

УДК 616.54.23-009

© Коллектив авторов, 2012.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕГИЛИРОВАННОЙ С ПОМОЩЬЮ НАНОТЕХНОЛОГИИ ЭЛЕКТРОННО-ЛУЧЕВОГО СИНТЕЗА ГИАЛУРОНАТ-ЭНДО-В-N-АЦЕТИЛГЕКСОЗАМИНИДАЗОЙ

А.М. Дыгай, Г.Н. Зюзьков, Р.В. Гурто, В.В. Жданов, Е.В. Удут, Л.А. Мирошниченко, Е.В. Симанина, Л.А. Ставрова, Н.А. Клименко, А.В. Артамонов*, А.А. Бекарев *, П.Г. Мадонов *

*ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (директор – академик РАМН А.М. Дыгай), г.Томск; *ООО «Саентифик фьючер менеджмент» (директор – А.В. Артамонов), г. Новосибирск, Российская Федерация.*

MECHANISMS OF REGULATION OF PROGENITOR CELLS FUNCTIONS BY PEGYLATED WITH THE HELP OF NANOTECHNOLOGY OF ELECTRON-BEAM SYNTHESIS HYALURONAT-ENDO-B-N-ACETYLHEXOSAMINIDASE

A.M. Dygay, G.N. Zyuz'kov, R.V. Gurto, V.V. Zhdanov, E.V. Udut, L.A. Miroshnichenko, E.V. Simanina, L.A. Stavrova, N.A. Klimenko, A.V. Artamonov, A.A. Bekarev, P.G. Madonov

SUMMARY

The rise of colony-forming ability of erythroid, granulomonocytic, mesenchymal precursors of bone marrow and parenchymatous progenitor elements of liver (CFU-Liv) after their treatment with pegylated hyaluronate-endo-β-N-acetylhexosaminidase (Peg-HEAHA) was shown in vitro experiments. The increasing sensibility of these progenitor cells to erythropoietin, G-CSF, growth factors of fibroblasts and stem cell factor was revealed respectively. It was found, that imHD effect resulted in enhancement of CFU-Liv formation against a background of decreasing number of stromal precursors in hepatic tissue culture, which contained insulin.

МЕХАНИЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ФУНКЦІЙ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ПЕГІЛІРОВАНОЇ ЗА ДОПОМОГОЮ НАНОТЕХНОЛОГІЇ ЕЛЕКТРОННО-ПРОМЕНЕВОГО СИНТЕЗУ ГІАЛУРОНАТ-ЕНДО-В- N- АЦЕТИЛГЕКСОЗАМІНІДАЗОЮ

А.М. Дыгай, Г.Н. Зюзьков, Р.В. Гурто, В.В. Жданов, Е.В. Удут, Л.А. Мірошніченко, Е.В. Сіманіна, Л.А. Ставрова, Н.А. Кліменко, А.В. Артамонов, А.А. Бєкарєв, П.Г. Мадонов

РЕЗЮМЕ

В експериментах in vitro показано підвищення колонієобразуючої здатності еритроїдних, грануломоноцитарних, мезенхімальних попередників кісткового мозку і паренхіматозних родоначальних елементів печінки(КОЕ-Печ) після їх обробки пегілірованою гіалуронат-ендо-β- N- ацетілгексозамінідазою(Пег-ГЕАГА). Виявлено підвищення чутливості цих прогениторних клітин до еритропоєтину, Г-КСФ, чиннику зростання фібробластів і чиннику стовбурової клітини відповідно. Виявлено, що дія Пег-ГЕАГА приводить до посилення формування КОЕ-Печ на тлі зниження виходу стромальних прекурсорів у культурі тканини печінки, що містить інсулін.

Ключевые слова: гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидаза, цитокины, прогениторные клетки, нанотехнологии, регенеративная медицина.

