

## СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА I ТИПА И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

**© И. И. Гин (Ермакова),<sup>1</sup> Е. А. Лутцева (Вершиевская), И. В. Воронкина**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

*<sup>1</sup> электронный адрес: irinabiochem@mail.ru*

Разработка биоматериалов для регенеративной медицины с использованием гиалуроновой кислоты (ГК) осложняется легкой растворимостью ГК в водных растворах. Это влечет за собой низкую устойчивость скаффолдов на ее основе и поиск швивок, с помощью которых можно ее повысить. В настоящей работе изучена способность фибронектина и фибробластов кожи человека стабилизировать гели, состоящие из коллагена I типа и нативной высокомолекулярной ГК. Стабильность гелей оценивали по степени диффузии ГК из гелей в буферные растворы. Кроме того, анализировали устойчивость ГК и ГК-содержащих гелей к действию эмбриональной телячей сыворотки (FSC) и показали, что гиалуронидаза сыворотки не разрушает ГК в условиях эксперимента. Показано, что ГК диффундирует в буферный раствор из коллагенового геля в течение 1—3 сут. Инкубация в питательной среде гелей на основе коллагена и ГК, содержащих фибронектин или фибробласти, не приводит к сохранению большего количества ГК в таких гелях по сравнению с контрольным гелем без добавок. Однако гели, содержащие одновременно и фибронектин, и фибробласти, после инкубации в питательной среде сохраняют больше ГК (по оценке с помощью окраски альциановым синим). Кроме того, с помощью агарозного электрофореза показано, что среди, кондиционированные фибробластами, заключенными в коллагеновый гель с ГК и фибронектином, содержат ГК, отличающуюся от исходно внесенной в гель наличием дополнительной более высокомолекулярной фракции. Сделан вывод о том, что коллагеновые гели, содержащие ГК, нестабильны в буферных растворах, однако фибробласти кожи человека, внесенные в гель вместе с фибронектином, синтезируют повышенное количество ГК и отчасти восполняют убыль ГК из геля в результате ее диффузии.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, скаффолд, коллаген I типа, гиалуроновая кислота, фибронектин, фибробласти.

**Принятые сокращения:** ВКМ — внеклеточный матрикс, ГК — гиалуроновая кислота, смесь ФСУ — смесь формалина, спирта и уксусной кислоты, ПФА — параформальдегид, FCS — эмбриональная телячья сыворотка, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

На базе Отдела клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) разработаны эквиваленты кожи человека на основе коллагена I типа из сухожилий крысиных хвостов, которые используются для лечения ожоговых ран и трофических язв (Юдинцева и др., 1999; Андреев и др., 2013). Модификация таких гелей с помощью гиалуроновой кислоты (ГК) позволила бы улучшить их эффективность в отношении скорости заживления ран и снизить риск образования патологических рубцов.

ГК — это неотъемлемый компонент внеклеточного матрикса любой ткани (Evanko et al., 2007; Dicker et al., 2014). Молекулы ГК состоят из повторяющихся дисахаридных звеньев N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты. ГК удерживает влагу в ткани, придает ей упругость, обладает антиадгезивными свойствами, стимулирует пролиферацию и миграцию клеток (Docherty et al., 1989; Evanko et al., 1999, 2007; D'Agostino et al., 2015). Работы по исследованию роли ГК в регенерации ткани ведутся давно, и интерес к этой теме не угасает (Iocono et al., 1998; Hu et al., 2003; Tang et al., 2008; Aya, Stern, 2014). Доказано, что ГК способствует замедлению

развития артроза (Tang et al., 2008). В экспериментах на мышах показана эффективность ГК в лечении кожных ран: нити швивой ГК значительно ускоряют заживление раны, ослабляют фиброз в области повреждения (Hu et al., 2003). Показано, что ГК влияет на фибрilllogenез коллагена как *in vivo*, так и *in vitro*, что может быть важно в контексте безрубцового заживления ран. Так, при введении ГК в рану образуется тонкая кружевоподобная структура коллагеновых волокон вместо толстых коллагеновых пучков, которые образуются в присутствии гиалуронидазы, расщепляющей ГК (Iocono et al., 1998). В экспериментах *in vitro* (Docherty et al., 1989) показано, что коллагеновые гели, содержащие ГК, состоят из более упорядоченных фибрилл по сравнению с гелями без ГК, при этом миграция фибробластов в такие гели значительно повышается.

Таким образом, использование ГК в регенеративной медицине имеет большой потенциал, в частности при сочетании с коллагеном (Kreger, Voytik-Harbin, 2009; Van der Smissen et al., 2011; Hempel et al., 2012; Mathews et al., 2014, 2015). Скаффолд, полученный из коллагена I типа в

результате перевода кислого раствора этого белка в нейтральный раствор с физиологической ионной силой, представляет собой относительно стабильный гель, который теряет незначительное количество коллагена при инкубации таких гелей в растворе PBS (Hempel et al., 2012). С другой стороны, ГК хорошо растворима в воде и, следовательно, может диффундировать из коллагенового геля как в процессе инкубации гелей в буферных растворах, так и непосредственно в ране. Можно удержать ГК в составе коллагенового геля с помощью ковалентной сшивки, однако такие сшивки зачастую оказываются токсичными для клеток (Ibusuki et al., 2007; Yang et al., 2014). Кроме того, биодоступность химически сшитой и нативной ГК может различаться.

В настоящей работе исследовали возможность удержать ГК в геле не за счет ковалентных сшивок, а с помощью специфического взаимодействия ГК с белками. Так, например, известно, что ГК взаимодействует с гепарин- и фибринсвязывающим доменом на N-концевом участке фибронектина (Nakamura et al., 1994). С другой стороны, фибронектин — как плазменный, так и клеточный — связывается с коллагеном I типа (Engvall, Ruoslahti, 1977). Можно предположить, что фибронектин будет служить линкером между ГК и коллагеном и сможет стабилизировать гель, содержащий эти компоненты ВКМ. Фибробласты кожи человека взаимодействуют с ГК посредством рецепторов CD44 и RHAMM (Groce et al., 2003; Tolg et al., 2006; Dicker et al., 2014), благодаря которым эти клетки теоретически могли бы связать и удержать ГК в коллагеновом геле.

Таким образом, цель настоящей работы — изучить эффективность использования фибронектина и фибробластов кожи человека для стабилизации ГК-содержащих коллагеновых гелей.

