

УДК 612.681::683

Ю.И. Янцен, Ш.Н. Аскарова*

Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Мезенхимальные стволовые клетки модифицированные остеоспецифичным полимером как основа для регенерации костной ткани

Нарушение костного метаболизма при таких заболеваниях как остеопороз или болезнь Педжета приводит к усилению остеокластной активности и потере остеобластных клеток. Для восполнения пула остеобластов было предложено применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). С целью разработки тканеспецифичных систем доставки клеток к очагам повреждения костной ткани, нами был синтезирован полимер, способный стабильно связываться с МСК и обладающий тропностью к костной ткани. Была оценена цитотоксичность полимера и его влияние на процессы остеогенной дифференцировки МСК *in vitro*.

Ключевые слова: остеопороз, костный метаболизм, мезенхимальные стволовые клетки, АТРП синтез, клеточная терапия, целенаправленная доставка клеток

Ю.И. Янцен, Ш.Н. Аскарова

Остеоспецификалық полимермен түрлендірілген мезенхимальды өзекті жасушалар сүйек ұлпасы регенерациясының негізі

Остеопороз немесе Педжет ауруы сияқты аурулар кезінде сүйектегі зат алмасудың бұзылуы остеокластық белсенділіктің өсуіне және остеобластардың санының төмендеуіне себеп болады. Остеобластардың санын өсіру үшін аутологиялық мезенхимальды өзекті жасушаларды (МӨЖ) қолдануы әдістемесі ұсынылды. Сүйек ұлпасының зақымдалу ошақтарына клеткаларды жеткізу үшін, арналған ұлпаларға бағытталған жүйелерді жасау мақсатында, МӨЖ-мен тұрақты байланысатын және сүйек ұлпасына тропты полимер синтезтелді. Полимердің цитотоксикалық әсері жіне оның *in vitro* жағдайында МӨЖ-дің остеогенді дифференциациясына әсері бағаланды.

Түйін сөздер: остеопороз, сүйек метаболизмі, мезенхимальды өзекті клеткалар, атомдық трансферлік радикальді полимерлердің синтезі, жасушалық терапия, клеткалардың бағытталған тасымалдануы

Y. Yantsen, Sh. Askarova

Mesenchymal stem cells coated with osteophilic polymer as a foundation for bone regeneration.

Bone remodeling is a process orchestrated by two types of cells: osteoblasts and osteoclasts. Induced osteoclastic activity and reduction of osteoblasts result in progressive bone loss, which could be amended by introduction of mesenchymal stem cells (MSCs). Bone targeted MSCs delivery can potentially increase the efficiency of cell therapy and result in alleviation of such conditions as osteoporosis and Paget Disease. We have synthesized a novel polymer which shows high affinity to bone tissue and could be used to deliver MSCs to the site of bone injury or lesion. Cytotoxic effect of the polymer was evaluated and its effect on osteogenic differentiation was shown *in vitro*.

Key words: osteoporosis, bone metabolism, mesenchymal stem cells, ATRP synthesis, cell therapy, targeted cell delivery

Остеопороз называют «тихой эпидемией XXI века». Согласно Международной Организации по вопросам остеопороза, в мире данным заболеванием страдают около 200 миллионов женщин. По данным ВОЗ остеопороз выявляет-

ся у каждой третьей женщины и у каждого пятого мужчины [1]. К 2050 году ожидается, что частота переломов шейки бедра, самого опасного и труднозаживаемого осложнения остеопороза, увеличится у мужчин на 310%, а у женщин на

240%. Такой неутешительный прогноз связан с глобальным старением человечества, т.е. увеличением числа пожилых людей, как во всем мире, так и в Казахстане.

Остеопороз представляет собой хроническое системное заболевание, поражающее костную ткань и сопровождающееся снижением плотности и прочности костей, прогрессирующей потерей костной массы и нарушением костной микроархитектоники, что в конечном итоге приводит к высокому риску переломов даже при минимальной травме, такой, как падение с высоты собственного роста. Снижение плотности костей или остеопения происходит в результате увеличения резорбции кости остеокластами в процессе костного метаболизма (обновления кости), возрастного уменьшения клеток-предшественников остеобластов и ослабленной абсорбции кальция [1].

