

Мобилизация стволовых клеток пегилированным с помощью нанотехнологии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором как модель изучения процессов миграции прогениторных элементов

А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов, Е. В. Удут, Е. В. Симанина,
Т. Ю. Хричкова, Л. А. Ставрова, Т. В. Андреева, А. В. Чайковский,
Е. И. Верещагин*, П. Г. Мадонов*

НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск

** ООО «Саентифик фьючер менеджмент», г. Новосибирск*

Контактная информация:

НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

** ООО «Саентифик фьючер менеджмент», г. Новосибирск 630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 20*

Предложена новая модель изучения процессов миграции циркулирующих в периферической крови стволовых клеток. Исследована мобилизующая предшественники активность гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), иммобилизованного (имм) на полиэтиленоксиде с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза. Выявлена выраженная способность иммГ-КСФ вызывать выход в кровь костно-мозговых мезенхимальных и кроветворных прогениторных клеток различной степени зрелости. Установлено, что иммГ-КСФ по своей активности превосходит действие неконъюгированного Г-КСФ. Показано наличие специфической активности иммГ-КСФ при его приеме внутрь.

Ключевые слова: стволовые клетки, мобилизация, миграция, иммобилизованный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, нанотехнологии.

Широкое применение в практической медицине получили препараты рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Основными показаниями к его применению являются как самостоятельные заболевания, связанные с нарушением процессов кроветворения, так и миелосупрессивные состояния различного генеза [9, 10]. Кроме того, известно, что Г-КСФ является

эффективным модификатором функций эндогенных стволовых клеток, что определяет его высокую терапевтическую активность при различных распространенных заболеваниях в эксперименте [1, 5, 6, 7]. При этом его эффективность обусловлена способностью вызывать выход прогениторных клеток в кровь, сопровождающуюся, как предполагается, их дальнейшей миграцией и хомингом в органы-мишени.

Тем не менее, применение стандартных форм препаратов Г-КСФ в клинике зачастую ограничено вследствие ряда причин: его токсичности, иммуногенности и др. [8, 16]. В связи с этим представляется актуальным разработка и создание новых препаратов, обладающих специфической активностью в отношении прогениторных клеток различных классов, а также моделей изучения процессов их миграции и перераспределения в организме.

Целью настоящей работы явилось исследование способности препарата Г-КСФ, иммобилизованного (имм) (пегилированного) с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза, вызывать выход в кровь мезенхимальных и кроветворных предшественников костного мозга как основа для разработки новой модели изучения миграционных процессов прогениторных элементов.

Методика исследования

Эксперименты были выполнены на 267 мышах линии СВА/СаЛас в возрасте 2-х месяцев, массой 22–24 гр. Животные 1 категории, получены из питомника ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертификат имеется). Стандартный (неконъюгированный) негликозилированный Г-КСФ – аналог филграстима (получен из «ЗАО Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», г. Новосибирск) вводили подкожно в дозе по 100 мкг/кг в течение 5 дней. ИммГ-КСФ вводили также в дозе по 100 мкг/кг подкожно в течение 5 дней, и per os в течение 10 дней. Контрольным мышам в аналогичных режимах в эквивалентном объеме (0,2 мл) вводили физиологический раствор.

Препарат иммГ-КСФ был разработан совместно «ЗАО Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, НИИ

ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН и НИИ цитологии и генетики СО РАН. При этом иммобилизация молекул негликозилированного Г-КСФ («ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», г. Новосибирск) на низкомолекулярном полиэтиленоксиде осуществлялась с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза с применением направленного потока ускоренных электронов [15].

На 2, 3, 4, 5, 7, 10-е сут. эксперимента в костном мозге и периферической крови методом клонирования в полувязкой культуральной среде определяли содержание грануломоноцитарных (ГМ), эритроидных (Э) и фибробластных (Ф) колониеобразующих единиц (КОЕ) [4]. С помощью метода лимитирующих разведений [11] на 3-и сутки опыта в костном мозге и периферической крови изучали количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Частоту встречаемости МСК в костном мозге и периферической крови определяли с помощью обобщенной линейной модели для распределения Пуассона [11].