## Материал и методика

В работе использовали коллаген I типа, выделенный из сухожилий крысиных хвостов (Chandrakasan et al., 1967); фибронектин, выделенный из плазмы крови человека (Ruoslahti et al., 1982); натриевую соль гиалуроновой кислоты бактерий *Streptococcus equi* с мол. массой  $(1.5\text{--}1.8)\cdot 10^6$  Да (Fluka, 53747, Чехия); эмбриональную телячью сыворотку (FCS), культуральную среду DMEM, растворы трипсина и ЭДТА, раствор PBS (Биолот, Россия); флаконы для культивирования (Sarstedt, Германия); гиалуронидазу семенной жидкости, гиалуронидазу бактерий *Streptomyces hyalurolyticus*, ПФА, Stains-All и альциановый синий (Sigma-Aldrich, США).

Фибробlastы дермы человека были любезно предоставлены сотрудником Лаборатории биологии клетки в культуре Института цитологии РАН Н. М. Юдинцевой. Клетки культивировали при 37 °C в среде DMEM, содержащей 10 % FCS, во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Общая схема изучения стабильности гелей на основе коллагена и ГК. Растворы 10-кратного PBS, 1 M NaOH, 5 мг/мл коллагена в 0.0017 M CH<sub>3</sub>COOH и 5 мг/мл ГК в PBS последовательно смешивали на льду, с тем чтобы получить нейтральный раствор для полимеризации, содержащий 2 мг/мл коллагена и 1 или 2 мг/мл ГК. Кроме того, в ряде случаев к указанным растворам добавляли фибронектин и дермальные фибробласты. Готовые для полимеризации охлажденные рас-

творы переносили в 48-луночный (300 мкл на лунку) или 96-луночный (150 мкл на лунку) планшет, который выдерживали при 37 °C в течение 1 ч. После полимеризации гели переносили из 48-луночного в 24-луночный планшет и добавляли раствор PBS; к гелям в 96-луночном планшете после полимеризации добавляли раствор PBS или культуральную среду DMEM. Через несколько суток раствор или среду над гелями собирали, а гели фиксировали 4%-ным раствором ПФА в течение 2 ч с последующей отмыvkой от фиксатора. Содержание ГК в гелях оценивали с помощью окраски альциановым синим, специфичным в отношении кислых полисахаридов, с последующим анализом оптической плотности окрашенных гелей. Анализ ГК, которая диффундировала из гелей в раствор или среду над гелями, проводили с помощью модифицированного протокола определения уроновых кислот по Дише (Bitter, Muir, 1962) или с помощью агарозного электрофореза (Lee, Cowman, 1994).

Диффузия ГК из коллагеновых гелей. Коллагеновые гели объемом 300 мкл, содержащие ГК, инкубировали в PBS в течение 4 сут. Через 1 ч, 1, 2, 3 и 4 сут из раствора над гелями брали пробы равного объема для анализа концентрации ГК (Bitter, Muir, 1962). Для каждой временной точки готовили по несколько гелей (в 2—3 повторностях). Пробы для анализа отбирали каждый раз из новой лунки.

Коллагеновые гели объемом 150 мкл, содержащие ГК и фибронектин, инкубировали в PBS в течение 2 сут, заменяя раствор PBS на свежий через 1 сут. Затем PBS удаляли, а содержание ГК в гелях оценивали по интенсивности окраски гелей альциановым синим.

Устойчивость ГК к FCS. Пробы объемом 12—16 мкл, содержащие 0.6—1.25 мг/мл ГК, инкубировали при 37 °C в течение разных промежутков времени в присутствии FCS (в питательной среде DMEM), гиалуронидазы бактерий *Streptomyces hyalurolyticus* (в буфере ТАЕ, pH 7.6) или гиалуронидазы семенной жидкости (в буфере TBS, pH 7.4). Ферменты использовали в качестве положительного контроля ферментативного гидролиза. Пробы, содержащие ГК, после обработки ферментами или FCS анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Коллагеновые гели объемом 150 мкл, содержащие 1 мг/мл ГК, инкубировали в течение 3 сут в PBS или в PBS с добавлением 10 % FCS. Содержание ГК, оставшейся в гелях, оценивали по интенсивности окраски гелей альциановым синим.

Культивирование дермальных фибробластов в гелях, содержащих коллаген, ГК и фибронектин. Для приготовления гелей с клетками вместо 10-кратного PBS использовали 10-кратную среду M199. Суспензию дермальных фибробластов в среде M199 вносили в готовые для полимеризации растворы, так чтобы конечная концентрация клеток в геле была равна 30 тыс. кл./мл. Были приготовлены гели объемом 150 мкл на основе 2 мг/мл коллагена и содержащие 1 мг/мл ГК и 20 мкг/мл фибронектина. После полимеризации часть гелей фиксировали и окрашивали, другую часть гелей инкубировали в 150 мкл DMEM, содержащей или не содержащей 2 % FCS, в течение 4 сут. Затем кондиционированные среды над гелями собирали, а гели окрашивали. Кондиционированные среды обрабатывали этанолом (в соотношении 1 : 3) на холде в течение 1 ч для осаждения ГК, центрифугировали 30 мин при 12 000 g и 4 °C, осадок растворяли в буфере для проб и

проводили агарозный электрофорез. Для сравнения ГК кондиционированных сред с исходной ГК на одну из дорожек агарозного геля наносили 40 мкг ГК, маточный раствор которой (5 мг/мл) использовали для приготовления коллагеновых гелей.

Определение содержания ГК в коллагеновых гелях с помощью альцианового синего. После отмычки от фиксатора гели окрашивали 0.25%-ным альциановым синим в 3%-ной ледяной уксусной кислоте в течение ночи при комнатной температуре (Kreger, Voigt-Harbin, 2009). После окраски гели отмывали 3%-ной ледяной уксусной кислотой в течение нескольких суток на шейкере, периодически меняя отмывочный раствор, до тех пор пока контрольные гели, содержащие только коллаген, не становились бесцветными. Затем отмывочный раствор удаляли и измеряли оптическую плотность гелей при 570 нм.

Электрофорез в агарозном геле. К растворам, содержащим ГК, добавляли 6-кратный буфер для проб (Fermentas, R0611, Литва); осажденную этанолом ГК растворяли в том же буфере, разведенном в 6 раз. Электрофорез ГК проводили согласно описанному протоколу (Lee, Cowman, 1994). Концентрация агарозы в геле составляла 0.5 %. Электрофорез проводили в течение ночи при 25 mA и 4 °C. Затем агарозный гель окрашивали альциановым синим (0.5 % в 2%-ной уксусной кислоте в течение 30 мин и отмывали 2%-ной уксусной кислотой в течение 1 сут) или Stains-All (0.005 % в 50%-ном этаноле в течение 6 ч и отмывали в течение 1 сут водой).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Excel 2010 (MS Corporation, США). Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок средних. Статистическую достоверность различий между пробами (от 2 до 5 в одном эксперименте) оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.05$ .

