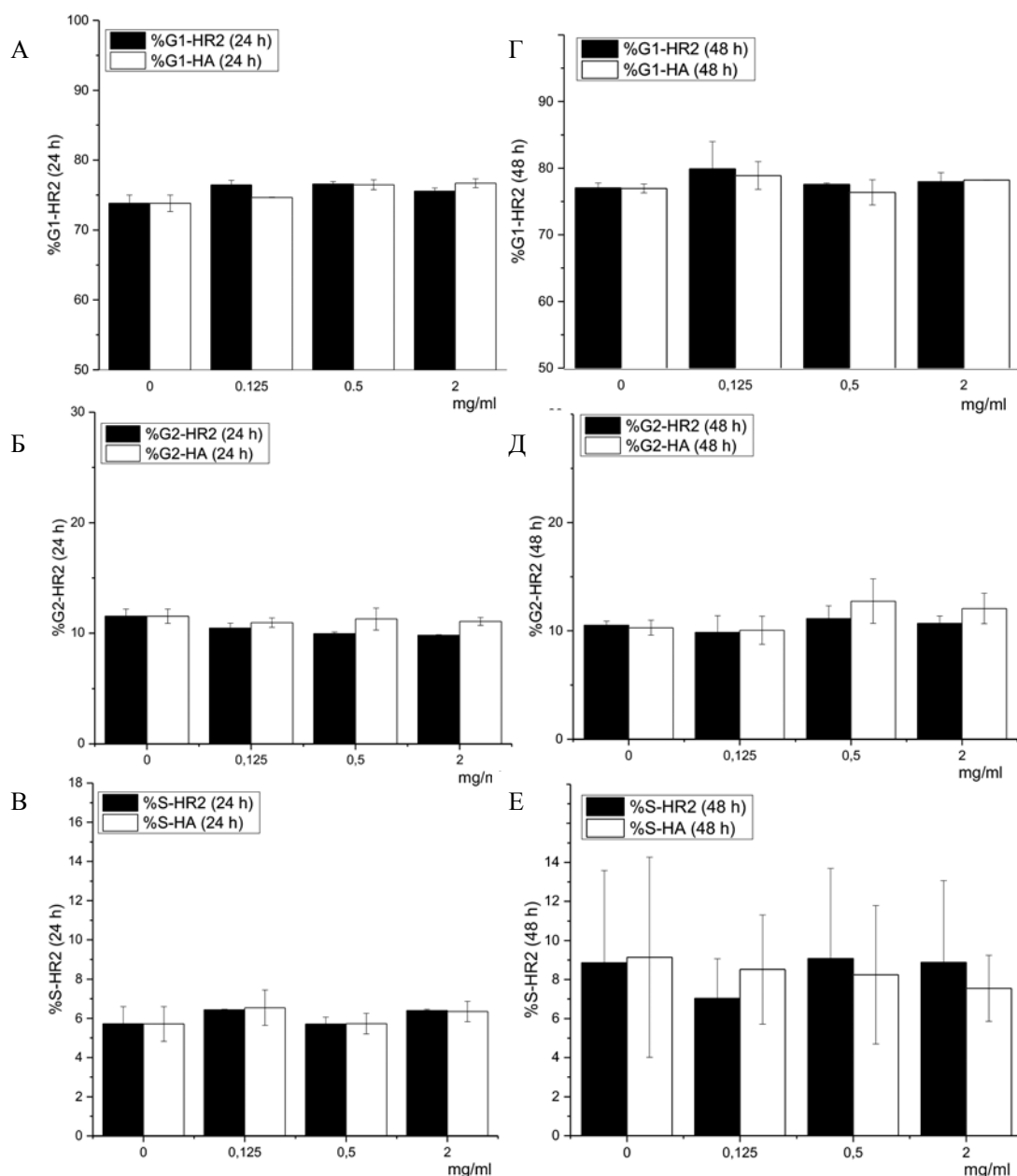


Рис. 3. Диаграмма зависимости количества эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 (в %) в фазах клеточного цикла от концентрации препаратов ГК (HA) и HR-2 при инкубации 24 часа: (А) – в фазе G1 (HR-2: $p = 0,76$; ГК: $p = 0,18$); (Б) – в фазе G2 (HR-2: $p = 0,28$; ГК: $p = 0,76$); (В) – в фазе S (HR-2: $p = 0,68$; ГК: $p = 0,68$). При инкубации 48 часов: (Г) – в фазе G1 (HR-2: $p = 0,76$; ГК: $p = 0,36$); (Д) – в фазе G2 (HR-2: $p = 0,76$; ГК: $p = 0,14$); (Е) – в фазе S (HR-2: $p = 0,84$; ГК: $p = 0,98$). Для исследования клеточного цикла ядерную ДНК клеток окрашивали PI/RNase Staining Buffer, инкубировали в течение 15 мин. в темноте при комнатной температуре. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

цикла при воздействии на них референсной ГК и композиции HR-2.