В настоящее время существует несколько методов лечения остеопороза, но ни один из них не дает быстрого и однозначного результата. Наиболее успешными в лечении остеопороза являются лекарства на основе бисфосфонатных соединений. Бисфосфонаты являются аналогами пирофосфатов ($H_2O_3P-O-PO_3H_2$), где центральная гидролитически лабильная P-O-P связь заменена на гидролизоустойчивую P-C-P группу. Бисфосфонаты селективно взаимодействуют с гидроксиапатитными группами на резорбтивной поверхности костной ткани и приводят к нарушению образования остеокластов, их метаболизма и функциональной активности, а также стимулируют образование новой кости. В настоящее время препараты на основе бисфосфонатов применяются в медицинской практике для лечения таких заболеваний как остеопороз, болезнь Паджета и малигнантная гиперкальциемия. Бисфосфонаты также способны подавлять остеолитическую способность раковых клеток в костных тканях [2; 3].

Так как снижение плотности и прочности кости происходит не только из-за усиления функциональной активности остеокластов, а также в результате снижения количества остеобластов, другим перспективным направлением лечения остеопороза является клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками, являющимися предшественниками остеобластов. Хотя сведения о клиническом применении МСК при

остеопорозе пока не опубликованы, зато имеются исследования об использовании МСК для лечения костных дефектов – системных [4] или локальных [5; 6]. Так, например, Horwitz et al показали улучшение регенерации костной ткани при врожденном несовершенном остеогенезе. Аутологичные МСК вводили пациентам внутривенно и спустя три месяца было отмечено значительное увеличение минеральной плотности костей по сравнению с контрольной группой [4]. В исследованиях Gangji et al аутологичные клетки костного мозга применяли для лечения асептического остеонекроза головки бедра. Предполагаемый механизм действия клеток связан со стимуляцией остеогенеза за счёт «свежей» стромальной фракции и ангиогенеза за счёт CD34(+)-клеток в, так называемых, «мёртвых зонах» кости [7].

Исходя из вышесказанного, долгосрочной целью нашей работы является разработка метода стимулирования регенерации костной ткани при остеопорозе и схожих патологиях на основе мезенхимальных стволовых клеток и бисфосфонатов. Совместно с коллегами из Университета Карнеги –Мэллон (США) нами был синтезирован полимер, имеющий в своем составе две функциональные группы – бисфосфонатную и гидроксисукцинимидную (NHS). NHS-группа способна ковалентно связываться с аминными и карбоксильными группами, находящимися на поверхности клеточных мембран и призвана обеспечить взаимодействие полимера с мезенхимальными стволовыми клетками. В связи с тем, что бисфосфонаты имеют высокую степень сродства к гидроксиапатитам, составляющим почти 2/3 сухой массы кости, данный полимер, связанный с поверхностными молекулами клеток прекурсоров остеобластов, призван осуществлять тканеспецифическую доставку клеток в очаги поражения костной ткани, и таким образом, локализовать процессы клеточной репарации (Рис.1).

Принципиальная новизна предлагаемого метода заключается в комбинировании клеточной терапии МСК с использованием бисфосфонатного полимера, ответственного как за направленную доставку клеток-предшественников непосредственно к кости, так и за уменьшение резорбтивной активности в ткани. Мы надеемся, что объединение этих методов позволит более

эффективно подойти к проблеме регенерации костной ткани при остеопорозе и схожих патологиях.

В представленном исследовании нами была изучена способность мезенхимальных стволовых клеток стабильно связываться с остеофильным полимером и костной тканью *in vitro*, а также была проведена оценка его влияния на процессы пролиферации и остеогенной дифференциации МСК.

Материалы и методы исследований

Синтез и характеристика бисфосфонатного полимера (PBPfNHS)

Так как присоединение клеток к кости может зависеть от длины полимеров, для синтеза PBPfNHS метод радикальной полимеризации с переносом атома (ATRP), сущность которого заключается в контролируемом последовательном добавлении мономеров к одному концу растущей полимерной цепи, что способствует формированию популяции гомогенных молекул кополимеров и синхронному росту большей части молекул полимера. Базовой молекулой при синтезе являлся кополимер, состоящий из двух мономеров – биологически инертного N,N-диметилакриламида (ДМАА) и N'-гидроксисукцинимидного эфира N-акрилоил-6-аминогексановой кислоты (NHS) (Рис. 2а), с последующей полимеризацией и ковалентным присоединением бисфосфонатной (БФ) группы (Рис. 1б). Как уже упоминалось выше, БФ имеют высокую степень сродства к гидроксиапатитам и, таким образом, могут выступать в качестве остеофильного компонента данного синтетического полимера.

