

Эффект наноразмерных частиц гидроксилапатита на кроветворные прекурсоры костного мозга *in vitro*

А.В. Карлов, И.А. Хлусов, М.В. Чайкина, Т.В. Дружинина

The effect of hydroxylapatite nano-scale particles on bone marrow hemopoietic precursors in vitro

A.V. Karlov, I.A. Khlousov, M.V. Chaikina, T.V. Drouzhinina

Томский филиал ФГУ «РНЦ "ВТО" им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий» (г. Томск)

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 механохимическим методом, влиять на колониобразующую активность пула родоначальных кроветворных клеток. Установлено, что $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$ стимулировал в жидкой 7-дневной культуре костного мозга мышей CBA/CaLac выход и пролиферативную активность прекурсоров, идентифицируемых при обычной окраске как гранулоцитарные колониобразующие 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 подобным эффектом не обладал. Отсутствие эффекта не было связано с цитотоксичностью изучаемых образцов. Стехиометрический ГАП не показал биоактивных свойств при 5-недельном растворении в модельной биологической жидкости (изотонический раствор хлорида натрия). В то же время $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$ защелачивал растворитель вследствие выхода катионов из молекулярной решетки. Таким образом, один из механизмов повышения колониобразующей способности родоначальных кроветворных клеток костного мозга связан с влиянием продуктов растворения наночастиц $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$.

Ключевые слова: синтетические гидроксилапатиты, катионы, миелокариоциты мыши, прекурсоры грануло- и моноцитопоза.

The potential of nano-scale particles of hydroxylapatite (HAP), its derivative with copper and zinc inclusion into apatite structure ($\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$), synthesized by the mechanochemical method, to influence the colony-forming activity of hemopoietic progenitor cell pool has been studied *in vitro*. $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$ has been established to stimulate the output and proliferative activity of precursors, identified by routine staining as granulocytic colony-forming units (GCFU-G) in bone marrow liquid 7-day culture of CBA/CaLac mice. Besides, $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$ increased the cloning effectiveness of monocyte progenitor cells (CFU-M) as well. But, at the same time, synthetic stoichiometric HAP had no such an effect. The effect absence was not connected with cytotoxicity of the samples studied. Stoichiometric HAP didn't demonstrate bioactive properties in case of five-week dissolution in model biological liquid (isotonic solution of sodium chloride). At the same time $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$ alkalinized a solvent due to cations' coming out from molecular matrix. Thus, one of the mechanisms of colony-forming potential increase of bone marrow progenitor hemopoietic cells is connected with the effect of $\text{HAP}_{\text{Cu,Zn}}$ nano-particle dissolution products.

Keywords: synthetic hydroxylapatites, cations, mouse myelokaryocytes, granulocyte- and monocytopoiesis 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 доставки 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 [9].

Кроме того, как источник кальция фосфаты кальция интересны в плане регуляции стволовых

клеток, группирующихся в костном мозге вблизи костной ткани [6]. Известна активность катионов меди и цинка [10, 11] на уровне пула стволовых и родоначальных кроветворных клеток. С другой стороны, существует проблема внутриклеточной доставки ионизированных частиц.

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

Данная работа посвящена изучению эффектов наночастиц синтетических ГАП как потенциальных средств доставки биологически активных катионов на колониобразующую способность клеток-предшественников грануло- и моноцитопоза в многоклеточной системе.

Механохимический синтез наноразмерного ГАП проводили, как описано нами ранее [7]. Был синтезирован гидроксилapatит 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 сверхстехиометрии в его решетку ионов цинка и меди в количестве, соответствующем среднему 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 таблице 1, подтверждены данными рентгенофазового анализа (РФА) и инфракрасной спектроскопии (ИКС) (рис. 2, 3).

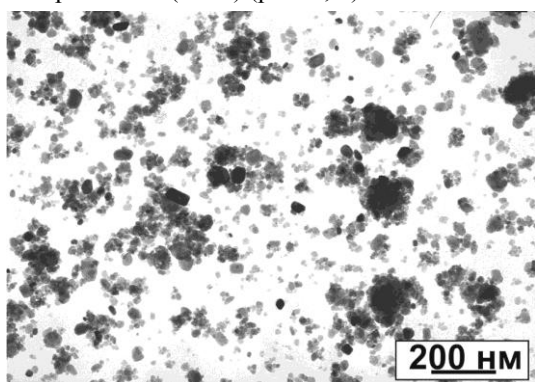


Рис. 1. Электронная микроскопия частиц механохимически синтезированного гидроксилapatита. Увеличение – 75000