Проведенный анализ клеточной популяции EA.hy926 методом проточной цитометрии при действии ГК и HR-2 не показал статистически достоверных изменений количества клеток в G1, S-фазе или G2-фазе на 24- и на 48-часовых временных интервалах инкубаций. Слабо выражен эффект накопления клеток в фазе G1 при 24 и 48-часовой инкубации при действии обоих препаратов (рис. 3). Сопоставляя данные цитометрии и наблюдаемые эффекты повышения продукции формазана по срав-

нению при анализе метаболической активности клеток линии EA.hy926, можно заключить, что ГК и HR-2 вызывают скорее рост метаболической активности клеток, чем их пролиферацию.

Исследования влияния препаратов на клеточный цикл фибробластов также не показали достоверных изменений в распределении клеток по фазам цикла. Нами отмечены слабые тенденции к снижению количества фибробластов в фазе G1 при 24-часовой инкубации при действии HR-2 и HA и к накоплению клеток в фазе S (рис. 4).

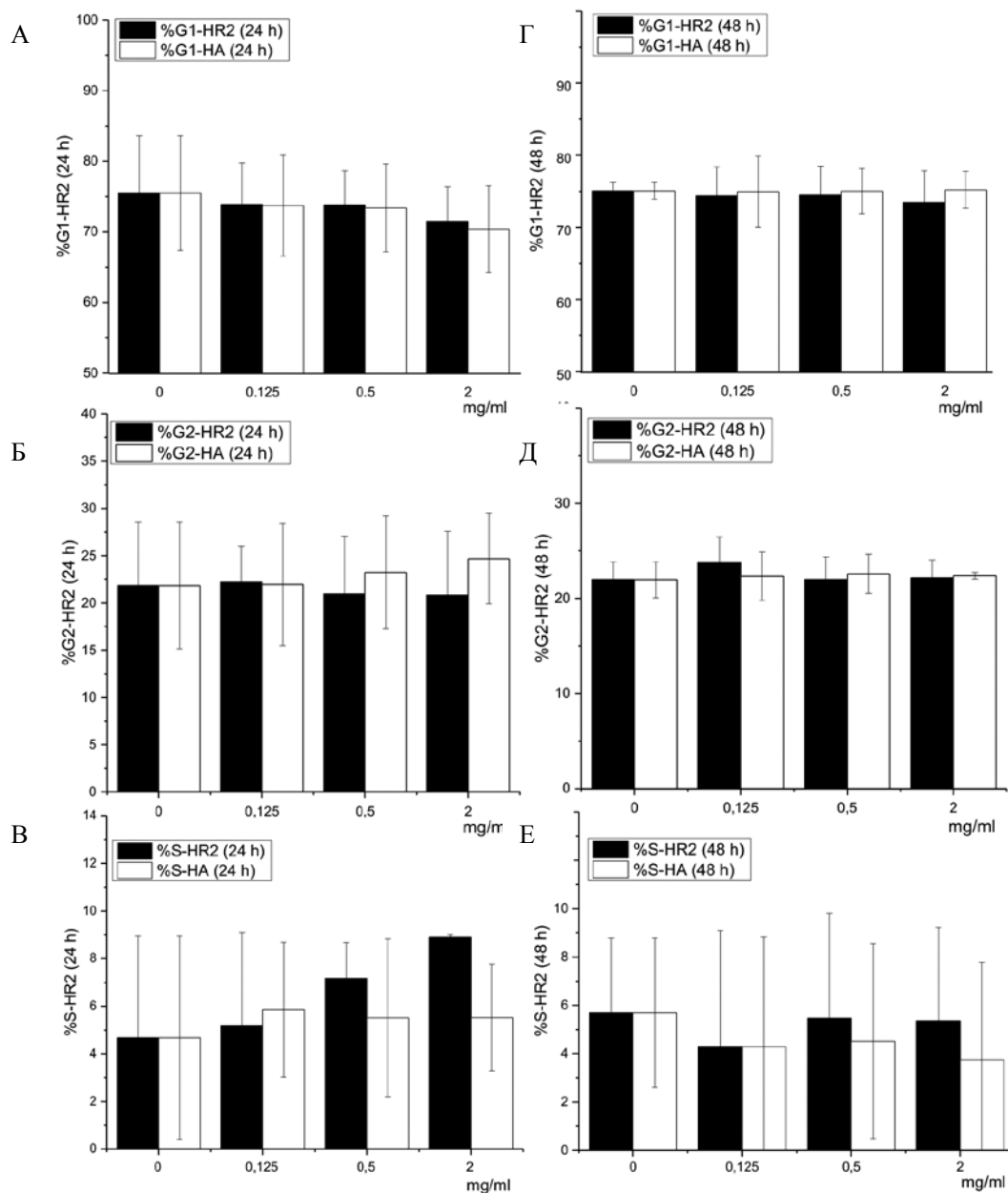


Рис.4. Диаграмма зависимости количества фибробластов (в %) в фазах клеточного цикла от концентрации препаратов ГК (HA) и HR-2 при инкубации 24 часа: (А) – в фазе G1 (HR-2: $p = 0,76$; ГК: $p = 0,68$); (Б) – в фазе G2 (HR-2: $p = 0,92$; ГК: $p = 0,68$); (В) – в фазе S (HR-2: $p = 0,19$; ГК: $p = 0,91$). При инкубации 48 часов: (Г) – в фазе G1 (HR-2: $p = 0,88$; ГК: $p = 0,95$); (Д) – в фазе G2 (HR-2: $p = 0,76$; ГК: $p = 0,98$); (Е) – в фазе S (HR-2: $p = 0,82$; ГК: $p = 0,68$). Для исследования клеточного цикла ядерную ДНК клеток окрашивали PI/RNase Staining Buffer, инкубировали в течение 15 мин. в темноте при комнатной температуре. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Таким образом, HR-2 оказывает на фибробласты стимулирующее метаболизм действие, величина которого пропорциональна ее концентрации, причем подобный эффект был зарегистрирован и на сравнительно низких концентрациях до 0,500 мг/мл.