Реакция протекает в отсутствие следов влаги и воздуха в инертной атмосфере, и поэтому молекулы влагочувствительного NHS-мономера могут непосредственно встраиваться в растущую полимерную цепь. Так как количество NHS мономеров в начале реакции соотносимо с количеством NHS-групп в конечном продукте, это свойство может быть использовано для того, чтобы варьировать количество NHS-групп, и таким образом, количество БФ групп, что дает возможность контролировать эффективность связывания полимера с костью.

Для придания полимеру свойства присоединяться к клеткам, другой конец несет на себе NHS-группу, что обеспечивает его связывание

с amino- и карбоксильными группами на поверхности клеточных мембран (Рис. 1с). Для изучения способности полимера присоединяться к поверхности клеток, молекулы полимера были синтезированы с небольшим количеством флуоресцеина (2-3 единицы на одну полимерную цепочку). Это позволяет проводить флуоресцентный качественный и количественный анализ полимера как в связанном, так и свободном состоянии.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток

Для выделения мезенхимальных стволовых клеток использовался существующий протокол авторов Soleimani и Nadri [9]. Клетки выделяли из костного мозга, полученного из бедренных и большеберцовых костей четырехнедельных мышей.

*Изучение способности остеоспецифичного синтетического полимера стабильно связываться с мезенхимальными стволовыми клетками *in vitro**

Полимер (PBP-f-NHS) в концентрации 1 мг/мл инкубировали с МСК (1е6 клеток) на протяжении 10 минут в водяной бане в 1 мл PBS при pH 8.0 и 37°C. После инкубации взвесь клеток центрифугировали при x300g (rcf) в течение 5 минут и промывали в PBS при pH 7.4; процедуру повторяли три раза. Клетки высевали на культуральные чашки в питательной среде DMEM. После этого проводили микроскопический анализ – сначала в светлом поле, затем этот же участок фотографировали под излучением ультрафиолетовой лампы. Визуализация присоединенного полимера к клеткам была возможной благодаря флуоресцентной группе, находящейся в составе полимера.

Оценка влияния полимера на клеточную пролиферацию

МСК, модифицированные полимером, высевали в 96-ти луночные планшеты и инкубировали на протяжении 0, 1, 2, 4, 24, 48 и 72 часов при температуре 37°C, 5% CO₂. Для оценки цитотоксичности полимера и его влияния на рост клеток использовали тест Cell-Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA). Этот тест позволяет измерить количество АТФ, производство которого служит индикатором активного клеточного метаболизма [8]. Активный компонент теста, термостойкая люцифераза,