Одним из наиболее перспективных направлений развития фармакологии является разработка лекарственных средств на основе эндогенных регуляторов функций, получаемых с помощью геномных и постгеномных технологий: цитокинов, гормонов и других биологически активных веществ. При этом весьма перспективным представляется использование в медицине для лечения различных заболеваний ростовых факторов, активных в отношении стволовых клеток (СК) [8, 9]. В то же время большинство производных биоинженерии при их применении в качестве фармакологических агентов способны приводить к развитию целого ряда тяжелых осложнений, что существенно ограничивает, либо даже делает невозможным использование подобного рода препаратов в клинике в оптимальных дозах и режимах [1, 13]. Причем, данное обстоятельство связано не только с белковой природой этих

веществ, но и, во многом, с их плеiotропностью и полифункциональностью, определяющих высокую вероятность развития различных специфических побочных эффектов [8, 11]. В связи с этим активно ведутся исследования, направленные на минимизацию риска применения факторов роста в лечебных целях, в том числе путем снижения дозы вводимых потенциальных лекарственных веществ. В ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН показана возможность потенцирования in vivo гемостимулирующих и мобилизующих СК эффектов Г-КСФ с помощью гиалуронидазы (ГД) - фермента расщепляющего гиалуроновую кислоту (ГК) на полимеры, активирующие процессы пролиферации и дифференцировки СК, и ослабляющие их связь со стромой «тканей-депо» [2-4]. Вместе с тем указанная эффективность препаратов нативной ГД проявляется лишь при использовании высоких, токсичных, доз. В

то же время существует пегилированная с применением нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидаза, обладающая самостоятельной специфической активностью в отношении СК в относительно низких дозах [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния пегилированной гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы (Пэг-ГЭАГА) на степень реализации ростового потенциала прогениторных клеток различных классов при воздействии на них специфических факторов роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в экспериментах *in vitro*. Исследуемым материалом являлся костный мозг и печень мышей-самцов линии СВА/СаЛас в возрасте 2-х месяцев, массой 18-20 г, в количестве 20 штук. Животные получены из питомника экспериментально-биологической клиники лабораторных животных ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (сертификат имеется). Для модуляции эффектов биологически активных веществ использовали препарат пегилированной гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы (представляющей собой высокоочищенную тестикулярную гиалуронидазу), разработанный совместно ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (г. Томск, Россия) и группой компаний «Саентифик фьючер менеджмент» (г. Новосибирск, Россия). Иммунизацию фермента осуществляли на полиэтиленгликоле с молекулярной массой 1500 дальтон (Да) путем воздействия направленным потоком ускоренных электронов с энергией электронов 2,5 мегаэлектронвольт (МэВ), поглощённая доза от 2 до 10 килогрей (кГр), скорость набора дозы 1,65 кГр/час.

В качестве факторов роста, активных в отношении прогениторных клеток, использовали: эритропоэтин (ЭП) («Рекормон», Хоффман ля Роше, Швейцария), Г-КСФ («Нейпоген», Хоффман ля Роше, Швейцария), фактор роста фибробластов-1-основной (ФРФ) (Sigma, США), фактор стволовой клетки (ФСК) (Sigma, США) и инсулин (Sigma, США). В отношении указанных веществ определяли чувствительность эритроидных (Э), грануломоноцитарных (ГМ), фибробластных (Ф) и печеночных (Печ) колониобразующих единиц (КОЕ) клеточного материала, подвергнутого 30 минутному воздействию (преинкубации) 0,1 ЕД/мл раствора Пэг-ГЭАГА на основе среды DMEM (Sigma, США).

После преинкубации исследовали способность: миелокариоцитов образовывать КОЕ-Э, КОЕ-ГМ и КОЕ-Ф в полувязкой культуральной среде [5] при добавлении соответственно ЭП, Г-КСФ и ФРФ; и клеток печени формировать в жидкой культуральной среде [12], содержащей инсулин, - КОЕ-Печ и КОЕ-Ф, а содержащей ФСК – только КОЕ-Печ. Контролями

во всех случаях служила колониобразующая способность клеток, не обработанных имГД, и таковая при культивировании клеточного материала в среде, не содержащей фактора роста.