Обсуждение

Продукция гиалуронана и связывание ее с клеточными рецепторами регулируется сложным образом и

зависит от типа клеток, и может по-разному реализовываться в физиологических или патологических состояниях [11]. В частности, было замечено, что способность гиалуронана модулировать клеточные функции обусловлена низкомолекулярными фрагментами [12]. Эти фрагменты способны индуцировать или ингибировать пролиферацию, миграцию и адгезию клеток [13]. Тем не менее, литературные данные довольно противоречивы, что может быть обусловлено вариабельностью экспериментальных условий, различиями в используемых клеточных моделях. Так, например, было показано, что

добавление гиалуронана к нормальным фибробластам человека вызывает ингибирование клеточного роста, которое зависело от концентрации гиалуронана, но в то же время, не зависело от молекулярного веса гиалуронана. При этом было зафиксирована быстрая интернализация внеклеточного гиалуронана фибробластами кожи человека совместно с CD44 рецепторами и её транспортом в лизосомы. Как низко-, так и высокомолекулярная фракция гиалуронана снижают пролиферацию клеток, что может быть ассоциировано с катаболизмом гиалуронана [12]. По данным других экспериментов добавление экзогенной ГК к фибробластам стимулировало их пролиферацию — возможно, что пролиферативный эффект гиалуронана обусловлен более длительной инкубацией клеток с препаратом ГК (от 4 до 7 суток) [14].

Влияние гиалуронана на пролиферацию эндотелиальных клеток, по-видимому, зависит от молекулярной массы [1]. Так, ГК с низкой молекулярной массой (1300-4500 Да) вызывает пролиферацию клеток, тогда как высокомолекулярная ГК ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток. Возможно, это связано с различиями экспрессии рецепторов ГК или с примесями, особенностями производства данного полисахарида [1].