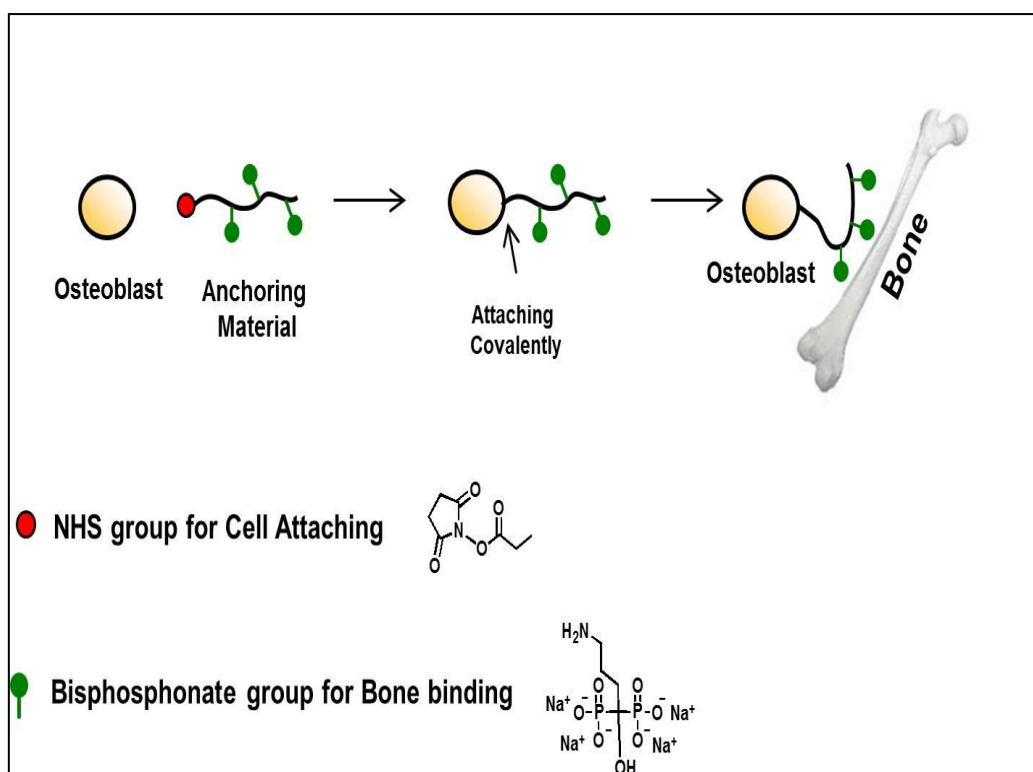


Рисунок 1 – Принцип действия синтетического остеофильного полимера

вступает в реакцию с люциферинном в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} , в результате чего образуется оксिलуциферин с выделением фотонов. Оценку количества люминесценции проводили с помощью микроплащечного ридера Biotek Hybrid Reader (Biotek, USA).

Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации МСК

Клетки, модифицированные полимером, высеивали в 24-х луночные планшеты и инкубировали в полной питательной среде DMEM (15% ФБС, 1% Пен/Стреп) на протяжении 12 часов. Затем среду заменяли на остеогенную (Stem-Pro Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen) и культивировали на протяжении 14 дней. Остеогенную среду меняли каждые 2-3 дня. В качестве контроля использовали мезенхимальные клетки не модифицированные полимером, но подвергшиеся тем же процедурам, или МСК, культивировавшиеся в простой питательной среде DMEM. Спустя 14 дней клетки окрашивали красителем на выявление активности щелочной фосфатазы – одного из первых индикаторов остеогенной дифференциации.

Изучение способности клеток, модифицированных полимером, стабильно присоединяться к фрагментам костной ткани in vitro

Для оценки способности клеток, модифицированных полимером, стабильно присоединяться к фрагментам костной ткани, 1.5 мл среды, содержащей модифицированные клетки, инкубировали с 3 мг костных фрагментов, полученных из большеберцовой кости крысы, на протяжении 20 минут, после чего костные фрагменты промывали в PBS и фиксировали с помощью 4% раствора формальдегида. В качестве контроля использовали полимер PAB-f-NHS, в котором активная бисфосфонатная группа, отвечающая за аффинность к костной ткани, была заменена на неактивную. Флуоресцентное микроскопирование проводилось с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX 83, оснащенного охлаждаемой CCD камерой при увеличении 40X, объектив NA 0.95. Для количественной оценки способности клеток, модифицированных полимером, стабильно присоединяться к костной ткани, был проведен анализ площади костных фрагментов, имеющих

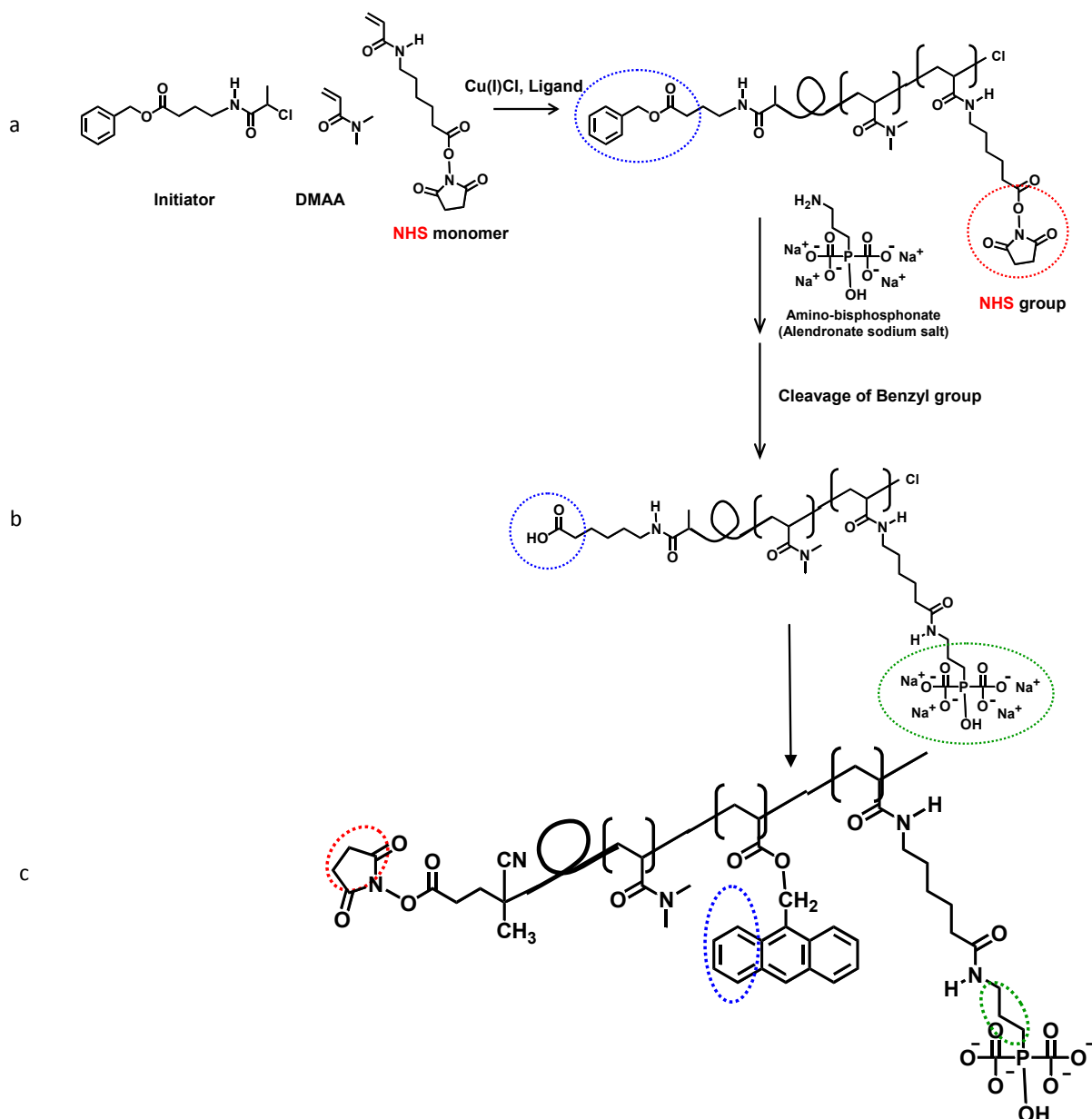


Рисунок 2 – Схема синтеза PBPfNHS

на своей поверхности флюоресцирующие клетки по отношению к общей площади фрагмента. В общей сложности было проанализировано 26 микрофотографий.

Статистический анализ

Полученные данные представлены в виде средней \pm стандартная погрешность средней величины (Mean \pm SEM). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью **t-критерия Стьюдента**. Значения считались достоверно различными при p

< 0.05 . Анализ данных проводился с использованием статистической программы SigmaPlot. Каждый эксперимент проводился как минимум в трех повторностях.

Результаты исследований и обсуждение

Изучение способности остеоспецифичного синтетического полимера стабильно связываться с мезенхимальными стволовыми клетками in vitro