Обработку результатов проводили с помощью методов вариационной статистики с применением параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента было обнаружено, что предварительная обработка миелокариоцитов ферментом сопровождалась значительным усилением выхода КОЕ-Э, КОЕ-ГМ и КОЕ-Ф в метилцеллюлозной среде, не содержащей дополнительных ростовых факторов (рис. 1). При этом колониестимулирующая активность питательной среды, очевидно, определялась совокупностью биологически активных веществ эмбриональной телячьей сыворотки [5].

Преинкубация клеток печени в растворе фермента также приводила к повышению уровня образования КОЕ-Печ (рис. 2) Однако, данные изменения наблюдались на фоне, напротив, снижения роста КОЕ-Ф из печеночной ткани. Указанный феномен, по-видимому, определялся влиянием фермента на дифференцировочные потенциалы родоначальных клеток [3, 10] и стимуляцией их ростового потенциала в наиболее тканеспецифичном - паренхиматозном направлении развития. Кроме того, клеточные элементы, полученные после их инкубации с Пэг-ГЭАГА, обладали существенно более выраженной восприимчивостью к ответу (чем интактные нуклеары) на специфические факторы роста. Так, способность КОЕ-Э, КОЕ-ГМ и КОЕ-Ф костного мозга реагировать на ЭП, Г-КСФ и ФРФ соответственно стимуляцией колониобразования увеличивалась на 48,1%, 86,9% и 99,5% (рис.1), а чувствительность КОЕ-Печ печени к ФСК возрастала на 95,4% (рис. 2, А).

Таким образом, имело место повышение способности клеток-предшественников различных классов под влиянием Пэг-ГЭАГА к реализации своего ростового потенциала. При этом максимально выраженные изменения наблюдаются у наиболее ранних прогениторных клеток костного мозга, в первую очередь КОЕ-Ф, содержащих в своем составе не только стромальные прекурсоры, но и мультипотентные СК [7, 12], а также у печеночных родоначальных элементов.

Вместе с тем результаты исследования способности клеток-предшественников печени к колониобразованию при дополнительном добавлении в культуру ткани инсулина были не столь однозначны. С одной стороны, отмечалось усиление