В нашей работе был зарегистрирован двухфазный характер зависимости метаболической активности от концентрации препаратов HR-2 и гиалурононовой кислоты при их действии на эндотелиальные клетки. Исходя из результатов анализа клеточного цикла, пролиферацию эндотелиальных клеток при действии обоих препаратов можно исключить. Метаболическое стимулирование проявляется у препарата HR-2 в большей степени при более длительной инкубации по сравнению с гиалурононовой кислотой, что может быть связано с дополнительным усилением метаболических эффектов за счет конъюгированных с гиалуронаном HR-2 аминокислот и аскорбиновой кислоты. Следует отметить, что препарат HR-2, по-видимому, в силу этих же причин обладает меньшим цитотоксическим действием на эндотелиоцитоподобную клеточную линию. С учетом того, что использованный метод МТТ в большей степени дает представление об интегральном клеточном метаболизме, можно утверждать, что активность дегидрогеназ в эндотелиоцитах при действии HR-2 повышена по сравнению с исследованным препаратом гиалурононовой кислоты. Возможно, что такая активация клеток может быть обусловлена ростом энергопродукции в связи со стресс-индуцирующим воздействием олигомеров ГК в составе препаратов на эндотелиальные клетки — в частности, в литературе было отмечено увеличение экспрессии белков теплового шока при действии олигосахаридных фрагментов гиалуронана [15].

Препараты HR-2 и ГК практически не оказывают действия на клеточный цикл фибробластов — заметна лишь слабая тенденция к снижению содержания фибробластов в фазе G1 и небольшое увеличение в фазах S (ярче проявляется у HR-2) и G2 при 24-часовой инкубации. Таким образом, влияние обоих препаратов на пролиферацию клеток незначительны. Гормезис-подобный характер действия на метаболическую активность фибробластов препарата HR-2 практически не проявляется, однако, выражено дозозависимое стимулирование

метаболизма, что существенно отличает эффект препарата HR-2 от описанного в литературе и подтвержденного нами на 24-часовом временном интервале ингибирующего метаболическую активность фибробластов действия высоких концентраций гиалурононовой кислоты. Мы связываем наблюдаемый эффект с модификаторами гиалурононовой кислоты, входящими в состав HR-2, которые могут выступать в качестве дополнительных активаторов метаболизма. Таким образом, HR-2 снижает ингибирующие эффекты высокой концентрации гиалурононовой кислоты на метаболизм фибробластов.

Заключение

В заключении следует отметить, что проведенный нами анализ влияния препарата HR-2 на метаболическую активность, выживаемость и распределение по фазам клеточного цикла эндотелиоцитов и фибробластов позволяет сделать вывод о сравнительно низкой цитотоксичности препарата HR-2 для клеток этих двух разных типов. Зарегистрированная метаболическая активация эндотелиоцитов при действии малых концентраций препарата может указывать на возможное повышение реактивности клеток на определенном этапе применения препарата при снижении его локальной концентрации в ткани.

Результаты проведенного исследования, таким образом, указывают на то, что характер действия препаратов ГК зависит от концентрации и, по-видимому, специфичен для определенного клеточного типа. Разнонаправленность этих эффектов может указывать на сложность сигнальных и метаболических путей, вовлеченных в ответ клеток на ГК и происходящие физико-химические изменения при диссоциации компонентов полимерной матрицы препарата.

Полученные новые сведения о влиянии препарата HR-2 на клеточное звено, в частности, эффектах стимулирования метаболизма фибробластов, могут быть использованы для оптимизации диапазонов концентраций препарата, используемых в биомедицине, с целью достижения максимального терапевтического эффекта и снижения нежелательных последствий его применения.

Список литературы

1. Khabarov V.N., Boykov P.Y., Selyanin M.A. *Hyaluronic Acid: Production, Properties, Application in Biology and Medicine*. Wiley, 2015. 216 p.
2. Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007; 23: 435-461. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337
3. Underhill C.B., Toole B.P. Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells. *J. Cell Biol.* 1979; 82: 475-484.
4. Turley E. The Control of Adrenocortical Cytodifferentiation by Extracellular Matrix. *Differentiation*. 1980; 17: 93-103.
5. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon, L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 4589-4592. DOI: 10.1074/jbc.R100038200
6. Moretto P., Karousou E., Viola M., Caon I., D'Angelo M.L., De Luca G., Passi A., Vigetti D. Regulation of Hyaluronan Synthesis in Vascular Diseases and Diabetes. *J. Diabetes Res.* 2015; 2015:167283 DOI: 10.1155/2015/167283
7. Matou-Nasri S., Gaffney J., Kumar S., Slevin M. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and