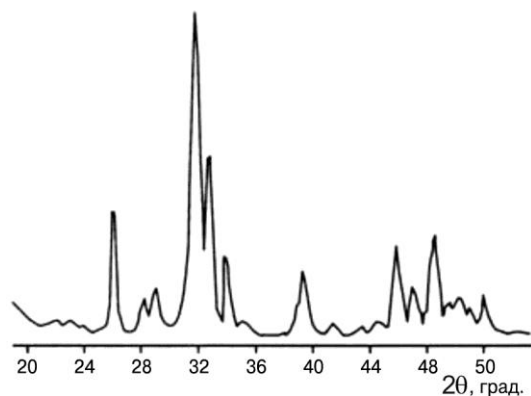


Рис. 2. Рентгенограмма апатита с включением в решетку ионов цинка и меди сверхстехиометрии

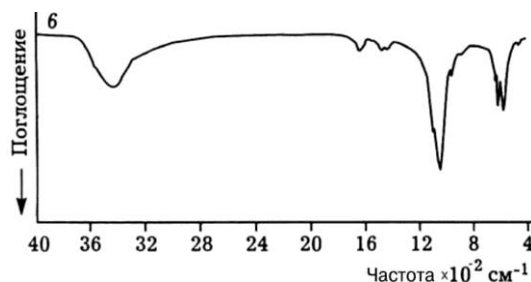


Рис. 3. Инфракрасный спектр апатита с включением в решетку ионов цинка и меди сверхстехиометрии

Определяли pH 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/СаLac. 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 часа с нанопорошками (0,1 мг/мл культуры клеток) стехиометрического (Са/Р=1,67) ГАП, ГАП_{Cu,Zn} с введением в решетку меди и цинка. 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 определяли в тесте с 0,4 % трипановым синим до и через 24 часа после культивирования с миелокариocyтами в описанных выше условиях.

Длительное (в течение 7 дней) клонирование клеток костного мозга проводили в 35-мм чашках Петри при 37 °С и 5 % CO₂ в концентрации $0,75 \times 10^6$ 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 определяли число клеточных делений по методике, описанной ранее [8].

Статистическую обработку результатов проводили согласно непараметрическому U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (P_U) и T-критерию Вилкоксона (P_T).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показали неоднозначные результаты (табл. 1). Наночастицы ГАП с катионной модификацией сверх стехиометрии ($\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$) стимулировали в культуре *in vitro* выход родоначальных клеток грануло- и моноцитопозза. Цитологический анализ показал, что число КОЕ-Г, вступающих в деление, возрастало по сравнению с контрольной культурой клеток до 272-282 %. Более того, после воздействия 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 $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$ количество клеток в индивидуальных колониях соответствовало 8-10 митозам (рис. 4). Согласно кинетическим параметрам кроветворных клеток [4], речь может идти о грануломоноцитарных прекурсорах (КОЕ-ГМ), дифференцирующихся в пролиферирующие унипотентные предшественники.

Таблица 1

Содержание 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	100	
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ стехиометрический	231	183
$\text{Ca}_{10}(\text{Cu,Zn})_{0,08}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,16}$	272* P=0,02	282* P=0,036

Примечание: n – число исследованных образцов; P – статистически значимые различия с контролем согласно U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

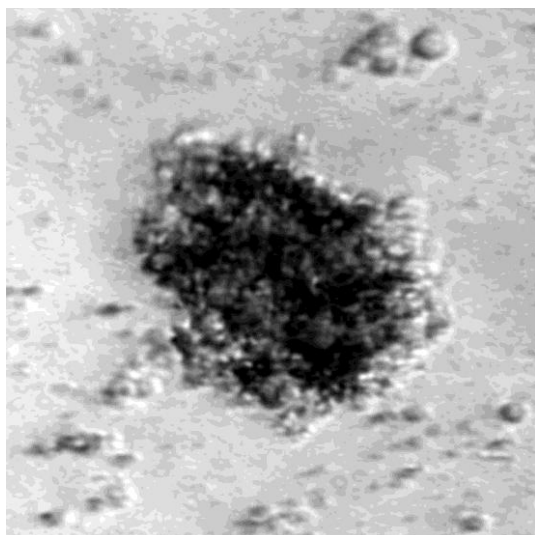


Рис. 4. Колония кроветворных клеток, выросшая на 7-е сутки культивирования в жидкой питательной среде в присутствии наночастиц гидроксилапатита. Скопления наночастиц в пределах колонии визуализированы посредством контрастирования снимка в оттенках серого цвета. Увеличение – 150

Стимулирующее влияние наночастиц $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$ 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, 10, 12].