## Результаты

Стабильность гелей из коллагена и ГК в PBS. Коллагеновые гели, содержащие ГК в физиологической концентрации (1—2 мг/мл), инкубировали в PBS разного объема в течение нескольких суток, моделируя тем самым контакт трансплантата, приготовленного из таких гелей, с раневой жидкостью в условиях *in vivo*. Мы показали, что ГК диффундирует из коллагеновых гелей, при этом скорость диффузии растет с увеличением объема раствора PBS (рис. 1, *a*—*c*). Так, концентрация ГК в PBS почти достигает равновесной уже через 1 сут в случае 2 мл PBS для геля, содержащего 1 мг/мл ГК (рис. 1, *a*), в то время как в случае вдвое меньшего объема PBS с той же концентрацией ГК равновесие наступает через 3 сут (рис. 1, *b*). Концентрация ГК выравнивается в геле и в PBS через 2 сут, если взять 2 мл PBS и гель, содержащий 2 мг/мл ГК (рис. 1, *c*).

Известно, что фибронектин связывается специфично как с ГК, так и с коллагеном (Engvall, Ruoslahti, 1977; Nakamura et al., 1994). Мы предприняли попытку использовать фибронектин, для того чтобы удержать ГК в составе коллагенового геля и снизить тем самым диффузию ГК из геля в окружающий раствор. Гели на основе коллагена и ГК, содержащие разные концентрации фибронектина, инкубировали в PBS в течение 2 сут, после чего содержа-

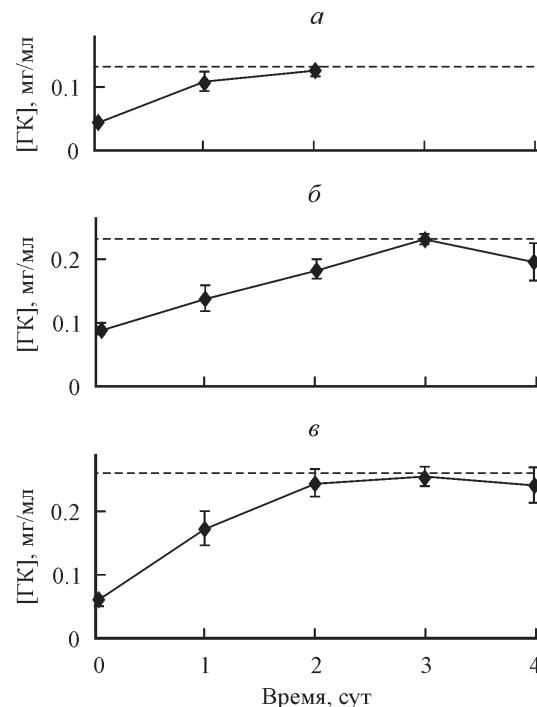


Рис. 1. Диффузия гиалуроновой кислоты (ГК) из коллагенового геля в раствор PBS.

Концентрация ГК и объем PBS над гелем: *a* — 1 мг/мл ГК, 2 мл PBS; *b* — 1 мг/мл ГК, 1 мл PBS; *c* — 2 мг/мл ГК, 2 мл PBS. Концентрация коллагена I типа 2 мг/мл. Штриховая линия — рассчитанная равновесная концентрация ГК. Число повторностей (*n*) = 2—3.

ние ГК в гелях оценивали по интенсивности окраски гелей альциановым синим (рис. 2). Чтобы снизить вероятность разрушения гелей в процессе окраски и отмычки, гели фиксировали перед окрашиванием. Предварительно был подобран фиксатор — 4%-ный ПФА, который дал лучшие результаты, чем смесь ФСУ, используемая для фиксации ДНК и полисахаридов. Гели, фиксированные в 4%-ном ПФА и окрашенные альциановым синим, визуально были более яркими по сравнению с гелями, фиксированными ФСУ. Показано, что добавление фибронектина к гелям на основе коллагена и ГК не влияет на способность гелей удерживать ГК (рис. 2, *a*). Так, интенсивность окраски гелей с фибронектином разных концентраций после инкубации в PBS не отличалась от интенсивности окраски гелей без фибронектина (рис. 2, *b*). В противном случае гели с фибронектином сохранили бы больше ГК и были бы окрашены интенсивнее.

Действие FCS на ГК и гели, состоящие из коллагена и ГК. Прежде чем приступить к экспериментам с фибробластами, мы проанализировали действие эмбриональной сыворотки на ГК. Известно, что в сыворотке крови содержится гиалуронидаза, которая может разрушать ГК (Fiszer-Szafarz, 1984), следовательно, культивирование фибробластов в коллагеновых гелях, содержащих ГК, несет угрозу разрушения гелей из-за наличия FCS в питательной среде для клеток.

Целостность ГК после обработки FCS анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле с последующей окраской гелей альциановым синим или Stains-All (рис. 3). Было показано, что интактная ГК диффузно распределяется вдоль дорожки агарозного геля и образует длинный шлейф (из-за неоднородности массы и заряда молекул). Обработка ГК бактериальной гиалуронидазой

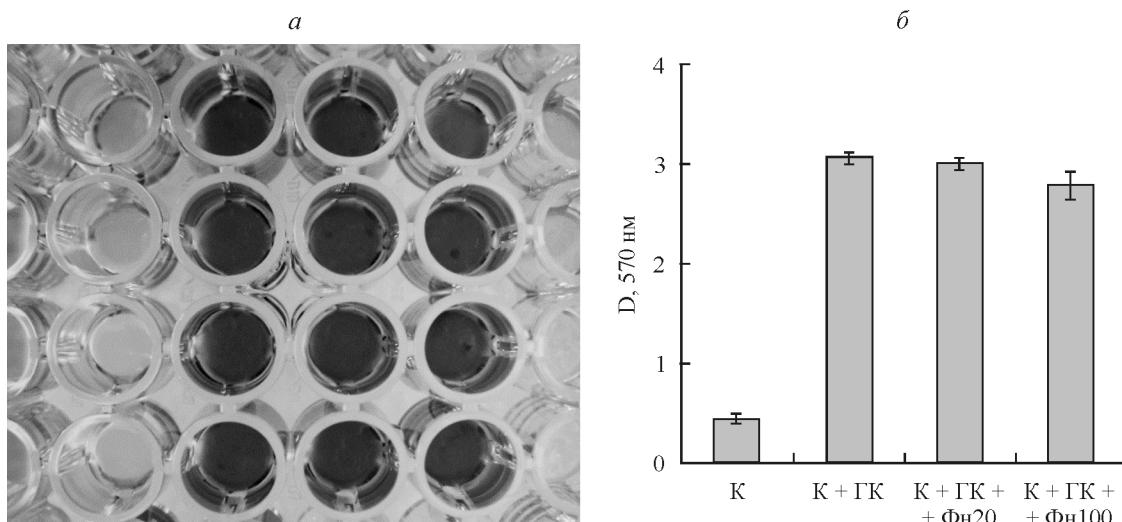
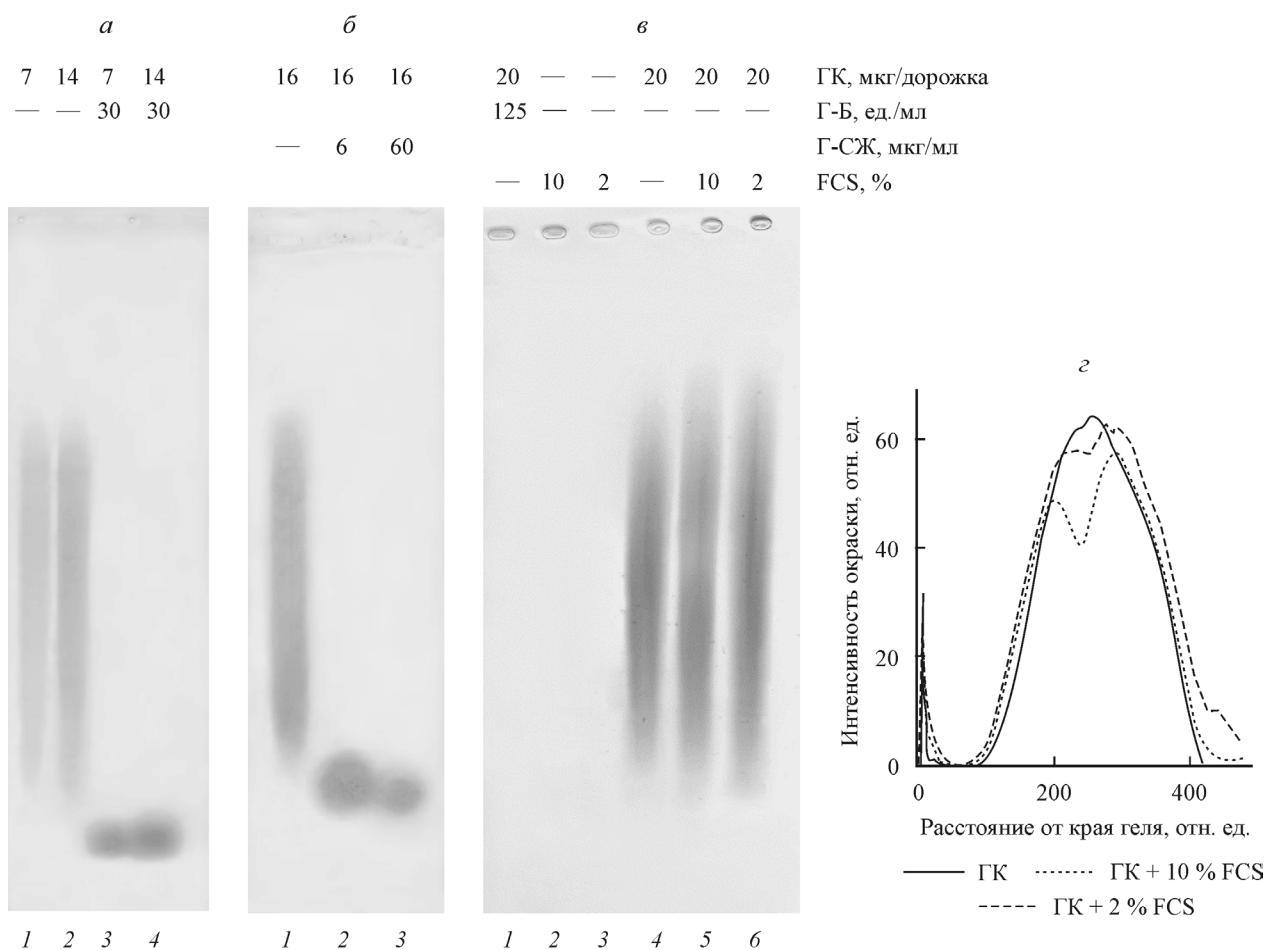


Рис. 2. Влияние фибронектина на стабильность коллагеновых гелей, содержащих ГК.

*a* — коллагеновые гели разного состава, помещенные в раствор PBS на 2 сут с одной сменой раствора; окраска альциановым синим; *б* — оптическая плотность D этих же гелей. Состав гелей: K — 2 мг/мл коллагена; K+ГК — 2 мг/мл K + 1 мг/мл ГК; K+ГК+Фн20 — 2 мг/мл K + 1 мг/мл ГК + 20 мкг/мл фибронектина; K+ГК+Фн100 — 2 мг/мл K + 1 мг/мл ГК + 100 мкг/мл Фн. n = 4.



*а, б* — ферментативный гидролиз в течение 1 ч; *в* — ферментативный гидролиз и обработка сывороткой в течение 1 сут; *г* — денситометрия электрофорограммы на рис. 3. *в*, *г* — окраска альциановым синим (*а, б*) или Stains-All (*в*). Объем пробы на 1 дорожку — 12 (*а*) или 16 (*б, в*) мкл. Цифры над дорожками электрофорограмм обозначают компоненты смеси и их концентрации.

(рис. 3, а) или гиалуронидазой семенной жидкости (рис. 3, б) в течение короткого промежутка времени (1 ч) приводит к образованию низкомолекулярных фрагментов ГК, которые окрашиваются в виде пятен, расположенных ниже шлейфа интактной ГК (рис. 3, а, дорожки 3, 4; рис. 3, б, дорожки 2, 3). Более длительная обработка ГК (в течение 1 сут) бактериальной гиалуронидазой более высокой концентрации, видимо, приводит к полному расщеплению ГК, в результате чего дорожка в геле не окрашивается (рис. 3, в, дорожка 1). Таким образом, после обработки ГК гиалуронидазами и разделения продуктов ферментативного расщепления в агарозном геле мы либо видим низкомолекулярные фрагменты, либо не видим ничего. В то же время сыворотка почти не влияет на характер окраски ГК: интенсивность окраски и длина шлейфа ГК почти не меняются в присутствии FCS (рис. 3, в, дорожки 5, 6) по сравнению с буфером без сыворотки (рис. 3, в, дорожка 4). Это указывает на то, что ГК не разрушается под действием FCS в условиях эксперимента. Однако характер окраски ГК в образцах, обработанных сывороткой, все же незначительно меняется: в центральной части шлейфа ГК появляется слабоокрашенная зона (рис. 3, в, дорожки 5, 6). Денситометрия электрофоретических полос ГК подтверждает визуальные наблюдения (рис. 3, г): сыворотка не влияет на ширину и положение кривых, описывающих профиль полос ГК, однако на месте пика ГК появляется провал, который дает два новых пика. Это явление выражено тем сильнее, чем больше концентрация сыворотки (рис. 3, г).

Мы изучили также устойчивость коллагеновых гелей, содержащих ГК, к действию FCS и получили различие в интенсивности окраски альциановым синим (рис. 4): гели, обработанные буфером с FCS, окрашивались менее интенсивно по сравнению с гелями, обработанными буфером без сыворотки ( $P < 0.01$ ). Это может указывать либо на то, что в гелях остается меньше ГК в присутствии FCS, либо на то, что компоненты сыворотки препятствуют взаимодействию красителя с ГК. Поскольку эксперименты с сывороткой дали неоднозначные результаты, в экспериментах с фибробластами мы понизили концентрацию сыворотки в питательный среде для клеток до 2 %, чтобы уменьшить потенциальную угрозу разрушения ГК под действием FCS.

**Влияние дермальных фибробластов на стабильность коллагеновых гелей, содержащих ГК.** Использование культуральной среды, необходимой для поддержания нормальной жизнедеятельности клеток, вместо PBS сделало невозможным измерение концентрации ГК, диффундирующющей в раствор для инкубации, с помощью реакции Дише из-за глюкозы, входящей в состав сред для культивирования клеток и также вступающей в реакцию Дише (Bitter, Muir, 1962). Поэтому мы ограничились окраской гелей и электрофорезом кондиционированных сред. На рис. 5, а представлена оптическая плотность гелей, окрашенных альциановым синим сразу после приготовления гелей, до инкубации в питательной среде, а на рис. 5, б — после инкубации в питательной среде. Показано, что содержание ГК в гелях после инкубации в среде по сравнению с исходными гелями падает примерно в 2 раза из-за диффузии ГК в среду (рис. 5, а, б). При этом наличие клеток в составе гелей не препятствует диффузии ГК: гели, содержащие коллаген и

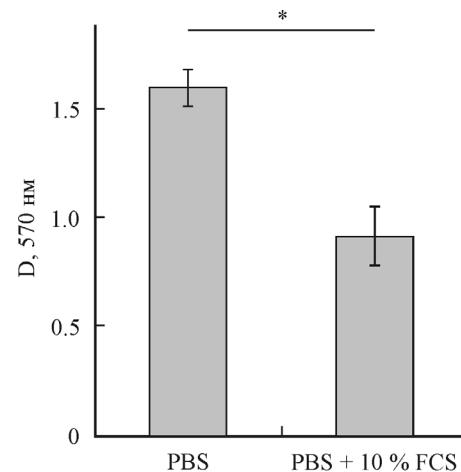


Рис. 4. Влияние эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) на стабильность гелей из коллагена и ГК.

Оптическая плотность D гелей, окрашенных альциановым синим после инкубации в PBS и в PBS, содержащем 10 % FCS, в течение 3 сут; звездочкой показана достоверность различия при  $P < 0.01$  ( $n = 4$ ).

ГК, не различаются по интенсивности окраски в присутствии клеток и без них (рис. 5, б, К + ГК). Однако при добавлении фибронектина гели, содержащие клетки, окрашиваются интенсивнее ( $P < 0.01$ ) по сравнению с гелями без клеток (рис. 5, б, К + ГК + Фн). Это может свидетельствовать либо о том, что совместное использование фибробластов и фибронектина позволяет эффективнее удерживать ГК в коллагеновых гелях, либо о том, что фибронектин стимулирует синтез ГК фибробластами. Электрофоретический анализ ГК (рис. 5, в), осажденной из сред над гелями, указывает на второй вариант. Так, все полосы ГК на электрофореграмме примерно одинаковы по положению, интенсивности и площади и сравнимы с контрольной ГК. И только две последние дорожки, соответствующие гелям, содержащим и фибронектин, и клетки, различаются: они содержат высокомолекулярную фракцию ГК, которой нет в остальных пробах (рис. 5, в, стрелки). Очевидно, что этой фракции ГК изначально не было — она появилась благодаря клеткам. Денситометрия описанной выше электрофореграммы представлена графически (рис. 5, г): гели с клетками и без них объединены попарно и дополнены кривой, отображающей контрольную ГК. Кривые, соответствующие двум последним дорожкам электрофореграммы (гели с клетками и с фибронектином), отличаются от всех остальных кривых наличием плача в высокомолекулярной области, которое указывает на примесь еще одной фракции ГК (рис. 5, г, стрелки). Кривые, соответствующие гелям с клетками, но без фибронектина, такого плача не образуют, следовательно, фибронектин стимулирует синтез ГК самими фибробластами. Сыворотка, входящая в состав питательной среды в количестве 2 %, не обладает подобным стимулирующим эффектом на синтез ГК фибробластами, поскольку содержание ГК в среде над гелями не меняется (рис. 5, в). Более того, содержание ГК в коллагеновых гелях падает под действием 2 % FCS, поскольку падает интенсивность окраски гелей альциановым синим (рис. 5, б, К + ГК, К + ГК + Фн). Это явление повторяет ранее обнаруженный эффект 10 % FCS в отношении интенсивности окраски коллагеновых гелей, содержащих ГК (рис. 4).