- gamma-adducin. *Int. J. Oncol.* 2009; 35: 761-773. DOI: 10.3892/ijo_00000389
8. Burdick J.A., Prestwich G.D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv. Mater.* 2011; 23: 41-56. DOI: 10.1002/adma.201003963
 9. Mero A., Campisi M. Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers.* 2014; 6: 346-369. DOI: 10.3390/polym6020346
 10. Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной аскорбиновой кислотой шитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на её основе. Патент РФ 2382050; 2008.
 11. Levesque M.C., Haynes B.F. Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF-alpha and is inhibited by IL-4 and IL-13. *The J. Immunol.* 1997; 159: 6184-6194.
 12. Croce M., Boraldi F., Quaglino D., Tiozzo R., Pasquali-Ronchetti I. Hyaluronan uptake by adult human skin fibroblasts in vitro. *Eur. J. Histochem.* 2009; 47: 63-74.
 13. Clark R.A., Alon R., Springer T.A. CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J. Cell Biol.* 1996; 134: 1075-1087.
 14. Röck K., Fischer K., Fischer J.W. Hyaluronan used for intradermal injections is incorporated into the pericellular matrix and promotes proliferation in human skin fibroblasts in vitro. *Dermatology (Basel, Switzerland).* 2010; 221(3): 219-228. DOI: 10.1159/000318905.
 15. Xu H., Ito T., Tawada A., Maeda H., Yamanokuchi H., Isahara K., Yoshida K., Uchiyama Y., Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 17308-17314. DOI: 10.1074/jbc.M112371200
 4. Turley E. The Control of Adrenocortical Cyto differentiation by Extracellular Matrix. *Differentiation.* 1980; 17: 93-103.
 5. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon, L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 4589-4592. DOI: 10.1074/jbc.R100038200
 6. Moretto P., Karousou E., Viola M., Caon I., D'Angelo M.L., De Luca G., Passi A., Vigezzi D. Regulation of Hyaluronan Synthesis in Vascular Diseases and Diabetes. *J. Diabetes Res.* 2015; 2015:167283 DOI: 10.1155/2015/167283
 7. Matou-Nasri S., Gaffney J., Kumar S., Slevin M. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and gamma-adducin. *Int. J. Oncol.* 2009; 35: 761-773. DOI: 10.3892/ijo_00000389
 8. Burdick J.A., Prestwich G.D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv. Mater.* 2011; 23: 41-56. DOI: 10.1002/adma.201003963
 9. Mero A., Campisi M. Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers.* 2014; 6: 346-369. DOI: 10.3390/polym6020346
 10. Volkov V.P., Zelenetskij A.N., Khabarov V.N., Seljanin M.A. Method for preparing modified ascorbic acid of cross-linked hyaluronan acid salt and based bioactive composition Invention № 2382 050 RU. 2008 (in Russian)
 11. Levesque M.C., Haynes B.F. Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF-alpha and is inhibited by IL-4 and IL-13. *The J. Immunol.* 1997; 159: 6184-6194.
 12. Croce M., Boraldi F., Quaglino D., Tiozzo R., Pasquali-Ronchetti I. Hyaluronan uptake by adult human skin fibroblasts in vitro. *Eur. J. Histochem.* 2009; 47: 63-74.
 13. Clark R.A., Alon R., Springer T.A. CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J. Cell Biol.* 1996; 134: 1075-1087.
 14. Röck K., Fischer K., Fischer J.W. Hyaluronan used for intradermal injections is incorporated into the pericellular matrix and promotes proliferation in human skin fibroblasts in vitro. *Dermatology (Basel, Switzerland).* 2010; 221(3): 219-228. DOI: 10.1159/000318905.
 15. Xu H., Ito T., Tawada A., Maeda H., Yamanokuchi H., Isahara K., Yoshida K., Uchiyama Y., Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 17308-17314. DOI: 10.1074/jbc.M112371200

References

1. Khabarov V.N., Boykov P.Y., Selyanin M.A. *Hyaluronic Acid: Production, Properties, Application in Biology and Medicine.* Wiley, 2015. 216 p.
2. Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007; 23: 435-461. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337
3. Underhill C.B., Toole B.P. Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells. *J. Cell Biol.* 1979; 82: 475-484.

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Зайченко Данила Михайлович — младший научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Хабаров Владимир Николаевич — кандидат химических наук, руководитель реализации научно-исследовательских программ АНО «Научно-исследовательский центр гиалуроновой кислоты»

Михайлова Наталья Павловна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры кожных болезней и косметологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; научный руководитель Группы компаний «Мартинекс»

Тявин Дмитрий Юрьевич — руководитель отдела хондрорепаляции Группы компаний «Мартинекс»

Селянин Михаил Анатольевич — Президент Группы компаний «Мартинекс»

Соколовская Алиса Анатольевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт патологии и патофизиологии»

Кубатиев Аслан Амирханович — доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации