

И.А. Хлусов, А.В. Карлов, М.В. Чайкина, \*Е.В. Панкратов, \*С.Б. Никифоров, Т.В. Дружинина

## ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА И НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ГИДРОКСИЛАПАТИТА НА КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ КОСТНОГО МОЗГА

Томский филиал РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росздрава (Томск)  
\* ООО «Научно-клинический центр онкологии и неврологии «Биотерапия» (Новосибирск)

В системе *in vitro* изучена способность наноразмерных частиц гидроксилапатита (ГАП), его производного с включением меди и цинка в структуру апатита ( $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$ ), синтезированных механо-химическим методом, рекомбинантного альфа-фетопротейна человека (АФП), как самостоятельного, так и в смеси, влиять на колониеобразующую активность пула рогончатых клеток. Установлено, что АФП или  $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$  стимулировали в жидкой 7-дневной культуре костного мозга мышей СВА/СаЛас выход и пролиферативную активность прекурсоров, идентифицируемых при обычной окраске как гранулоцитарные колониеобразующие единицы (КОЕ-Г). При этом  $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$  усиливал также эффективность клонирования клеток-предшественников моноцитов (КОЕ-М). В то же время синтетический стехиометрический ГАП и смесь  $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$  с АФП подобными эффектами не обладали. Отсутствие эффекта не было связано с цитотоксичностью изучаемых образцов. Стехиометрический ГАП не показал биоактивных свойств в тесте 5-недельного изменения рН модельной биологической жидкости (изотонический раствор хлорида натрия). В случае комбинации  $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$  с АФП имело место функциональное влияние на клетки, поскольку в кондиционных средах 7-дневных клеточных культур отмечено статистически значимое снижение активности щелочной фосфатазы. Отдельные компоненты смеси подобным влиянием не обладали. Полученные результаты доказывают необходимость многократной проверки в различных тест-системах биомедицинских свойств гибридных систем доставки биологических молекул.

**Ключевые слова:** миелокарициты мыши, эмбриональный белок человека, *in vitro*, синтетические гидроксилапатиты, гранулоцитарные прекурсоры

## AN EFFECT OF ALPHA-FETOPROTEIN AND NANOSIZED HYDROXYLAPATITE PARTICLES ON BONE MARROW COLONY FORMING ACTIVITY

И.А. Khlusov, A.V. Karlov, M.V. Chaykina, \* E.V. Pankratov, \* S.B. Nikiforov, T.V. Druzhinina

Tomsk Branch of Russian Ilizarov Scientific Center of «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of Russian Public Health Service, Tomsk  
\* Scientific and Clinical Center for Oncology and Neurology «Biotherapy» LC, Novosibirsk

An ability of nanosized particles of hydroxylapatite (HAP), its derivative with inclusion of copper and zinc into the hydroxylapatite structure ( $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$ ), synthesized by mechano-chemical method, human recombinant alpha-fetoprotein (AFP), both independently and in composition, to effect on colony-forming activity of progenitor hemopoietic cell pool was studied. It is revealed that AFP or  $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$  stimulated an output and proliferative activity of precursors, identified as granulocytic colony-forming units (CFU-G) by routine staining in 7-day liquid marrow culture of CBA/CaLac mice. At that,  $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$  also intensified the cloning efficacy of precursor monocyte cells (CFU-M). At the same time, synthetic stoichiometric HAP and composition of  $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$  and AFP had no such effects. The effect absence was not connected with cytotoxicity of studied specimens. Stoichiometric HAP has not showed any biological properties in the test of 5-week pH change of model biological liquid (isotonic solution of sodium chloride). In case of combination of  $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$  with AFP a functional effect on cells took place, as far as statistically decreased alkaline phosphatase activity is noticed in conditioned medium of 7-day cell cultures. Single components of composition had no such effect. Obtained results prove a necessity of multiple examinations of biomedical properties of biological molecule hybrid delivery systems in test-systems.

**Key words:** mouse myelokaryocyte, human embryonic protein, *in vitro*, synthetic hydroxylapatites, granulocytic precursors

### ВВЕДЕНИЕ

Биологическое значение наноразмерных частиц рассматривается в следующих основных направлениях: 1) токсичность частиц износа имплантатов; 2) биосовместимость и специфическая активность собственно наночастиц; 3) свойства наночастиц как носителей (средств доставки) лекарственных препаратов и биологических молекул.

Активный поиск биосовместимых наноматериалов для конструирования систем целевой до-

ставки лекарств и биологических молекул сосредоточен на липосомах и твердотельных частицах [1, 2]. Одними из первых средств доставки были апробированы фосфаты кальция и апатиты [1], в наноразмерном варианте успешно применяющиеся до сих пор [8].

Кроме того, как источник кальция, фосфаты кальция интересны в плане регуляции стволовых клеток, группирующихся в костном мозге вблизи костной ткани [6]. Известна активность альфа-фетопротейна (АФП) [6, 12], катионов меди

и цинка [9, 13] на уровне пула стволовых и родоначальных клеточных клеток.

Ранее нами были синтезированы наноразмерные частицы гидроксилатапатита (ГАП) с включением в структуру малых количеств калия, меди, цинка, бария, магния [7], что позволяло регулировать их биологическую активность *in vitro* [3].

Функциональные методы определения активности клеток обладают высокой чувствительностью к природе тестируемого материала [11]. Данная работа посвящена изучению эффектов АФП и наночастиц ГАП, а также их смеси на колониеобразующую способность прекурсоров грануло- и моноцитопозза в многоклеточной системе.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Механохимический синтез наноразмерного гидроксилатапатита проводили, как описано нами ранее [7]. Был синтезирован гидроксилатапатит стехиометрического состава  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и апатит  $\text{Ca}_{10}(\text{Cu,Zn})_{0,08}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,16}$  с включением в его решетку сверх стехиометрии ионов цинка и меди в количестве, соответствующим среднему

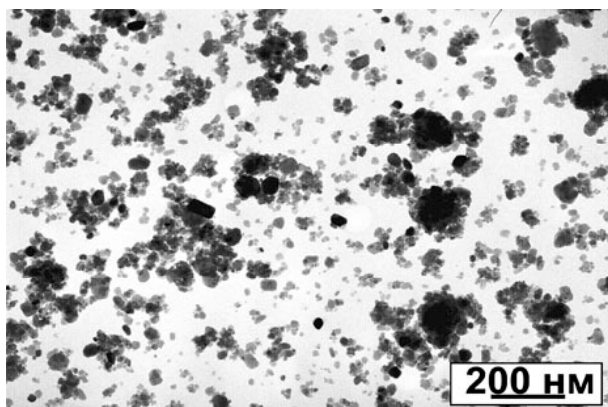


Рис. 1. Электронная микроскопия частиц механохимически синтезированного гидроксилатапатита. Увеличение 75 000.

значению этих катионов в составе биологического апатита. Электронная микроскопия (JEM-200СХ, Япония) показала, что наряду с частицами диаметром 10 – 40 нанометров, в порошке присутствуют их агрегаты размером до 100 нм (рис. 1). Фазовый состав и кристалличность синтезированных нанопорошков, представленных в табл. 1, подтверждены данными рентгенофазового анализа (РФА) и инфракрасной спектроскопии (ИКС).

Определяли рН стерильных экстрактов нанопорошков ГАП, полученных согласно требованиям ISO 10993-5 в условиях их 1-5-недельного культивирования при 37 °С в концентрации 0,1 мг/мл изотонического раствора хлорида натрия.

Эксперименты *in vitro* проводились в осенне-зимний период с использованием биологического материала 5 мышей линии СВА/СаLас. Мышей умерщвляли эфирным наркозом, выделяли костный мозг бедренных костей в концентрации  $0,5 \times 10^6$  кариоцитов/мл и культивировали в объеме клеточной взвеси 4,5 мл в течение 1 ч с нанопорошками (0,1 мг/мл культуры клеток) стехиометрического (Са/Р = 1,67) ГАП, ГАП<sub>Cu,Zn</sub> с введением в решетку меди и цинка, рекомбинантным АФП человека (альфетин, 0,5 нг/мл) и смесью ГАП<sub>Cu,Zn</sub> с АФП. Смесь создавали путем предварительного (в течение 30 мин) сокультивирования 0,1 мг/мл наночастиц с 0,5 нг/мл эмбрионального белка. В контрольные пробирки добавляли соответствующий объем (0,5 мл) растворителя (изотонического раствора хлорида натрия).

Часть нефракционированной клеточной взвеси использовали для выявления колониеобразующей способности костного мозга. Цитотоксичность исследуемых образцов наночастиц и эмбрионального белка определяли в тесте с 0,4% трипановым синим до и через 24 часа после культивирования с миелокариоцитами в описанных выше условиях.

7-дневное клонирование клеток костного мозга проводили в 35 мм чашках Петри при 37 °С и 5%

Таблица 1

Содержание (на  $10^5$  нуклеаров/мл) колониеобразующих единиц моноцитов (КОЕ-М) и гранулоцитов (КОЕ-Г) в жидкой культуре миелокариоцитов мыши после 7 суток культивирования с исследуемыми образцами, X

Исследуемый образец (n = 3)	Число колоний	
	КОЕ-М	КОЕ-Г
контроль	1,80	3,90
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ стехиометрический	4,15	7,13
$\text{Ca}_{10}(\text{Cu,Zn})_{0,08}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,16}$	4,90 * $p_1 = 0,02$	11,00 * $p_1 = 0,036$
альфа-фетопротейн	3,45	18,25* $p_1 = 0,002$
$\text{Ca}_{10}(\text{Cu,Zn})_{0,08}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,16}$ + альфа-фетопротейн	2,80	1,75 $p_2 = 0,01$ $p_3 = 0,0006$

Примечание (здесь и в табл. 2): n – число исследованных образцов; P<sub>1</sub> – статистически значимые различия с контролем, P<sub>2</sub> – с ГАП с добавками микроэлементов; P<sub>3</sub> – с АФП согласно U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

CO<sub>2</sub> в концентрации 0,75 × 10<sup>6</sup> жизнеспособных кариоцитов в 1,5 мл культуральной среды. Для культивирования клеток применяли питательную среду (280 мг/л L-глутамин (Sigma), 40 мг/л гентамицина сульфат, 15 % эмбриональной телячьей сыворотки (ICN), 85 % среды 199 (НПО Вектор), позволяющую определять спонтанную (без факторов роста) колониеобразующую активность костного мозга. Контролем роста служила культура интактных миелокариоцитов после добавления изотонического раствора хлорида натрия.

Через 7 дней подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ) — клонов родоначальной клетки. Под гранулоцитарными прекурсорами (КОЕ-Г) подразумевали колонии из 50 и более ядродержащих элементов, имеющих морфологию гранулоцитов при окраске азуром II-эозином. Родоначальные клетки моноцитов (КОЕ-М) формировали клоны, включающие 30—50 адгезирующих мононуклеаров, морфологически идентифицируемых при обычной окраске как моноциты/макрофаги. Колонии фотографировали, по площади составляющих их клеток определяли число клеточных делений.

Супернатанты 7-дневных культур собирали в пробирки, центрифугировали при 500 G, в надосадочной жидкости определяли функциональное состояние культуры миелокариоцитов по активности щелочной фосфатазы. Активность щелочной фосфатазы (alkaline phosphatase, ALP) выявляли с помощью стандартных наборов «La Roche Ltd» на фотометрическое определение нитрофенола с использованием возможностей анализатора «НИТАСНИ 911» при длине волны 405 нм.

Статистическую обработку результатов проводили согласно непараметрическому U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (P<sub>U</sub>) и T-критерию Вилкоксона (P<sub>T</sub>).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты показали неоднозначные результаты (табл. 1). Рекombинантный АФП человека и наночастицы ГАП с катионной модификацией сверх стехиометрии (ГАП<sub>Cu,Zn</sub>) стимулировали в культуре *in vitro* выход родоначальных клеток гранулоцитопоза. Цитологический анализ показал, что число КОЕ-Г, вступающих в деление, возросло по сравнению с контрольной культурой клеток до 468 % и 282 % соответственно. Более того, после воздействия раздражителей в деление вступали более молодые (примитивные) клетки-предшественники кроветворения. Так, если в контрольной культуре КОЕ способны выполнять не более 6—7 клеточных делений, то после взаимодействия с наночастицами ГАП<sub>Cu,Zn</sub> или АФП количество клеток в индивидуальных колониях соответствовало 8-10 митозам (рис. 2).

Согласно кинетическим параметрам кроветворных клеток [4], речь может идти о грануломоноцитарных прекурсорах (КОЕ-ГМ), дифференцирующихся в пролиферирующие унипотентные предшественники. При этом, в случае до-

бавления в культуру эмбрионального белка, превалирует дифференцировка в гранулоцитарном направлении (табл. 1).

Полученные результаты соответствуют литературным данным о том, что рекombинантный АФП человека не обладает видоспецифичностью [10], экспрессируется гемопоэтическими стволовыми клетками [12], обнаруживается в цитоплазме незрелых нейтрофилов и макрофагов [14].

Стимулирующее влияние наночастиц ГАП<sub>Cu,Zn</sub> на родоначальные клетки теоретически может быть прямым и/или опосредованным через продукты их растворения. Сам ГАП, кальций и другие катионы могут регулировать активность клеток, в том числе на уровне генов [6, 9, 15].

