

УДК 616.54.182

© Коллектив авторов, 2012.

МЕХАНИЗМЫ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ПЕГИЛИРОВАННОЙ С ПОМОЩЬЮ НАНОТЕХНОЛОГИИ ЭЛЕКТРОННО-ЛУЧЕВОГО СИНТЕЗА ГИАЛУРОНАТ-ЭНДО-В-N- АЦЕТИЛГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ

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

*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 HEPATOPROTECTOR EFFECTS 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, A.V. Artamonov*, A.A. Bekarev*, P.G. Madonov*, D.N. Kinsht*, N.A. Klimenko

SUMMARY

Experiments were performed on the model of C1₄-hepatitis. High hepatoprotector activity of electron-beam synthesis nanotechnology pegylated hyaluronate-endo-β-N-acetylhexosaminidase, consisted in anticholestatic, antiinflammatory and antisclerotic actions, was shown. These effects were developed against a background of bone marrow multipotent cell-progenitors stimulation and their mobilization in the peripheral blood and migration in target organ, accompanied by increasing number of parenchymatous progenitor elements in liver. The decrease of SDF-1-factor production by stromal bone marrow elements against a background of rising secretion of this factor by cells of hepatic tissue microenvironment is seems to be the mechanism of directed migration of progenitor cells.

МЕХАНІЗМИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНИХ ЕФЕКТИВ ПЕГІЛІРОВАНОЇ ЗА ДОПОМОГОЮ НАНОТЕХНОЛОГІЇ ЕЛЕКТРОННО-ПРОМЕНЕВОГО СИНТЕЗУ ГІАЛУРОНАТ-ЕНДО-В-N- АЦЕТИЛГЕКСОЗАМІНІДАЗИ

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

РЕЗЮМЕ

В експерименті на моделі C1₄- гепатиту показана висока гепатопротекторна активність пегілірованої за допомогою нанотехнології електронно-променевого синтезу гіалуронат-ендо-β- N-ацетилгексозамінідази, що полягає в антихолестатичній, протизапальній і протисклеротичній дії. Виявлено, що вказані ефекти розвиваються на тлі стимуляції мультипотентних клітин-попередників кісткового мозку, їх мобілізації в периферичну кров і міграції в орган-мішень, що супроводжується зростанням числа паренхіматозних прогениторних елементів у печінці. При цьому механізмом спрямованої міграції родоначальних клітин є зниження продукції SDF- 1-фактору стромальними кістковомозковими елементами на тлі збільшення вироблення цього чинника клітинами мікрооточення тканини печінки.

Ключевые слова: хронический гепатит, гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидаза, гиалуронидаза, нанотехнологии, регенеративная медицина.

Заболелания печени являются весьма распространенными во всем мире и занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости и смертности населения. Недостаточная эффективность существующих гепатопротекторов определяют необходимость разработки новых патогенетически обоснованных методов и средств для лечения патологических состояний печени. Полученные в последние годы сведения о свойствах и закономерностях жизнедеятельности мультипотентных клеток-предшественников открыли возможность развития нового направления в лечении многих заболеваний – с помощью клеточной терапии [2, 7, 14]. При этом наиболее физиологичным подходом к решению задач регенеративной

медицины является фармакологическая стимуляция эндогенных стволовых клеток (СК) [8, 9]. Ранее в экспериментах *in vitro* и *in vivo* нами была показана возможность модификации функций прогениторных клеток различных классов с помощью нативной гиалуронидазы [4, 6]. В определенных условиях данный фермент расщепляет гиалуроновую кислоту межклеточного матрикса до полимеров [13, 15], активирующих процессы клеточного деления и дифференцировки, а также вызывает усиление индуцируемого внешними факторами выхода СК в кровь.

Целью настоящей работы явилось исследование гепатопротекторных свойств препарата пегилированной с помощью нанотехнологии