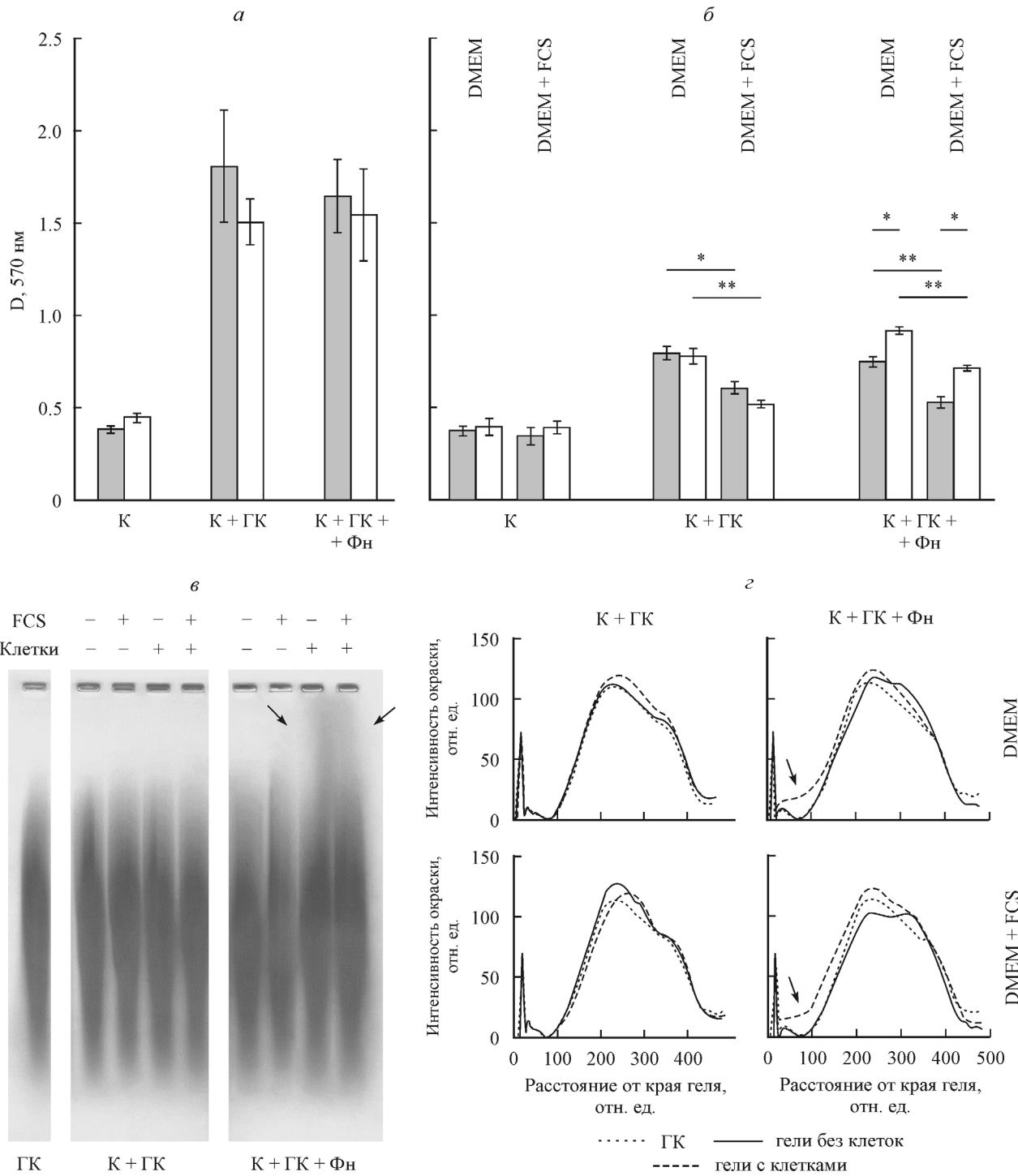


Рис. 5. Влияние фибробластов и фибронектина на стабильность коллагеновых гелей, содержащих ГК.

*a, б* — оптическая плотность  $D$  гелей, окрашенных альциановым синим, до (*a*) и после (*б*) инкубации в среде DMEM. Темные столбцы — гели без фибробластов, светлые столбцы — гели, содержащие фибробlastы. Над столбцами (*б*) указан состав среды над гелями; подписи под столбцами (*а, б*) указывают состав гелей (К — коллаген, ГК — гиалуроновая кислота, Фн — фибронектин). *в* — электрофорез в агарозном геле проб ГК, осажденных этианолом из среды над гелями; окраска Stains-All. *г* — денситометрия электрофореграммы. Стрелками (*в, г*) указана высокомолекулярная фракция ГК, синтезированной клетками. Достоверность различий показана одной звездочкой (при  $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ) или двумя (при  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ ).

## Обсуждение

Для приготовления дермальных эквивалентов кожи мы использовали отработанный в нашей лаборатории протокол, согласно которому концентрация коллагена I типа в геле составляет 2 мг/мл (Андреев и др., 2013). Со-

держание ГК в коллагеновых гелях мы выбрали по результатам анализа данных из литературы (Docherty et al., 1989; Freund et al., 1993; Fraser et al., 1997). Концентрация ГК в дерме взрослого человека составляет 0.2 мг/мл (Fraser et al., 1997), при этом в фетальной коже содержится повышенное количество ГК, что коррелирует с беззубко-

вым заживлением ран (Freund et al., 1993). Исследование влияния разных концентраций ГК (от 0 до 2 мг/мл) на инвазию фибробластов в коллагеновый гель показало, что фибробlastы развиваются наибольшую подвижность в геле в присутствии 1 мг/мл ГК, при этом более выраженный эффект наблюдался в случае более высокомолекулярной ГК (Docherty et al., 1989). Руководствуясь перечисленными данными, в большинстве экспериментов мы использовали 1 мг/мл высокомолекулярной ГК.

Изучение стабильности коллагеновых гелей, содержащих ГК, в буферных растворах показало, что ГК диффундирует из коллагенового геля до тех пор, пока не установится равновесие концентраций в геле и в растворе. Это происходит через 1—3 сут в зависимости от концентрации ГК в геле и объема раствора. В литературе есть данные, указывающие на нестабильность ГК-содержащих коллагеновых гелей. Так, было показано (Hempel et al., 2012), что инкубация коллагеновых гелей, содержащих сульфатированные производные ГК, в растворе PBS приводит к снижению концентрации ГК в геле до равновесного значения в течение 1 ч. Ускорение вымывания ГК из гелей по сравнению с нашими результатами можно объяснить значительно меньшей молекулярной массой производных ГК и меньшей концентрацией как коллагена I типа, так и ГК. В другой работе по сравнению влияний экзогенной и эндогенной ГК на способность гладкомышечных клеток сокращать коллагеновый гель (Allison et al., 2009) экзогенную ГК вносили не только в гель, но и в культуральную среду, видимо для того, чтобы избежать уменьшения концентрации ГК в геле в результате диффузии. Действительно, этим способом можно решить проблему диффузии ГК *in vitro*, однако *in vivo* трансплантат, содержащий ГК, будет быстро истощаться.

Мы исследовали возможность удержать ГК в геле с помощью фибронектина плазмы крови человека. Эта идея основана на работе, в которой показано, что ГК усиливает адгезию клеток эпителия роговицы к фибронектину плазмы крови и не влияет на адгезию этих клеток к другим белкам ВКМ (Nakamura et al., 1994). С помощью антител и аффинной хроматографии было найдено, что ГК взаимодействует с гепарин- и фибринсвязывающим доменом на N-концевом участке фибронектина (Nakamura et al., 1994). С другой стороны, известно, что фибронектин связывается с коллагеном I типа (Engvall, Ruoslahti, 1977). Таким образом, существует вероятность стабилизировать гель, содержащий ГК, с помощью фибронектина, связывающего ГК, и коллаген. Однако мы показали, что для удержания ГК в коллагеновом геле, помещенном в раствор PBS в течение 2 сут, фибронектин неэффективен. Возможно, эффективность взаимодействия этих биомолекул зависит от условий приготовления и инкубации гелей. Так, например, было показано, что для взаимодействия фибронектина плазмы крови с ГК необходимы двухвалентные катионы (Turley et al., 1985). Мы учли эту особенность и при проведении экспериментов с фибробластами во все гели добавляли одинаковое количество среды M199, содержащей ионы кальция и магния, при этом гели инкубировали в среде DMEM, также содержащей эти катионы. Тем не менее мы показали, что и в этом случае ГК не удерживается фибронектином в коллагеновом геле.