Вместе с тем, синтетический стехиометрический ГАП не обладал статистически значимым колониестимулирующим эффектом (табл. 1). Известна его малая растворимость в области физиологических значений pH (7,2) [5]. В то же время, нестехиометрические апатиты обладают повышенной резорбируемостью [5], способствующей изменению физико-химических свойств биологических жидкостей. Действительно, в динамике длительного (5-недельного) растворения исследуемых наночастиц, ГАП<sub>Cu,Zn</sub>, но не стехиометрический ГАП, вызывал стабильное (P<sub>T</sub> < 0,05) превышение значений pH по сравнению с растворителем (рис. 3).

В связи с установленной ранее биологической активностью экстрактов замещенных ГАП [3], можно считать, что один из механизмов повышения колониобразующей способности унипотентных родоначальных клеток костного мозга связан с влиянием продуктов растворения наночастиц ГАП<sub>Cu,Zn</sub>.

В настоящее время идет разработка критериев для отбора наноразмерных биосовместимых материалов в качестве носителей лекарственных

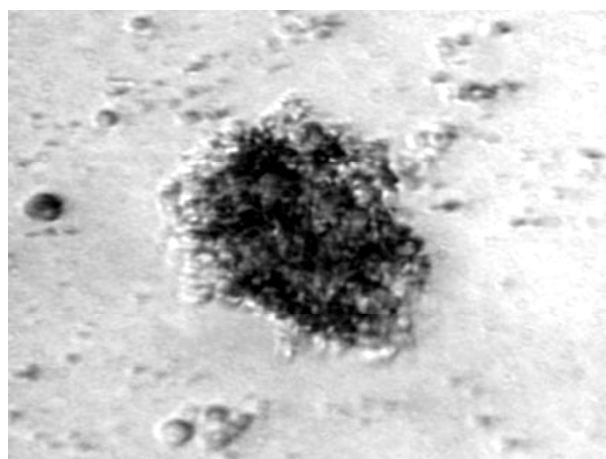
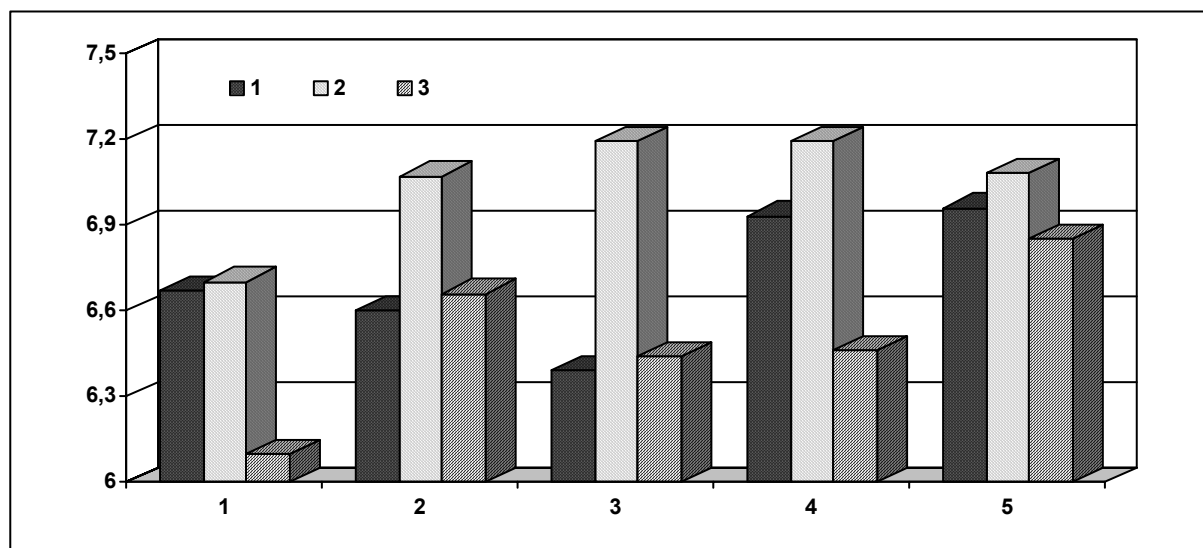


Рис. 2. Колония из 580 кроветворных клеток, выросшая на 7 сутки культивирования в жидкой питательной среде в присутствии наночастиц гидроксилапатита. Скопления наночастиц в пределах колонии визуализированы посредством контрастирования снимка в оттенках серого цвета. Увеличение 100.



**Рис. 3.** Динамика изменений pH экстрактов при длительном растворении различных образцов наноразмерного синтетического гидроксилапатита. 1 – растворитель (изотонический раствор хлорида натрия); 2 – гидроксилапатит с включением в молекулу атомов цинка и меди; 3 – стехиометрический гидроксилапатит. По оси абсцисс – время растворения, недели; по оси ординат – значения pH растворов.