электронно-лучевого синтеза гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминадазы (Пэг-ГЭАГА) (представляющей собой высокоочищенную тестикулярную гиалуронидазу) и механизмов их развития, связанных с функционированием прогениторных клеток различных классов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 56 беспородных крысах, массой 250-300 г, и 115 мышах-самцах линии СВА/СaLac в возрасте 2-х месяцев, массой 18-20 г. Животные получены из питомника экспериментально-биологической клиники лабораторных животных ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (сертификат имеется). У крыс хронический гепатит (ХГ) моделировался внутрижелудочным введением 50% раствора CCl_4 на оливковом масле в дозе 2 мл/кг в течение 3-х недель 2 раза в неделю (6 раз). У мышей поражение печени вызывали внутрижелудочным введением тетрахлоруглерода (ТХУ) в виде 20% раствора на оливковом масле в объеме 0,2 мл/мышь живого веса по той же схеме. Пэг-ГЭАГА вводили внутрижелудочно, начиная с 19 дня (на 3-е сут после последнего введения ТХУ): крысам в дозе 35 ЕД/кг/сут в течение 2 сут; и в дозах 35 и 50 ЕД/кг через день в течение 10 сут; мышам в дозе 50 ЕД/кг/сут в течение 2 сут. При этом использовали препарат, разработанный совместно ООО «Саентифик фьючер менеджмент» и НИИ фармакологии СО РАМН. Иммуобилизация молекул фермента («ООО Саентифик фьючер менеджмент», г. Новосибирск) осуществлялась на низкомолекулярном полиэтиленоксиде (1,5 кДа) с помощью нанотехнологии радиационного синтеза с применением направленного потока ускоренных электронов [8]. Контрольным животным по схемам, аналогичным введению Пэг-ГЭАГА, в эквивалентных объемах вводили дистиллированную воду.

В ходе эксперимента у крыс оценивали их гибель, прирост массы тела, весовой коэффициент печени на 21-е и 40-е сут (отношение массы органа в мг к массе животного в г). Проводили биохимические исследования содержания в сыворотке крови аспартат-, аланин-аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) на 7, 14, 21, 28 и 40-е сут, а так же морфологическое исследование печени на 21-е и 40-е сут. С помощью средств компьютерной обработки графических данных на стандартной площади гистологических срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали количество клеток инфильтрата и на окрашенных пикрофуксином - определяли площадь коллагеновых волокон [1, 10].

У мышей на 21, 23 и 26-е сут методами клонирования *in vitro* определяли содержание

мезенхимальных клеток-предшественников (фибробластных колониеобразующих единиц (КОЕ-Ф)) в костном мозге и периферической крови [5], количество паренхиматозных СК в печени (КОЕ-Печ) [11]. Продукцию SDF-1-фактора клетками тканей оценивали по его содержанию в кондиционных средах с помощью иммуоферментного анализа с использованием наборов фирмы R&D Systems (США) согласно прилагаемым методическим указаниям. Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента и непараметрического *U*-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента гибель крыс началась после 3-го введения CCl_4 и к концу эксперимента составила 10%. На вскрытии у погибших животных печень была увеличена в размере, желтого цвета, глинистой консистенции с очагами кровоизлияний и макроскопическими признаками острой дистрофии печени. Исследование общих изменений состояния экспериментальных животных в процессе развития токсического гепатита выявило значительное снижение процента прироста массы крыс. При этом у животных, получавших Пэг-ГЭАГА, значения данного показателя существенно превышали таковые в контроле. В то же время различий массы печени и ее весового коэффициента между контрольной и опытными группами выявлено не было.

Результаты биохимических исследований сыворотки крови показали значительное повышение активности АлАТ, АсАТ и ЩФ в контрольной и опытной группах. Однако у крыс получавших препарат Пэг-ГЭАГА концентрация ЩФ в сыворотке была достоверно ниже, чем у животных, которым вводили физиологический раствор (табл.1).

При гистологическом исследовании препаратов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, в контрольной группе отмечалось выраженное нарушение долькового строения печени. На препаратах были видны поля грануляционной ткани, замещающей погибшие гепатоциты, в которых происходило новообразование сосудов и печеночных протоков. В большом количестве встречались тельца Каунсильмена, а в сохранившихся гепатоцитах выраженная крупнокапельная жировая дистрофия. При этом отдельные клетки, сливаясь, образовали жировые кисты. В то же время имела место значительная регенерационная гипертрофия печеночных клеток и обилие митозов гепатоцитов. При этом наиболее выраженными данные изменения были на 21-е сут опыта. В то же время введение Пэг-ГЭАГА во всех случаях приводило к достоверному снижению количества клеток в инфильтрате на 21-е сут эксперимента и уменьшению площади соединительной ткани на 40-

Таблица 1

Содержание АлАТ, АсАТ и ЩФ в сыворотке крови, количество клеток воспалительного инфильтрата на стандартную площадь среза печени (ККВИ) и относительная площадь коллагеновых волокон в печени (ОПКВ) беспородных крыс при хроническом токсическом гепатите (1) и при введении пегилированной гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы 35 ЕД/кг/сут в течение 2 сут (2), в дозе 50 ЕД/кг через день в течение 10 суток (3) и в дозе 35 ЕД/кг через день в течение 10 суток (4) на фоне моделирования патологии печени, ($X \pm m$)