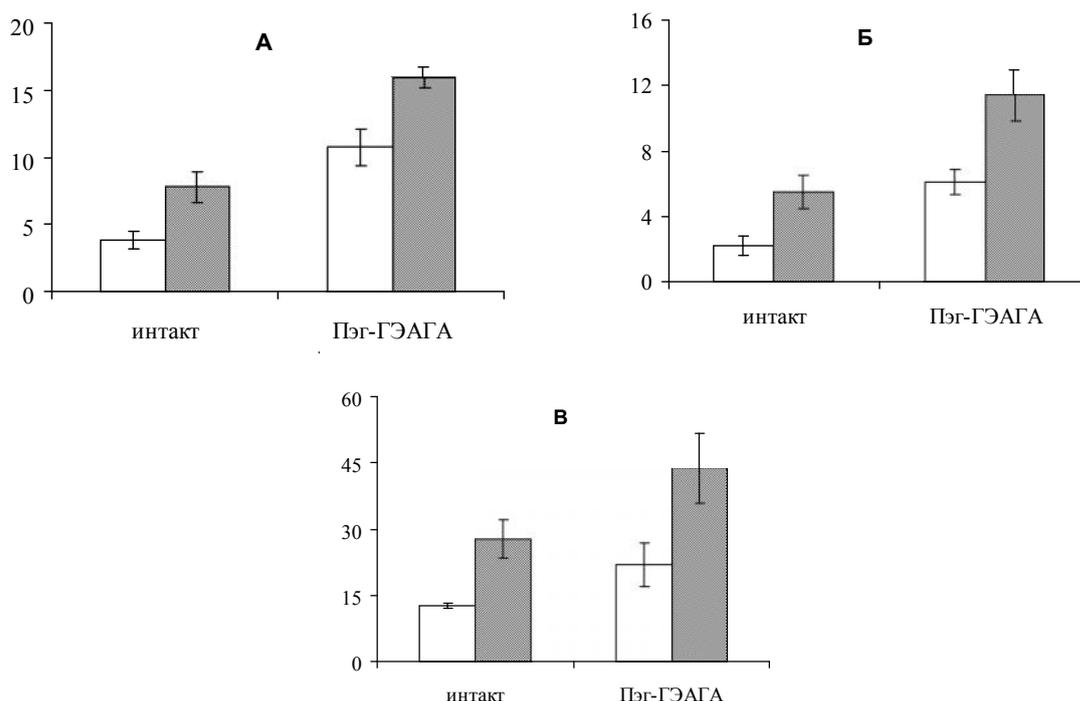


Рис. 1. Интенсивность роста КОЕ-Э (А), КОЕ-ГМ (Б) и КОЕ-Ф (В) из интактных клеток костного мозга мышей линии CBA/Calas и миелокарицитов, обработанных пегилированной гиалуронат-эндо-в-N-ацетилгексозаминидазой (Пэг-ГЭАГА), без добавления специфических факторов роста (белые столбики) и при добавлении в культуру эритропоэтина (А), Г-КСФ (Б) и фактора роста фибробластов (В) (заштрихованные столбики).

По оси абсцисс – опытные группы, по оси ординат – значения показателя: А, Б – на 10^5 неприлипающих миелокарицитов, В - на $2,5 \times 10^5$ миелокарицитов. Доверительные интервалы при $p < 0,05$.

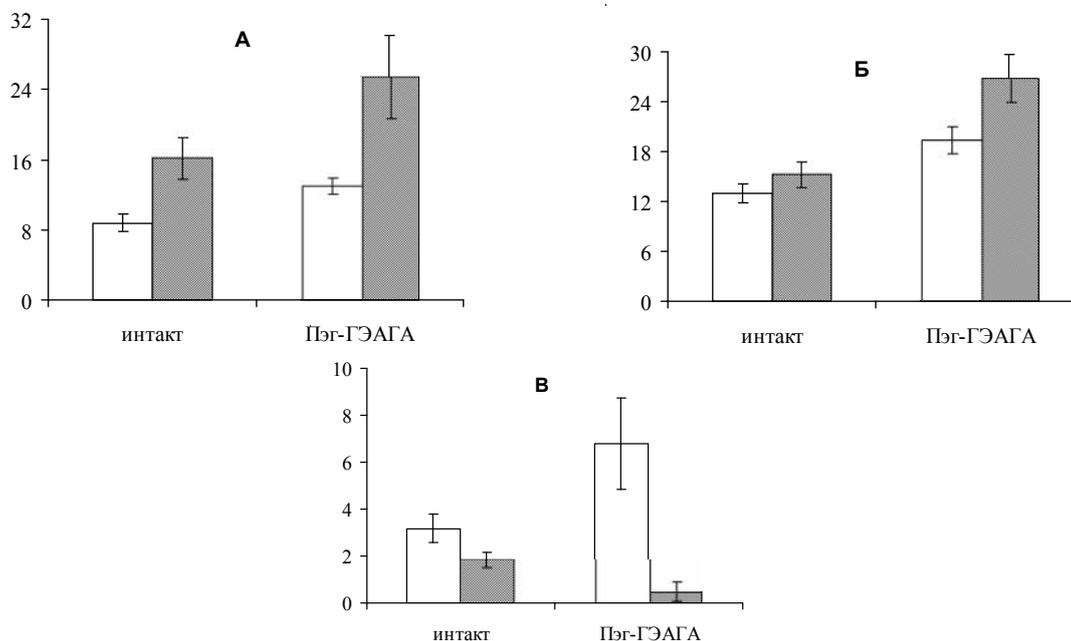


Рис. 2. Интенсивность роста КОЕ-Печ (А, Б) и КОЕ-Ф (В) из интактных клеток печени мышей линии CBA/Calas и клеток печени, обработанных пегилированной гиалуронат-эндо-в-N-ацетилгексозаминидазой (Пэг-ГЭАГА), без добавления в культуральную среду дополнительных факторов (белые столбики) и при добавлении в культуру фактора стволовой клетки (А) и инсулина (Б, В) (заштрихованные столбики).