**Таблица 2**

**Показатели выживаемости миелокариоцитов (%) и активность щелочной фосфатазы (ЕД/мл) в супернатантах клеточных культур соответственно после 24 часов и 7 суток культивирования с исследуемыми образцами, X**

Исследуемый образец, n = 3	Число жизнеспособных клеток костного мозга	Активность щелочной фосфатазы, n <sub>1</sub> = 9
контроль	85,39 n <sub>1</sub> = 9	73,33
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> стехиометрический	77,37 n <sub>1</sub> = 15	70,33
Ca <sub>10</sub> (Cu,Zn) <sub>0,08</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2,16</sub>	81,30 n <sub>1</sub> = 10	74,00
альфа-фетопротеин	83,63 n <sub>1</sub> = 15	74,50
Ca <sub>10</sub> (Cu,Zn) <sub>0,08</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2,16</sub> + альфа-фетопротеин	83,40 n <sub>1</sub> = 15	70,17 * p <sub>1</sub> = 0,02 p <sub>2</sub> = 0,01 p <sub>3</sub> = 0,004

**Примечание:** n<sub>1</sub> – число определений.

и биологических молекул. В этом плане интересен тот факт, что, в случае предварительного смешивания рекомбинантного АФП человека и наночастиц ГАП<sub>Cu,Zn</sub>, их стимулирующий эффект на рост родоначальных клеток в культуре нивелировался (табл. 1). Снижение (до исходного уровня) выхода КОЕ-Г не было связано с цитотоксичностью изучаемой смеси (табл. 2).

Вероятно, имеет место функциональное влияние комплекса наночастиц с эмбриональным белком на клетки, тем более, что в кондиционных средах клеточных культур зафиксировано статистически значимое снижение активности ALP. Отдельные компоненты смеси подобным влиянием не обладали (табл. 2).

Биологические молекулы, включая эмбриональные белки, легко адсорбируются на поверхности ГАП [8]. Однако не всегда применение таких комплексов сопровождается достижением желаемого результата [15]. Полученные нами данные показывают, что стремление создавать комбинированные, «идеальные» [2], по сути, гибридные системы доставки лекарств является сложной биотехнологической задачей, требующей реальной многократной биомедицинской проверки создаваемых биоконструкций.

Работа выполнена при поддержке гранта NMP3-СТ-2003-504937 6-й рамочной программы Европейской комиссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологические методы лечения онкологических заболеваний: Пер. с англ. / Под ред. В.Т. Де-Вита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. — М., 2002.
2. Каплун А.П., Ле Банг Шон, Краснопольский Ю.М., Швец В.И. // Вопросы медицинской химии. — 1999. — № 1. — С. 3—12.
3. Карлов А.В., Хлусов И.А., Поженько Н.С., Чайкина М.В. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2004. — Т. 138, № 9. — С. 356—360.
4. Кинетические аспекты гемопоэза / Под ред. Г.П. Козинца, Е.Д. Гольдберга. — Томск, 1982.
5. Малышева А.Ю., Белецкий Б.И. // Неорганические материалы. — 2001. — Т. 37, № 2. — С. 233—236.
6. Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворного микроокружения / А.Я. Фриденштейн, Е.А. Лурия. — М., 1980.
7. Чайкина М.В., Хлусов И.А., Карлов А.В., Пайчадзе К.С. // Химия в интересах устойчивого развития. — 2004. — Т. 12. — С. 389—399.
8. Chowdhury E.H., Akaike T. // *Biotechnol. Bioeng.* — 2005. — Vol. 90, N 4. — P. 414—421.
9. Hock H., Orkin S.H. // *Curr. Opin. Hematol.* — 2006. — Vol. 13, N 1. — P. 1—6.
10. Ironi-Tur-Sinai M., Grigoriadis N., Loubopoulos A. et al. // *Exp. Neurol.* — 2006. — Vol. 198, N 1. — P. 136—144.
11. Johnson H.J., Northup S.J., Seagraves P.A. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1985. — Vol. 19. — P. 489—508.
12. Kubota H., Storms R.W., Reid L.M. // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 27629—35.
13. Soderberg L.S., Barnett J.B., Baker M.L. et al. // *Exp. Hematol.* — 1988. — Vol. 16, N 7. — P. 577—580.
14. Trojan J., Naval J., Jusforgues H., Uriel J. / *Br. J. Exp. Pathol.* — 1989. — Vol. 70, N 4. — P. 469—478.
15. Xie J., Baumann M.J., McCabe L.R. // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2005. — Vol. 73, N 1. — P. 39—47.