Сроки исследования, сутки		Биохимические показатели			Морфологические показатели	
		АлАТ (мккат/л)	АсАТ (мккат/л)	ЩФ (Е/л)	ККВИ (ед.)	ОПКВ (%)
фон		0,30 \pm 0,03	0,27 \pm 0,01	255,17 \pm 27,37	255,00 \pm 3,77	1,08 \pm 0,13
21-е	1	0,54 \pm 0,02*	0,44 \pm 0,02*	1011,1 \pm 45,5*	473,00 \pm 17,39*	3,13 \pm 0,31*
	2	0,48 \pm 0,04*	0,36 \pm 0,04*	619,7 \pm 100,8* #	376,6 \pm 18,3* #	3,46 \pm 0,55*
	3	0,52 \pm 0,02*	0,44 \pm 0,03*	823,9 \pm 54,04* #	277,00 \pm 18,6 #	3,05 \pm 0,25*
	4	0,47 \pm 0,05*	0,36 \pm 0,03*	575,8 \pm 113,3* #	307,2 \pm 12,3* #	3,40 \pm 0,12*
40-е	1	0,29 \pm 0,02	0,38 \pm 0,01*	155,30 \pm 15,07*	545,33 \pm 21,56*	5,69 \pm 0,35*
	2	0,24 \pm 0,02	0,39 \pm 0,01*	133,42 \pm 18,75*	534,80 \pm 54,84*	5,45 \pm 0,60*
	3	0,25 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	98,92 \pm 5,27*#	418,67 \pm 15,44*#	3,79 \pm 0,26* #
	4	0,25 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	140,92 \pm 10,20*	460,00 \pm 22,08*#	3,79 \pm 0,22* #

Примечание: *- отмечена достоверность различий показателей с фоновыми значениями при $p < 0,05$; # - отмечена достоверность различий показателей с контролем при $p < 0,05$.

е сут по сравнению с контролем (табл. 1). В то же время сохранялась жировая дистрофия гепатоцитов, которая, однако, была преимущественно мелкокапельная.

В целом, исследования состояния печени у крыс с помощью биохимических и морфологических методов выявило наличие выраженных гепатопротекторных свойств у препарата имГД, заключающихся в антихолестатическом (снижение концентрации ЩФ в сыворотке крови), противовоспалительном и противосклеротическом действии.

Учитывая сведения литературы и полученные в ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН ранее результаты о принципиальной возможности и эффективности стимуляции функций, в том числе пролиферативной активности и способности к мобилизации, прогениторных клеток с помощью препарата нативной гиалуронидазы [6, 8], было проведено исследование влияния Пэг-ГЭАГА на состояние пула костномозговых, циркулирующих и регионарных печеночных предшественников.

Введение ТХУ приводило к достоверному снижению количества тканеспецифических колониобразующих клеток в печени на фоне возрастания числа КОЕ-Ф в костном мозге

(содержащих в своем составе, помимо коммитированных стромальных прекурсоров, истинные/мультипотентные СК [2, 11]) (рис.1). Указанные данные, вероятно, явились, в первом случае, следствием токсического действия ТХУ на регионарные СК органа-мишени [11], и стимуляции популяции костномозговых СК (представляющих собой «глубокий резерв» регенерации [2]), как результат активации стресс-реализующих систем организма – во втором. Вместе с тем накопление СК в исследуемой ткани-депо [2, 9] не сопровождалось их выходом в периферическую кровь (рис. 1).

Таким образом, возможность развертывания одного из наиболее эффективных механизмов регенерации (за счет миграции СК из резервных источников) оказывалась не реализованной, что полностью совпадает с полученными нами ранее сведениями о несостоятельности механизмов компенсации «глубокого резерва» в условиях хронического токсического гепатита [11].

