

ВПЛИВ N-КІНЦЕВОГО ДИСУЛЬФІДНОГО ВУЗЛА ФІБРИНУ НА НАГРОМАДЖЕННЯ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ В ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОМУ МАТРИКСІ КУЛЬТИВОВАНИХ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН

Показано, що під впливом N-кінцевого дисульфідного вузла фібрину стимулюється включення ¹⁴C-ацетату в гіалуронову кислоту перицелюлярного матриксу ендотеліальних клітин аорти кроля. Одночасно включення ¹⁴C-ацетату в гепарансульфат було зниженим, а в хондроїтинсульфат – збільшеним, що свідчить про перерозподіл синтезу сульфатованих глікозаміногліканів. Відсутність ефекту N-кінцевого дисульфідного вузла фібриногену в термінах включення ¹⁴C-ацетату в глікозаміноглікани дає змогу припустити, що ефект N-кінцевого дисульфідного вузла фібрину опосередкований через специфічну взаємодію VE-кадгеринів із Vβ15-42-послідовністю, що експонована у N-кінцевому дисульфідному вузлі фібрину.

На мембрані ендотеліальних клітин є рецептори, що забезпечують взаємодію між клітинами та клітин з матриксом, зокрема VE-кадгерини, що належать до трансмембранних глікопротеїнів і забезпечують гомотипічну міжклітинну адгезію. З цими рецепторами специфічно взаємодіють різні амінокислотні послідовності в молекулі фібрин(оген)у. Особливий інтерес ста-

новить послідовність Vβ15-42 фібрину, що взаємодіє з VE-кадгеринами [1]. Ця взаємодія забезпечує цілий ряд біологічних ефектів фібрину, у т. ч. регуляцію прикріплення, розпластання і руху ендотеліальних клітин [2]. Подібні фенотипічні зміни завжди взаємозалежні із змінами властивостей екстрацелюлярного матриксу, і насамперед його глікозаміногліканового компо-

нента [3]. Проте ефекти і механізми впливу продуктів деградації фібрин(оген)у, і зокрема В β 15-42-послідовності, на метаболізм глікозаміногліканів (ГАГ) ендотеліальних клітин не вивчено. Метою даної роботи було вивчення змін у нагромадженні різних груп ГАГ ендотеліального матриксу під впливом N-кінцевого дисульфідного вузла фібрину (NDSKII), що містить специфічну послідовність В β 15-42 в експонованому стані. Для цього було досліджено вплив NDSKII на нагромадження окремих груп ГАГ у зіставленні з ефектом NDSK (отриманого з фібриногену), в якому не експоновано послідовність В β 15-42. Ми також урахували можливі зміни в конфлюентній щільності ендотеліальних моношарів під дією обох чинників.

Матеріали і методи

Реактиви і препарати. Для забезпечення практичної частини роботи було використано такі реактиви фірми «Sigma»: середовище для культивування ендотеліальних клітин (DMEM/F12), середовище M199 без фенолового червоного, фактор росту ендотелію (ECGF), глютамін, пеніцилін, стрептоміцин, желатин, гепарансульфат, трипсин та інгібітор трипсину із сої, специфічні ферменти, що деградують ГАГ (хондроїтиназа АС), хлорид цетилпіридиніуму, інгібітори протеїнази. Сироватка для культивування (FCS) була від Gibco, Sephadex G-50 – від «Pharmacia», K-гіалуронова кислота була від «Fluka Chemie AG», проназа Е – від «Merck», ДЕАЕ-целюлоза (смн. 0,54) – «Serva», гепарини – від «Chematrol». 2-¹⁴С-ацетат Na (40,5 Сі/моль) був від «Ізотопу» (Росія). Усі інші використані реактиви були максимально доступної чистоти або проводилося додаткове очищення деяких реактивів перед їх використанням. Препарати NDSKII і NDSK були отримані в нашій лабораторії (бромціановим розщепленням) з плазми донорської крові [4]. Було використано ендотеліальні клітини аорти кроля, одержаних шляхом перфузії [5].

Культивування клітин

Вторинні культури вирощувалися на 0,1 % желатині в середовищі DMEM/F12: з 15 % FCS, з додаванням 2мМ глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину, 1000 нг/мл амфотерицину В, 1 % ECGF при 37 °С, 90 мкг/мл гепарину, газова фаза – повітря з 5 % CO₂. Клітини пасирувалися у співвідношенні 1 : 3, стан конфлюентності досягався через 10–12 днів. В експериментах

використовувалися клітини 4–6 пасажу. Конфлюентна щільність становила 4,2–5,5 × 10⁴ клітин/см². Отримані дані нормалізувалися до 10⁶ клітин.