По оси абсцисс – опытные группы, по оси ординат – значения показателя: на 10^5 нуклеаров. Доверительные интервалы при $p < 0,05$.

выхода КОЕ-Печ, с другой – снижение образования стромальных колоний (КОЕ-Ф). Данные факты, учитывая несопоставимость уровней изменения выхода паренхиматозных и фибробластных КОЕ (количество КОЕ-Печ увеличилось на 39,0%, а число КОЕ-Ф уменьшилось на 92,7%), позволяют предположить зависимости описанной реакции родоначальных клеток не только с влиянием фермента на их дифференцировочные потенции, но и от усиления Пэг-ГЭАГА ингибирующего воздействия инсулина на рост фибробластных КОЕ (рис.2, Б, В).

Полученные результаты свидетельствуют о значительном повышении чувствительности прогениторных элементов, подвергшихся воздействию Пэг-ГЭАГА, к различным биологически активным веществам, в том числе к раннедействующим и линейно-рестриктированным ростовым факторам [11]. При этом механизмом развития выявленных феноменов, вероятно, является модификация восприимчивости рецепторов к регуляторным молекулам в результате изменения их состояния из-за деградации ГК входящей в состав гликокаликса [14, 15] клеток-эффекторов.

В целом, исходя из представленных данных и сведений литературы о специфической активности [6, 9] и, очевидно, низкой токсичности [7] Пэг-ГЭАГА следует считать перспективным разработку на ее основе не только средств для регенеративной медицины [8, 9], но и подходов повышения эффективности и безопасности терапии различных заболеваний с помощью рекомбинантных и других биоинженерных белковых препаратов – аналогов эндогенных регуляторов физиологических функций.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (госконтракт № 16.N08.12.1008).

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова М.А. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор граноцит и его клиническое применение // Тер. архив. – 1998. – № 4. – С. 80-84.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. и др. Механизмы мобилизации мезенхимальных клеток-предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и гиалуронидазой // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2007. - № 12. – С. 652-656.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. и др. Роль гиалуронидазы в регуляции функций

мезенхимальных клеток-предшественников // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. - №2. – С. 115-119.

4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. и др. Формирование реакций системы крови под влиянием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и гиалуронидазы // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2008. - № 6. – С. 628-633.

5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. - Томск, 1992. - 264 с.

6. Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А. и др. Гемостимулирующие эффекты иммобилизованной гиалуронидазы и механизмы их развития при цитостатической миелосупрессии // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2010. – №5. - С. 528-531.

7. Дыгай А.М., Верещагин Е.И., Зюзьков Г.Н. и др. Мобилизация прогениторных клеток в кровь с помощью иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. - №2. – С. 63-66.

8. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Клеточная терапия: новые подходы // Наука в России – Москва: Изд-во «Наука», 2009. – Том. 169. - №1. С. 4-8.

9. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы // Вестник РАМН. – 2009. - № 11. – С. 6-9.

10. Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Дыгай А.М. и др. Роль гиалуронидазы в регуляции гемопоэза // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2007. - № 12. – С. 690-695.

11. Система цитокинов: Теоретические и клинические аспекты / Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова. – Новосибирск: Наука, 2004. – 324 с.

12. Эпштейн О.И., Зюзьков Г.Н., Сотникова Н.В. и др. Механизмы гепатопротекторного эффекта препарата сверхмалых доз антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. - №4. – С. 194-198.

13. Anderson J.A. Allergic reactions to drugs and biologic agents. JAMA. -1992 -vol. 268. -p. 2845-2857

14. Henry C.B., Duling, B.R. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan // Am. J. Physiol. – 1999. - № 277. - P. 508–514.

15. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? // Glycobiology. – 2003. - Vol. 13. - №12. – P. 105-115.