Результаты исследования

В ходе эксперимента у контрольных животных (при курсовом введении физиологического раствора) наблюдалось незначительное увеличение количества КОЕ-ГМ (10-е сут.), КОЕ-Э (7, 10-е) и КОЕ-Ф (7-е сут.) в костном мозге и мало выраженное изменение их содержания в периферической крови (рис. 1, 2). Указанные реакции, очевидно, являлись следствием невротизирующего воздействия

регулярно проводимой процедуры зондирования и были связаны с активацией стресс-реализующих систем организма [1, 3].

Введение препаратов выявило их значительное влияние на состояние пула родоначальных клеток. Г-КСФ как активное вещество исследуемых средств во всех случаях закономерно [9, 10] приводил к увеличению содержания грануломоноцитарных прекурсоров в гемопоэтической ткани. Так, при использовании неконъюгированного Г-КСФ и при внутрижелудочном применении иммобилизованного цитокина отмечалось возрастание количества КОЕ-ГМ на 3, 5, 7-е сут. исследования. Вместе с тем введение иммГ-КСФ

подкожно приводило к более длительному (3, 7, 10-е сут.) и максимально выраженному (до 372,1% на 3-и сут. опыта от аналогичного параметра у контрольных мышей) увеличению числа кроветворных клеток в костном мозге (рис. 1).

В то же время во всех опытных группах имело место развитие феномена мобилизации КОЕ-ГМ. Увеличение числа данных предшественников в периферической крови при парентеральном способе введения препаратов Г-КСФ относительно фона наблюдалось уже на 2-е сут. опыта. Однако повышение их количества, достигающее статистической значимости по сравнению с контролем, регистрировалось на 4, 5-е и на 4, 5, 10-е сут. при ис-