Експериментальний підхід

Після дворазового відмивання до моношарів клітин додавалася інкубаційна суміш такого складу: DMEM/F12 зі стандартною кількістю антибіотиків і глютаміну, 0,02 % FCS, 500 нг/мл альбуміну, 7 мк Сі/мл ¹⁴С-ацетату Na з 0,5 мкМ/мл NDSKII. Інкубація тривала 48 годин при 37 °С і 5 % CO₂. Після закінчення інкубації до клітин додався 0,05 % трипсин (у 0,45 % NaCl). У суспензії, що утворилася, визначалася кількість клітин. Чашки промивалися 0,05 % інгібітором трипсину із сої в 0,1 М Tris-HCl, рН 7,9, промивна рідина поєднувалася із суспензією клітин і центрифугувалася. Супернатант використовувався для визначення включення ¹⁴С-ацетату в ГАГ перичелюлярного матриксу. Визначення включення ¹⁴С-ацетату в перичелюлярні ГАГ проводилося, як описано [6]. До супернатанту додавалася проназа Е в 0,1 М Tris-HCl, рН 7,9 та екзогенні гіалуронова кислота і хондроїтинсульфат до кінцевої концентрації 1500 мкг/мл та 600 мкг/мл відповідно. Проби інкубувалися 17–18 годин при 50 °С, реакція зупинялась інкубацією в киплячій воді (3 хв), проби заморожувалися при –20 °С і зберігалися до використання. Після розморожування та інтенсивного діалізу (24 години проти води і 24 години проти 0,01 М Tris-HCl, рН 8,2) проводилося фракціонування ¹⁴С- ГАГ на 2 мл колонках з ДЕАЕ-целюлозою. ГАГ елюювалися градієнтом NaCl у 0,01 М Tris-HCl, рН 8,2: 0,1 М, 0,28 М, 0,4 М, 0,7 М. Після елюції фракції (3 мл) оброблялися хлоридом цетилпіридинію та спиртом. Для того щоб визначити включення ¹⁴С-ацетату окремо в ХС і ДС, відповідний матеріал розділяли на 2 рівні частини, одну з яких обробляли хондроїтиназою АС (ЕС 4.2.2.5). Цей фермент руйнує тільки ХС, тому вся радіоактивність, що залишилася, становить ДС. ХС визначали як різницю між радіоактивністю необробленої ферментом частини проби й обробленої. Ферментативну обробку проводили 0,1 U/мл хондроїтиназою АС у 0,08 М Tris-HCl, 0,2 М NaCl, рН 7,4 з додаванням 200 мкг екзогенного ХС при 37 °С протягом 18 годин. Фракцію, що містить високомолекулярні сполуки, відокремлювали ексклюзійною хроматографією на 10 мл колонках з Sephadex G-50 [7].

Таблиця. Конфлюентна щільність ендотеліальних клітин під впливом NDSKII та NDSK

	NDSK	NDSK II	контроль
Кількість клітин/см ²	4,89 ± 0,021 × 10 ⁴ (n = 7)	4,9 ± 0,032 × 10 ⁴ (n = 4)	5,11 ± 0,022 × 10 ⁴ (n = 6)

n - кількість повторів

Результати і їх обговорення

Згідно з отриманими даними, інкубація ендотеліальних клітин з 0,5 мкМ NDSK не призводила до змін ендотеліальних клітин та до змін у їх конфлюентній щільності (таблиця).

З рисунка видно, що максимальне включення ¹⁴C-ацетату відбувається в ГК перичелюлярного матриксу ендотелію. Під впливом NDSKII відбувається збільшення включення ¹⁴C-ацетату в ГК і ХС/ДС і зниження включення в ГК. NDSK

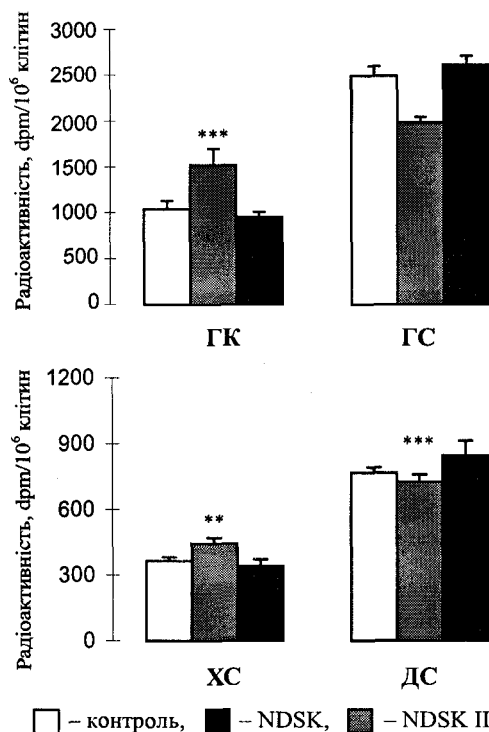


Рисунок. Порівняння ефекту NDSK II та NDSK на включення ¹⁴C-ацетату в гіалуронову кислоту (ГК), гепарансульфат (ГС) хондроїтинсульфат (ХС) та дерматансульфат (ДС) ендотеліальних клітин аорти кроля: ** - p < 0,02, *** - p < 0,01