Введение Пэг-ГЭАГА вызывало существенно более раннее и значительное увеличение числа КОЕ-Ф в костном мозге: до 293,2%, 164,6% и 151,2% от контроля на 21, 23 и 26 сут соответственно. Причем, данные изменения наблюдались на фоне резкого возрастания содержания мезенхимальных

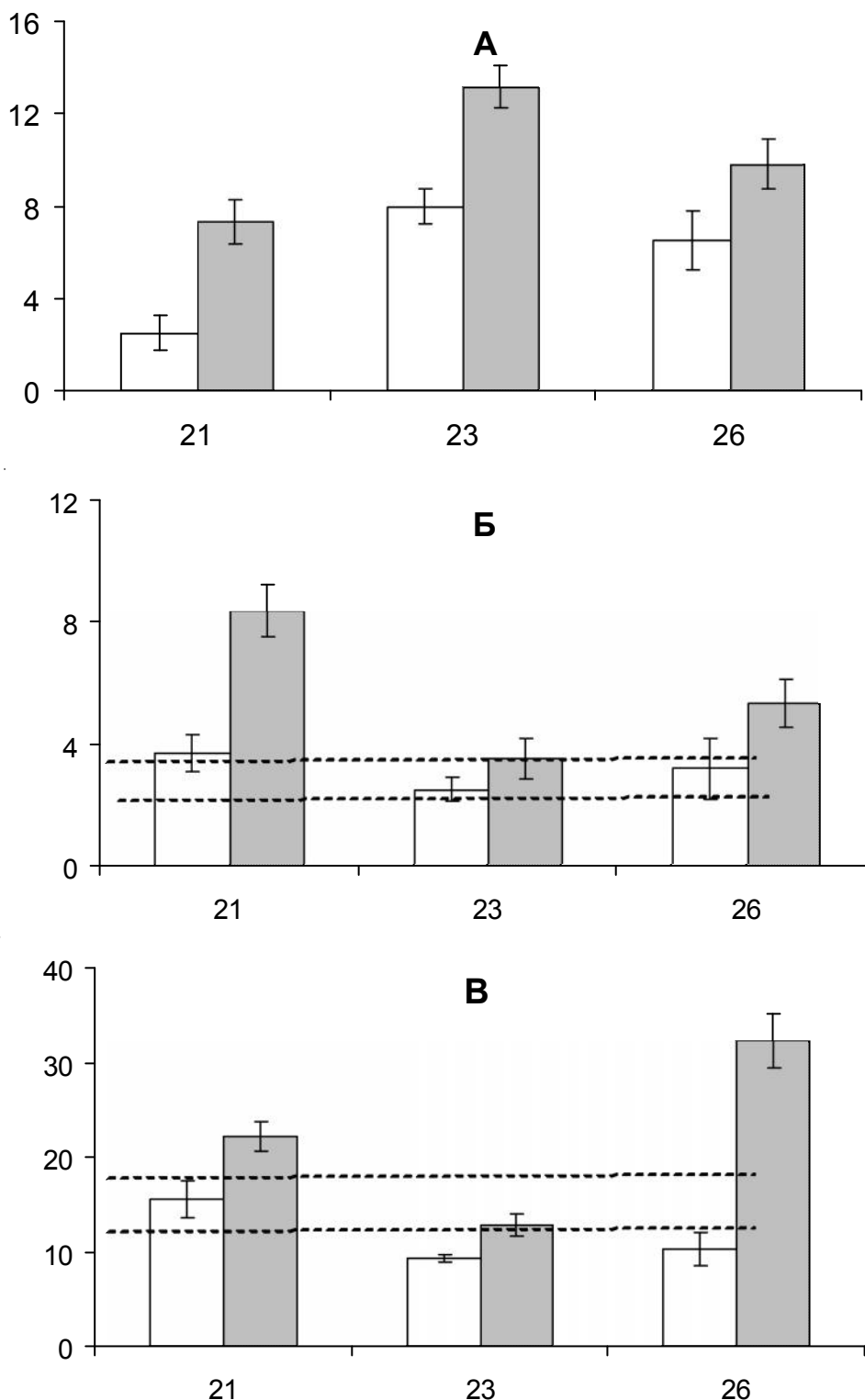


Рис. 1. Содержание КОЕ-Ф в костном мозге (А) и периферической крови (Б), КОЕ-Печ в печеночной ткани (В) у мышей линии СВА/Салас при хроническом токсическом гепатите (белые столбики) и введении пегилированной гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы на фоне моделирования патологии печени (заштрихованные столбики).

По оси абсцисс – сроки исследования (сутки), по оси ординат – значения показателя: А – на $2,5 \times 10^5$ миелокариоцитов; Б - на $2,5 \times 10^5$ мононуклеаров; В - на 10^5 нуклеаров. Доверительные интервалы при $p < 0,05$. Область межпунктирного пространства – область доверительного интервала значения показателя у интактных мышей при $p < 0,05$.