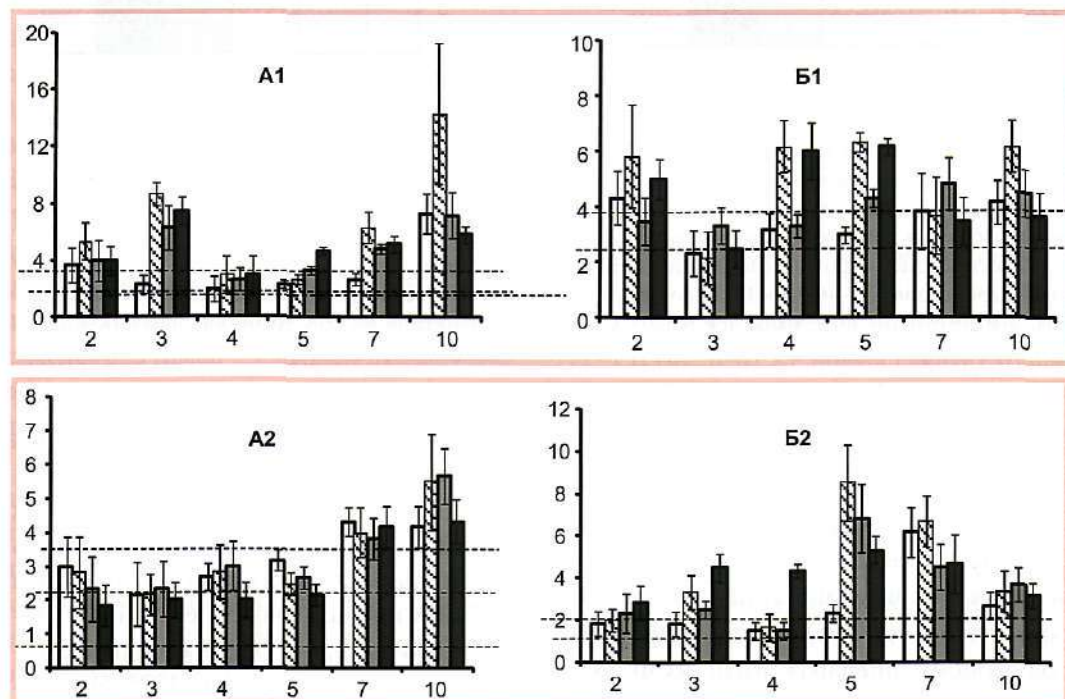


Рис. 1. Содержание КОЕ-ГМ (А) и КОЕ-Э (Б) в костном мозге (индекс-1) и в периферической крови (индекс-2) у мышей линии СВА/Calas при введении физиологического раствора (белые столбики), подкожного введения иммГ-КСФ (заштрихованные столбики), энтерального введения иммГ-КСФ (серые столбики) и при подкожном введении неконъюгированного Г-КСФ (черные столбики).

По оси абсцисс – сроки исследования (сутки), по оси ординат – значения показателя: А – на 10^5 миелокариоцитов; Б – на 10^5 мононуклеаров. Доверительные интервалы при $p < 0,05$. Область межпунктирного пространства – область доверительного интервала значения показателя у интактных мышей при $p < 0,05$

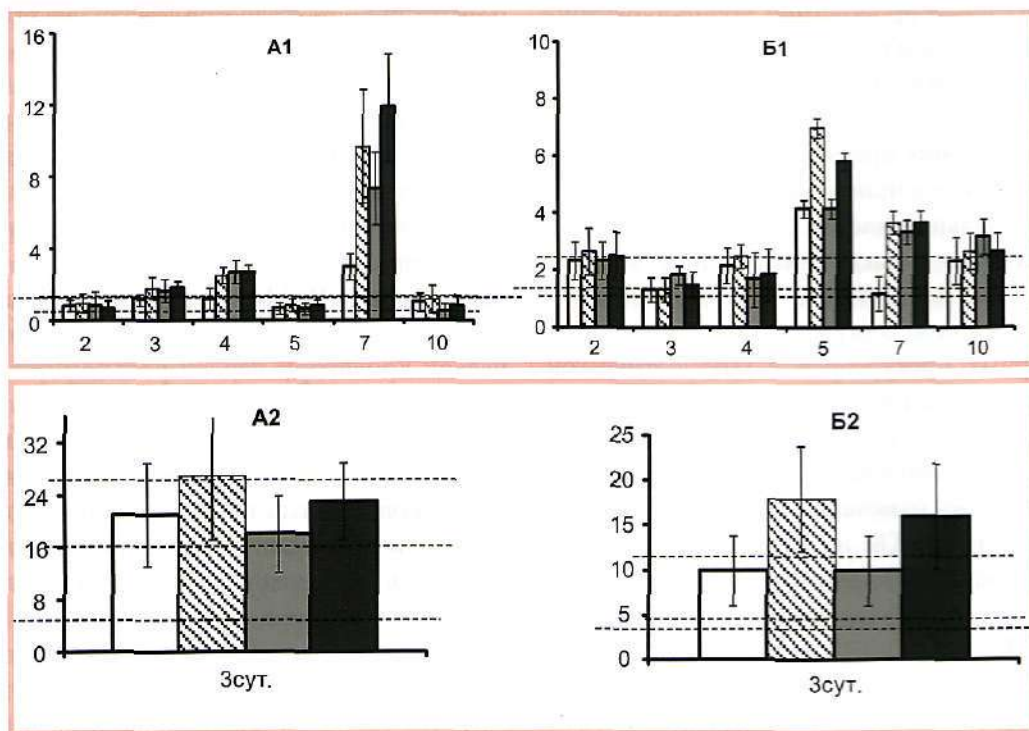


Рис. 2. Содержание КОЕ-Ф (А1) и МСК (А2) в костном мозге и КОЕ-Ф (Б1) и МСК (Б2) в периферической крови у мышей линии СВА/Calas при введении физиологического раствора (белые столбики), подкожного введения иммГ-КСФ (заштрихованные столбики), энтерального введения иммГ-КСФ (серые столбики) и при подкожном введении неконъюгированного Г-КСФ (черные столбики).