Добавление фибробластов в коллагеновый гель без фибронектина также не стабилизирует гели с ГК. Однако в присутствии как клеток, так и фибронектина наблюдаются усиление окраски гелей альциановым синим и появ-

ление на электрофорограмме более высокомолекулярной ГК. Эта высокомолекулярная фракция ГК, отсутствующая в экзогенной ГК, исходно внесенной в коллагеновый гель, может иметь только клеточное происхождение, что означает стимуляцию фибронектином синтеза ГК фибробластами, заключенными в гель. В литературе есть данные о том, что фибронектин влияет на продукцию ГК. Так, показано, что культивирование мезангимальных клеток в составе кора почечных клубочков в присутствии фибронектина плазмы крови человека вызывает увеличение в несколько раз содержания ГК в кондиционированной среде (Dunlop et al., 1996). Наши данные впервые показали, что фибробласты кожи человека в составе коллагенового геля производят повышенное количество ГК под действием фибронектина. Этот эффект может быть использован для пролонгирования терапевтического действия ГК-содержащего трансплантата.

При проведении экспериментов с клетками гели на основе коллагена I типа и ГК инкубировали не в PBS, а в питательной среде DMEM. Каждый раз, когда в питательную среду добавляли FCS, гели получались с более низкими значениями интенсивности окрашивания альциановым синим, специфичным в отношении ГК. Мы предположили, что сыворотка может оказывать такое действие за счет гиалуронидазы, которая разрушает ГК в коллагеновых гелях. Так, если коллагеновые гели, содержащие ГК, обработать гиалуронидазой семенной жидкости в течение 2 ч при 37 °C, то такие гели перестают окрашиваться альциановым синим (Kreger, Voytik-Harbin, 2009). Гиалуронидаза сыворотки крови известна давно (Fiszer-Szafarz, 1984). Она активна в узком диапазоне значений pH (в области 3.5) в отличие от гиалуронидазы бактерий и семенников, активность которых лежит в широком диапазоне значений pH с оптимумом при pH 6.0 (Fiszer-Szafarz, 1984; Ikegami-Kawai et al., 2004). Несмотря на то что уровень pH культуральной среды в наших экспериментах поддерживался нейтральным, необходимо было проверить, что гиалуронидаза эмбриональной сыворотки не разрушает ГК в условиях эксперимента. В результате было показано, что электрофоретическая подвижность ГК не меняется после действия FCS, и новые полосы, вызванные распадом ГК, не появляются, как в случае действия гиалуронидаз семенников и бактерий. Тот факт, что обработка сывороткой коллагеновых гелей, содержащих ГК, приводит к снижению интенсивности окраски таких гелей, по-видимому, является артефактом, как и локальное снижение интенсивности окраски полос ГК, полученных в результате обработки образцов ГК сывороткой и их электрофоретического разделения в агарозном геле.

Похожие артефакты окраски ГК были описаны ранее (Lee, Cowman, 1994). Авторы указанной работы анализировали ГК синовиальной жидкости и стекловидного тела с помощью агарозного электрофореза и обнаружили темные или, наоборот, светлые пятна вдоль полос ГК, окрашенных альциановым синим. Если пробы предварительно обрабатывали проназой, то эти артефакты не проявлялись, следовательно, их появление вызывала белковая составляющая образца. Логично предположить, что в нашем случае артефакты окраски также были вызваны белками, которыми богата FCS. Известно, например, что бычий сывороточный альбумин образует комплексы с ГК (Xu et al., 2000), что может стать препятствием для взаимодействия красителя, специфичного в отношении ГК, с этим полисахаридом. Таким образом, снижение интенсивности окраски коллагеновых гелей, содержащих ГК,

или окраски электрофоретических полос ГК не является следствием разрушения ГК гиалуронидазой сыворотки, а, по всей вероятности, происходит из-за комплексообразования между ГК и альбумином сыворотки, препятствующим взаимодействию этого анионного биополимера с катионными красителями, такими как альциановый синий или Stains-All.

Авторы глубоко признательны безвременно ушедшему из жизни проф. Г. П. Пинаеву, который был инициатором и руководителем данной работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068, руководитель Н. Н. Никольский).