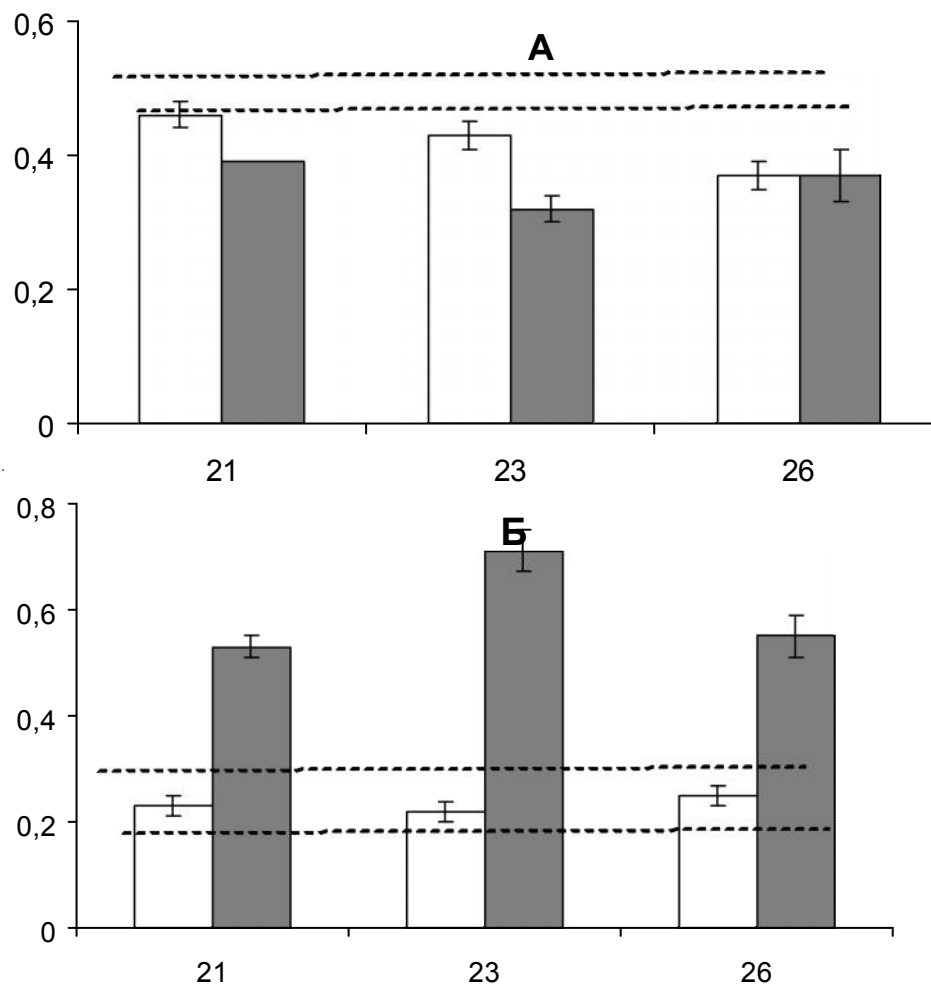


Рис. 2. Содержание SDF-1-фактора в кондиционных средах прилипающих клеток костного мозга (А) и клеток печени (Б) мышей линии СВА/Салас при хроническом токсическом гепатите (белые столбики) и введении пегилированной гиалуронат-эндо-в-N-ацетилгексозаминазы на фоне моделирования патологии печени (заштрихованные столбики).

По оси абсцисс – сроки исследования (сутки), по оси ординат – значения показателя в нг/мл (нанограмм на мл). Доверительные интервалы при $p < 0,05$. Область межпунктирного пространства – область доверительного интервала значения показателя у интактных мышей при $p < 0,05$.

предшественников в периферической крови (с максимумом до 294,3% от фона на 21-е сут опыта) и сопровождалась повышением количества КОЕ-Печ в печени, достигающего наибольших значений к концу наблюдений (26-е сут) - до 311,4% от аналогичного параметра у контрольных мышей (рис. 2).

Развитие описанных феноменов, очевидно, явилось следствием активации пролиферативных процессов ранних клеток-предшественников «ткане-депо», их мобилизацией и направленным хомингом в пораженную печень [2, 9].

Согласно современным представлениям, одним из основных факторов миграции СК является SDF-1-фактор, продуцируемый в организме стромальными клетками различных тканей и обеспечивающий таксис и хоминг клеток, связывающихся с данным веществом посредством специфических рецепторов CXCR4 по градиенту его концентрации *in situ* [12].