По оси абсцисс – сроки исследования (сутки), по оси ординат – значения показателя: А1 – на $2,5 \times 10^5$ миелокарицитов; Б1 – на $2,5 \times 10^5$ мононуклеаров; А2 – на 10^6 миелокарицитов; Б2 – на 10^6 мононуклеаров. Доверительные интервалы при $p < 0,05$. Область межпунктирного пространства – область доверительного интервала значения показателя у интактных мышей при $p < 0,05$

пользовании стандартной и конъюгированной формы Г-КСФ соответственно. Причем на 10-е сут. опыта содержание КОЕ-ГМ в крови при применении иммобилизованного Г-КСФ было в 1,7 раза выше, чем при назначении неконъюгированного Г-КСФ. Однако у животных, получавших препарат иммГ-КСФ внутривенно, мобилизация КОЕ-ГМ развивалась в более поздние сроки (5-е сут.) и была менее выражена (рис. 1).

Несколько иные эффекты Г-КСФ наблюдались в отношении эритроидных прекурсоров. Во всех опытных группах имело место в разной мере выраженное

снижение их количества в костном мозге, но только относительно контрольных значений (у животных с достаточно выраженной реакцией стресс-реализующих систем [1, 3]). В то же время наблюдалась значительная стимуляция инфлюкса КОЕ-Э в кровь. Причем, если в начальные сроки (2, 3, 4-е сут.) наибольшее количество циркулирующих КОЕ-Э отмечалось при использовании стандартного Г-КСФ, то в более позднем периоде – при парентеральном введении иммГ-КСФ (5-е сут.) (рис. 1).

Полученные результаты полностью согласуются со сведениями литературы [1, 2, 12, 13], свидетельствующими о сти-

муляции под влиянием Г-КСФ выхода кроветворных предшественников в периферическую кровь на фоне повышения функциональной активности КОЕ-ГМ.

Во многом схожие изменения имели место со стороны пула фибробластных колониобразующих единиц, содержащих в своем составе как коммитированные стромальные элементы, так и мезенхимальные стволовые клетки [7]. Введение неконъюгированного и иммобилизованного препаратов Г-КСФ (в обоих режимах) приводило к увеличению числа КОЕ-Ф в гемопоэтической ткани на 3, 4, 7-е и 4, 7-е сут. опыта соответственно. При этом прием иммобилизованного с помощью нанотехнологии препарата внутрь оказывал менее выраженный эффект (7-е сут.) по сравнению с парентеральным путем назначения стандартного Г-КСФ. Указанные изменения функциональной активности КОЕ-Ф костного мозга сопровождались усилением их выхода в периферическую кровь. Причем наиболее существенной данная реакция была в группе животных, получавших иммГ-КСФ подкожно, а менее значимая – у мышей при внутрижелудочном применении иммобилизованной формы цитокина (рис. 2).

Изучение содержания истинных родоначальных элементов – мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в костном мозге [1], подтвердило сведения об их низкой способности реагировать на воздействия гуморальных факторов [1, 3]. Назначение исследуемых средств практически не влияло на количественные характеристики костномозговой популяции МСК. Вместе

с тем парентеральное введение различных форм Г-КСФ сопровождалось мобилизацией МСК в периферическую кровь (рис. 2), которая была более выраженной (как и во всех предыдущих случаях) при введении цитокина, связанного с молекулой низкомолекулярного полимера, и реализовывалась, очевидно, опосредованно через активацию элементов микроокружения [1, 2].

Таким образом, Г-КСФ, иммобилизованный с помощью нанотехнологии на полиэтиленоксиде, обладает выраженной способностью вызывать выход прогениторных клеток различных классов в кровь на фоне увеличения популяции грануломоноцитарных и стромальных прекурсоров костного мозга. Причем при парентеральном введении его эффект по ряду показателей, в первую очередь по длительности действия, значительно превосходит аналогичные свойства неконъюгированного Г-КСФ. Полученные результаты соответствуют сведениям литературы о модификации мобилизующего влияния Г-КСФ на стволовые клетки при его пегилировании [12, 13, 14]. В то же время следует отметить впервые в мире выявленную принципиальную возможность энтерального применения препарата на основе колониестимулирующего фактора.