не здійснював подібного впливу, і профіль елюції ¹⁴C-ГАГ матрикса клітин, оброблених NDSK, не відрізнявся від контрольних клітин (на рисунку не наведено). Обробка фракцій, які містять сумарний препарат ХС і ДС, хондроїтиназою АС показує, що NDSKII стимулює (22,0 %) включення ¹⁴C-ацетату тільки в ХС. Стимуляція нагромадження ГК становить 46,1 % від контролю, а пригнічення нагромадження ГС – 20,3 %. Таким чином, у нашій роботі ми показали, що інкубація конфлюентних ендотеліальних клітин аорти кроля з NDSKII призводить до істотних змін в акумуляції окремих груп ГАГ в ендотеліальному позаклітинному матриксі. NDSK не здійснює подібного ефекту, що свідчить про можливу участь взаємодії Вβ15-42-последовності з ендотеліальними клітинами. Відомо, що взаємодія Вβ15-42-фрагмента з VE-кадгеринами призводить до утворення капілярподібних структур [8], а згідно з нашими даними – до зміни профілю ГАГ, що може бути додатковою рисою характеристики стану ендотелію при відновленні ушкоджених тканин і рості пухлин [9].

Висновки

Було продемонстровано, що за використаної концентрації NDSKII не впливає на конфлюентну щільність ендотеліальних клітин культури аорти кроля. Під впливом NDSKII відбувається зростання включення ¹⁴C-ацетату в ГК перичелюлярного матриксу. Включення ¹⁴C-ацетату в ГС знижується, але відбувається перерозподіл синтезу сульфатованих ГАГ, що, відповідно, призводить до збільшення нагромадження ХС. NDSK не впливає на ГАГ ендотелію. Досить імовірно, що ефект NDSKII опосередкований через взаємодію NDSKII з VE-кадгеринами.

- Herrick S., Blanc-Brude O., Gray A., Laurent G. Fibrinogen // *Int J. Biochem. Cell Biol.* - 1999. - P. 741-746.
- Pignatelli M., Vessey C. Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology // *Hum Pathol.* - 1994. - 25. - P. 849-854.
- Knudson C., Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis and disease // *FASEB J.* - 1995. - 7. - P. 1233-1241.
- Timpl R., Gollwitzer R. Cyanogen bromide cleavage of bovine fibrin and fibrinogen. Identification of a dimeric N-terminal peptide // *FEBS Lett.* - 1973. - 29. - P. 92-96.
- Huang A., Vita A., Venema R., Keane J. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* - 2000. - 275. - P. 17399-17406.
- Yevdokimova N., Freshney R. Activation of paracrine growth factors by a hyaluron sulphate induced by a glucocorticoid in A549 lung carcinoma cells // *Br. J. Cancer.* - 1997. - 76. - P. 281-289.
- Yevdokimova N., Yefimov A. Effect of wheat germ agglutinin and concavalin A on the accumulation of glycosaminoglycans in pericellular matrix of human dermal fibroblasts. A com-

- parison with insulin //Acta Biochimica Polonica. - 2001. - 43. - P. 563-572.
8. Chalupowicz D., Chowdhury Z., Bach T., et al. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation // J. Cell Biol. - 1995 - 130. - P. 207-215.
9. Stromblad S., Cheresh D. Cell adhesion and angiogenesis // Trends Cell Biol. - 1996. - 6. - 1656-1665; Taipale J., Keski-Oja J. Growth factors and extracellular matrix // FASEB J. - 1997. - 11. - P. 51-59.

O. Yakimova, N. Yevdokymova

THE INFLUENCE OF N-TERMINAL DISULPHIDE
KNOT OF FIBRIN ON GLYCOSAMINOGLYCAN ACCUMULATION
IN EXTRACELLULAR MATRIX OF CULTURED
ENDOTHELIAL CELLS

It was shown that N-terminal disulphide knot of fibrin stimulated the ¹⁴C-acetate incorporation into hyaluronic acid of pericellular matrix of rabbit aortic endothelial cells. Simultaneously, the incorporation of ¹⁴C-acetate into heparan sulphate was decreased, and into chondroitin sulphate was increased. It means the redistribution of the synthesis of sulphated glycosaminoglycans under the action of N-terminal disulphide knot of fibrin. The absence of effect of N-terminal disulphide knot of fibrinogen in terms of ¹⁴C-acetate incorporation into pericellular glycosaminoglycans allows to suppose that the effect of N-terminal disulphide knot of fibrin is mediated via the specific binding of VE-cadherins to the B β 15-42 sequence, which is exposed in N-terminal disulphide knot of fibrin.