### Список литературы

- Андреев Д. Ю., Абрамова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2013. Эффективность кожной пластики и дермального эквивалента в лечении обширных язв голени смешанного генеза. Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. 172 (1) : 104—107. (Andreev D. Yu., Abramova N. V., Blinova M. I., Pinaev G. P. 2013. Efficacy of dermoplasty and the dermal equivalent in treatment of vast leg ulcers of mixed genesis. Vestn. Khir. im. I. I. Grekov. 172 (1) : 104—107.)
- Юдинцева Н. М., Горелик Ю. В., Дьяконов И. Д., Калмыкова Н. В., Кухарева Л. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П., Парамонов Б. А. 1999. Использование дермального эквивалента кожи для заживления различных ран. Цитология. 41 (3/4) : 329. (Yudintseva N. M., Gorelik Yu. V., Dyakonov I. D., Kalmykova N. V., Kukhareva L. V., Blinova M. I., Pinaev G. P., Paramonov B. A. 1999. Skin dermal equivalent as a treatment of different wounds. Tsitologiya. 41 (3/4) : 329.)
- Allison D. D., Braun K. R., Wight T. N., Grande-Allen K. J. 2009. Differential effects of exogenous and endogenous hyaluronan on contraction and strength of collagen gels. Acta Biomater. 5 : 1019—1026.
- Aya K. L., Stern R. 2014. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. Wound Repair Regen. 22 : 579—593.
- Bitter T., Muir H. M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4 : 330—334.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6067.
- Croce M. A., Boraldi F., Quaglino D., Tiozzo R., Pasquali-Ronchetti I. 2003. Hyaluronan uptake by adult human skin fibroblasts in vitro. Eur. J. Histochem. 47 : 63—73.
- D'agostino A., Stellavato A., Busico T., Papa A., Tirino V., Pappuccio G., La Gatta A., De Rosa M., Schiraldi C. 2015. In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. BMC Cell Biol. 16 : 19.
- Dicker K. T., Gurski L. A., Pradhan-Bhatt S., Witt R. L., Farach-Carson M. C., Jia X. 2014. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. Acta Biomater. 10 : 1558—1570.
- Docherty R., Forrester J. V., Lackie J. M., Gregory D. W. 1989. Glycosaminoglycans facilitate the movement of fibroblasts through three-dimensional collagen matrices. J. Cell Sci. 92 : 263—270.
- Dunlop M. E., Clark S., Mahadevan P., Muggli E., Larkins R. G. 1996. Production of hyaluronan by glomerular mesangial cells in response to fibronectin and platelet-derived growth factor. Kidney Int. 50 : 40—44.
- Engvall E., Ruoslahti E. 1977. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. Int. J. Cancer. 20 : 1—5.
- Evanko S. P., Angello J. C., Wight T. N. 1999. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19 : 1004—1013.
- Evanko S. P., Tammi M. I., Tammi R. H., Wight T. N. 2007. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. Adv. Drug Deliv. Rev. 59 : 1351—1365.
- Fiszer-Szafarz B. 1984. Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. Anal. Biochem. 143 : 76—81.
- Fraser J. R., Laurent T. C., Laurent U. B. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J. Intern. Med. 242 : 27—33.
- Freund R. M., Siebert J. W., Cabrera R. C., Longaker M. T., Eidelman Y., Adzick N. S., Garg H. G. 1993. Serial quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in fetal sheep skin. Biochem. Mol. Biol. Int. 29 : 773—783.
- Hempel U., Hintze V., Moller S., Schnabelrauch M., Scharnweber D., Dieter P. 2012. Artificial extracellular matrices composed of collagen I and sulfated hyaluronan with adsorbed transforming growth factor beta1 promote collagen synthesis of human mesenchymal stromal cells. Acta Biomater. 8 : 659—666.
- Hu M., Sabelman E. E., Cao Y., Chang J., Hentz V. R. 2003. Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 67 : 586—592.
- Ibusuki S., Halbesma G. J., Randolph M. A., Redmond R. W., Kochevar I. E., Gill T. J. 2007. Photochemically cross-linked collagen gels as three-dimensional scaffolds for tissue engineering. Tissue Eng. 13 : 1995—2001.
- Ikegami-Kawai M., Okuda R., Nemoto T., Inada N., Takahashi T. 2004. Enhanced activity of serum and urinary hyaluronidases in streptozotocin-induced diabetic Wistar and GK rats. Glycobiology. 14 : 65—72.
- Iocono J. A., Krummel T. M., Keefer K. A., Allison G. M., Paul H. 1998. Repeated additions of hyaluronan alters granulation tissue deposition in sponge implants in mice. Wound Repair Regen. 6 : 442—448.
- Kreger S. T., Voytik-Harbin S. L. 2009. Hyaluronan concentration within a 3D collagen matrix modulates matrix viscoelasticity, but not fibroblast response. Matrix Biol. 28 : 336—346.
- Lee H. G., Cowman M. K. 1994. An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. Anal. Biochem. 219 : 278—287.
- Mathews S., Bhonde R., Gupta P. K., Totey S. 2014. Novel biomimetic tripolymer scaffolds consisting of chitosan, collagen type I, and hyaluronic acid for bone marrow-derived human mesenchymal stem cells-based bone tissue engineering. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 102 : 1825—1834.
- Nakamura M., Mishima H., Nishida T., Otori T. 1994. Binding of hyaluronan to plasma fibronectin increases the attachment of corneal epithelial cells to a fibronectin matrix. J. Cell. Physiol. 159 : 415—422.
- Ruoslahti E., Hayman E. G., Pirschbacher M., Engvall E. 1982. Fibronectin: purification, immunochemical properties and biological activities. Meth. Enzymol. 82 : 803—830.
- Tang T., Muneta T., Ju Y. J., Nimura A., Miyazaki K., Masuda H., Mochizuki T., Sekiya I. 2008. Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats: protective effect of intraarticular hyaluronan injection. Arthritis Res. Ther. 10 : R13.
- Tolg C., Hamilton S. R., Nakrie K. A., Kooshesh F., Walton P., McCarthy J. B., Bissell M. J., Turley E. A. 2006. Rhamm<sup>-/-</sup> fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 motogenic signaling, leading to defective skin wound repair. J. Cell Biol. 175 : 1017—1028.
- Turley E. A., Erickson C. A., Tucker R. P. 1985. The retention and ultrastructural appearances of various extracellular matrix molecules incorporated into three-dimensional hydrated collagen lattices. Develop. Biol. 109 : 347—369.

*Van Der Smissen A., Hintze V., Scharnweber D., Moeller S., Schnabelrauch M., Majok A., Simon J. C., Anderegg U. 2011. Growth promoting substrates for human dermal fibroblasts provided by artificial extracellular matrices composed of collagen I and sulfated glycosaminoglycans. Biomaterials. 32 : 8938—8946.*

*Van Der Smissen A., Hoffmeister P. G., Friedrich N., Watarai A., Hacker M. C., Schulz-Siegmund M., Anderegg U. 2015. Artificial extracellular matrices support cell growth and matrix synthesis of human dermal fibroblasts in macroporous 3D scaffolds. J. Tissue Eng. Regen. Med. doi: 10.1002/term.2037.*

*Xu S., Yamanaka J., Sato S., Miyama I., Yonese M. 2000. Characteristics of complexes composed of sodium hyaluronate and bovine serum albumin. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 48 : 779—783.*

*Yang H., Tan Q., Zhao H. 2014. Progress in various crosslinking modification for acellular matrix. Chin. Med. J. (Engl.). 127 : 3156—3164.*

Поступила 2 XI 2015

## STABILITY OF THE GELS BASED ON TYPE I COLLAGEN AND HYALURONIC ACID

*I. I. Gin (Ermakova),<sup>1</sup> E. A. Luttseva (Vershevskaya), I. V. Voronkina*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

<sup>1</sup> e-mail: irinabiochem@mail.ru

Development of hyaluronic acid (HA) supplemented biomaterials for regenerative medicine is complicated with easy water solubility of HA. It results in decreased stability of HA-based scaffolds that, consequently, initiated search for crosslinking techniques intended to retain HA within a scaffold. In this study, gels composed of type I collagen and native high molecular weight HA were prepared and their stability in buffer solutions has been evaluated. Fibronectin and human dermal fibroblasts were incorporated into gels as biological linkages for HA instead of chemical agents. Gel stability was estimated based on HA diffusion toward a buffer solution. In addition, HA and HA-supplemented gels resistance to fetal calf serum (FSC) as a part of cultural media for fibroblasts has been studied and no degradation of HA by serum hyaluronidase has been detected under the experimental conditions. The results showed that HA diffuses from collagen gels within 1—3 days. Neither fibronectin nor fibroblasts added separately prevent HA diffusion. But if gels were inoculated with fibroblasts together with fibronectin, more HA was left in the gels according to alcian blue staining. Agarose gel electrophoresis has shown that conditioned media collected from such gels are enriched with HA that differs from the initial one in that it contains a new portion of HA with higher molecular weight. It is concluded that HA-supplemented collagen gels are not stable in buffer solutions but fibroblasts incorporated into such gels synthesize significant amount of HA under the influence of fibronectin and partly compensate the loss of HA due to diffusion.

**Key words:** tissue engineering, scaffold, type I collagen, hyaluronic acid, fibronectin, fibroblasts.