В целом, представленные данные позволяют говорить о перспективности использования иммобилизованного с помощью нанотехнологии электроннолучевого синтеза Г-КСФ с целью изучения процессов перераспределения стволовых клеток в организме.

Список литературы

1. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Зюзьков Г. Н. Гипоксия и система крови. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. 142 с.

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., Хлусов И. А.** Роль вегетативной нервной системы в регуляции гемопоэза. Томск: Изд-во ТГУ, 1997. 218 с.

4. **Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П.** Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1992. 272 с.

5. **Зюзков Г. Н., Сулов Н. И., Дыгай А. М. и др.** Роль стволовых клеток в адаптации к гипоксии и механизмы нейропротективного действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. №4. С. 202–208.

6. **Ставрова Л. А., Фомина Т. И., Плотников М. Б. и др.** Фармакологическая регуляция функциональной активности стволовых клеток при восстановлении миокарда в постинфарктном периоде // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. №4. С. 189–193.

7. **Эпштейн О. И., Зюзков 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.

8. **de Wit R., Verweij J., Bontenbal M. et al.** Adverse effect on bone marrow protection of prechemotherapy granulocyte colony-stimulating factor support // J. Natl. Cancer Inst. 1996. Vol.88, №19. P. 1393–1398.

9. **Demetri G. D., Griffin J. D.** Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor // Blood. 1991. Vol.78. P. 2791–2808.

10. **Glaspy J. A.** Hematopoietic management in oncology practice. Part 1. // Myeloid growth factors Oncology (Huntingt). 2003. Vol.17, №11. P. 1593–1603.

11. **Int Anker P. S., Noort W. A., Scherjon S. A. et al.** Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential // Haematologica. 2003. Vol.88. P. 845–852.

12. **Bruns I., Steidl U., Fischer J. et al.** Pegylated granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34+ cells with different stem and progenitor subsets and distinct functional properties in comparison with unconjugated granulocyte colony-stimulating factor // Haematologica. 2008. Vol.93. P. 347–355.

13. **Morris E. S., MacDonald K. P., Hill G. R.** Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? // Blood. 2006. Vol.107. P. 3430–3435.

14. **Steidl U., Fenk R., Bruns I. et al.** Successful transplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and a single dose of pegylated G-CSF in patients with multiple myeloma // Bone Marrow Transplant. 2005. Vol.35. P. 33–36.

15. **Vereschagin E. I., Khan Do-Hung, et al.** Radiation Technology in the Preparation of Polyethylene Oxide Hydrophilic Gels and Immobilization of Proteases for Use in Medical Practice // Arch. Pharm. Res. 2001. Vol.24, №3. P. 229–233.

16. **Vial T., Descotes J.** Clinical toxicity of cytokines used as haemopoietic growth factors // Drug Saf. 1995. Vol.13. P. 371–406.

Stem cell mobilization with using granulocyte colony-stimulating factor pegylated by nanotechnology method as a model of study of progenitor elements migration processes

A. M. Dygai, G. N. Zyuzkov, V. V. Zhdanov, E. V. Uдут, E. V. Simanina, T. Yu. Khriчkova, L. A. Stavrova, T. V. Andreeva, A. V. Chaikovskiy, E. I. Vereschagin, P. G. Madonov

It has been offered a new model of study of migration processes of stem cells circulating in the peripheral blood. It has been investigated mobilizing of stem cells activity of granulocyte colony-stimulating factor

Мобилизация стволовых клеток пегилированным с помощью нанотехнологии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором как модель изучения процессов миграции прогениторных элементов

(G-CSF) immobilized (imm) on polyethylenoxide with the help of electron-beam synthesis nanotechnology. Expressed capacity of immG-CSF to induce migration of mesenchymal and hemopoietic progenitor cells of different maturity degree from the bone marrow in the peripheral blood has been revealed. It has been established, that immG-CSF is more active than unconjugated G-CSF. It has been shown the presence of specific activity of immG-CSF under its ingestion.

Key words: stem cells, mobilization, migration processes, granulocyte colonystimulating factor immobilized, nanotechnologies.