Вместе с тем, синтетический стехиометрический ГАП не обладал статистически значимым колониестимулирующим влиянием (табл. 1). При этом отсутствие биологического эффекта не было связано с цитотоксичностью изучаемых образцов (табл. 2). Известна малая растворимость стехиометрического ГАП в области физиологических значений $\text{pH}=7,2$ [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, $\text{ГАП}_{\text{Cu,Zn}}$, но не стехиометрический ГАП, вызывал стабильное ($P_T < 0,05$) превышение значений pH по сравнению с растворителем (рис. 5).

Таблица 2

Показатели выживаемости миелокариоцитов (%) в 24-часовых клеточных культурах, X

Исследуемый образец, n=3	Число жизнеспособных клеток костного мозга
Контроль	85,39 $n_1=9$
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ стехиометрический	77,37 $n_1=15$
$\text{Ca}_{10}(\text{Cu,Zn})_{0,08}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2,16}$	81,30 $n_1=10$

Примечание: n_1 – число определений.

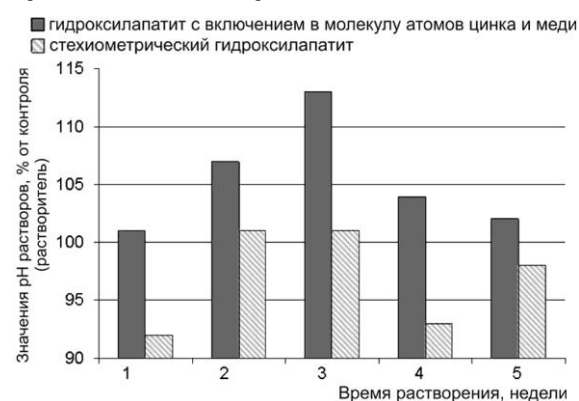


Рис. 5. Динамика изменений pH экстрактов при длительном растворении различных образцов наноразмерного синтетического гидроксилапатита

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_{Cu,Zn}.

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

и биологических молекул. Биологические молекулы, включая белки, легко адсорбируются на поверхности ГАП [9, 12]. Однако не всегда применение таких комплексов сопровождается достижением желаемого результата [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, один из механизмов позитивной реакции родоначальных кроветворных клеток костного мозга на добавление наночастиц ГАП_{Cu,Zn} in vitro может быть связан с влиянием продуктов их растворения. Манипуляции на атомарном и молекулярном уровнях (10^{-10} - 10^{-12} м) способствуют созданию неорганических, компо-

зитных, биоактивных наноматериалов, что позволяет решить многие проблемы (стерилизация, активность гибридных материалов, дороговизна и т.д.), тормозящие развитие современной биотехнологии.

Работа выполнена в рамках проекта Европейской комиссии NMP3-СТ-2003-504937.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологические методы лечения онкологических заболеваний : пер. с англ. / под ред. В. Т. Де Вита, С. Хеллмана, С. А. Розенберга. - М., 2002. - 936 с.
2. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ / А. П. Каплун [и др.] // Вопросы медицинской химии. - 1999. - № 1. - С. 3-12.
3. Регуляция поведения клеток фосфатами кальция in vitro, синтезированными механохимическим методом / А. В. Карлов [и др.] // 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. - 312 с.
5. Малышева, А. Ю. Регулирование биологической совместимости апатитсодержащих имплантационных материалов / А. Ю. Малышева, Б. И. Белецкий // 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. - 216 с.
7. Механохимический синтез нестехиометрических и замещенных апатитов с наноразмерными частицами для использования в качестве биосовместимых материалов / М. В. Чайкина [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. - 2004. - Т. 12. - С. 389-399.
8. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В. П. Шахов [и др.]. - Томск, 2004. - 386 с.
9. Chowdhury, E. H. A bio-recognition device developed onto nano-crystals of carbonate apatite for cell-targeted gene delivery / E. H. Chowdhury, T. Akaike // Biotechnol. Bioeng. - 2005. - Vol. 90, No 4. - P. 414-421.
10. Hock, H. Zinc-finger transcription factor Gfi-1 : versatile regulator of lymphocytes, neutrophils and hematopoietic stem cells / H. Hock, S. H. Orkin // Curr. Opin. Hematol. - 2006. - Vol. 13, No 1. - P. 1-6.
11. Copper(II)2(3,5-diisopropylsalicylate)4 stimulates hemopoiesis in normal and irradiated mice / L. S. Soderberg [et al.] // Exp. Hematol. - 1988. - Vol. 16, No 7. - P. 577-580.
12. Xie, J. Adsorption of serum fetuin to hydroxylapatite does not contribute to osteoblast phenotype modifications / J. Xie, M. J. Baumann, L. R. McCabe // J. Biomed. Mater. Res. - 2005. - Vol. 73, No 1. - P. 39-47.

Рукопись поступила 15.09.06.