В связи с этим было изучено влияние препарата на продукцию SDF-1-фактора клетками микроокружения костного мозга и печеночной ткани.

Действие токсического агента вызывало достоверное прогрессирующее снижение содержания SDF-1 в кондиционных средах прилипающих клеток костного мозга, но не оказывало влияния на продукцию данного фактора клетками печени (рис. 2). Последнее обстоятельство, по-видимому, является одной из причин недостаточности механизмов компенсации данной патологии, связанных с регенеративным потенциалом СК «ткане-депо» [2, 9].

Вместе с тем введение препарата Пэг-ГЭАГА вызывало еще более выраженное, чем в контрольной группе, падение выработки SDF-1 миелокариocyтами на фоне, напротив, резкого

возрастания его продукции клетками микроокружения органа-мишени (до 230,4%, 322,7% и 220,0% от контрольных значений на 21, 23-е и 26-е сут соответственно).

В целом, полученные результаты свидетельствуют о выраженных гепатопротекторных свойствах пегилированной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидазы. При этом механизмами терапевтической активности препарата, очевидно, являются стимуляция функциональной активности СК костного мозга и их миграция в орган-мишень с дальнейшей реализацией ростового потенциала либо в тканеспецифичные клетки, либо в элементы микроокружения, которые опосредованно определяют ускоренное течение репаративных процессов [2, 6, 9]. При этом выявленный феномен, свидетельствующий об избирательности и разнонаправленности действия Пэг-ГЭАГА в отношении клеток «ткани-депо» и органа-мишени, продуцирующих SDF-1-фактор, а также сведения литературы о повышении адгезивных свойств СК, подвергшихся воздействию фермента [3], позволяют говорить об исключительно высокой эффективности развертывания миграционных процессов, связанных с наличием как гуморальных, так и клеточных механизмов, предрасполагающих к максимально выраженной направленности миграции СК.

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. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. - М.: Медицина, 1990. - 382 с.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. - 142 с.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. Механизмы мобилизации мезенхимальных клеток-предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и гиалуронидазой // Бюл. эксперим. биол. и медицины. - 2007. - № 12. - С. 652-656.
4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Симанина Е.В., Гурьянцева Л.А. Роль гиалуронидазы в регуляции функций мезенхимальных клеток-предшественников // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2007. - №2. - С. 115-119.
5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. - Томск: Изд-во ТГУ, 1992. - 272 с.
6. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Верещагин Е.И., Удуг Е.В., Хричкова Т.Ю., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Андреева Т.В., Минакова М.Ю., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы // Вестник РАМН. - 2009. - № 11. - С. 6-9.
7. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Удуг Е.В., Хричкова Т.Ю., Минакова М.Ю., Ермакова Н.Н., Фирсова Т.В. Влияние трансплантации мононуклеаров периферической крови, полученных с использованием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и гиалуронидазы, на регенерацию кроветворной ткани при миелосупрессии // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2009. - №3. - С. 136-142.
8. Дыгай А.М., Верещагин Е.И., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Мадонов П.Г., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Удуг Е.В., Хричкова Т.Ю., Мирошниченко Л.А., Минакова М.Ю., Ермакова Н.Н., Фирсова Т.В. Мобилизация прогениторных клеток в кровь с помощью иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2009. - №2. - С. 63-66.
9. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Клеточная терапия: новые подходы // Наука в России - Москва: Изд-во «Наука», 2009. - Том. 169. - №1. С. 4-8.
10. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. - Медицина; Ленинградское отд., 1969. - 405 с.
11. Эпштейн О.И., Штарк М.Б., Дыгай А.М., Сергеева С.А., Гольдберг Е.Д., Петров В.И., Воронина Т.А., Старостина М.В. Фармакология сверхмалых доз антител к эндогенным регуляторам функций. - Москва: Изд-во РАМН, 2005. - 224 с.
12. Kucia M., Reza R., Miecus K. e.a. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: Pivotal role of the SDF-1 - CXCR4 axis // Stem cells. - 2005. - № 23. - P. 879-894.
13. Noble P.W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. // Matrix Biol. - 2002. - N. 21. - P.25-29.
14. Owen M., Friedenstien A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors // Ciba Found Symp. - 1988. - V. 136. - P. 42-60.
15. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? // Glycobiology. - 2003. - Vol.13 (12). - P. 105-115.