Для оценки способности полимера взаимодействовать с МСК, клетки инкубировали с

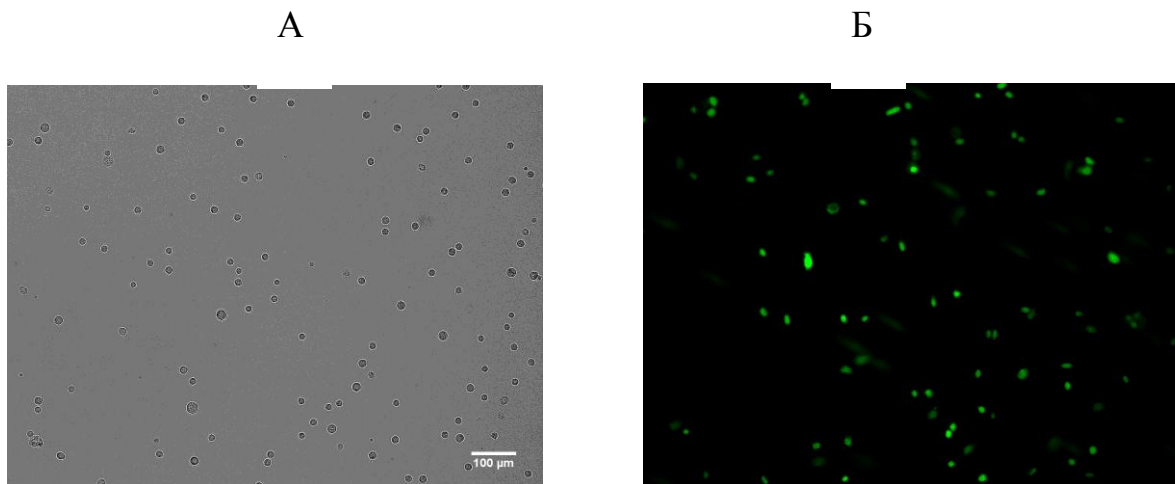


Рисунок 3 – МСК, связанные с полимером PBPfNHS в концентрации 1 мг/мл на $2 \pm 1 \times 10^5$ /мл клеток: А – светлое поле, Б - флуоресценция (длины волн возбуждения и эмиссии молекул флуоресцеина 480 нм и 520 нм соответственно). Обх10.

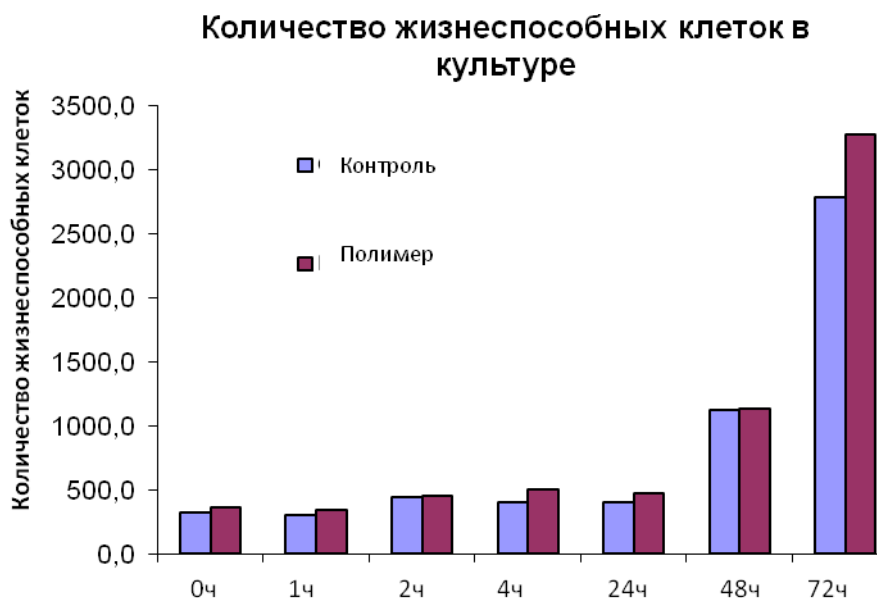


Рисунок 4 – Оценка краткосрочной и долгосрочной цитотоксичности PBPfNHS полимера

разными концентрациями полимера на протяжении разного времени. Анализ фотографий, сделанных в видимом и флуоресцентном свете, показывает, что 100% клеток хорошо видимы в зеленом спектре флуоресценции, что свидетельствует об успешном связывании PBPfNHS с клеточными мембранами (Рис. 3). При этом было показано, что наиболее эффективное связывание PBPfNHS с клетками происходило, когда клетки инкубировали с полимером в концентрации 1

мг/мл на $2 \pm 1 \times 10^5$ /мл клеток, при 37°C, pH 8.0 и времени инкубации 10 минут.

Изучение влияния остеоспецифичного синтетического полимера на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток.

Оценка цитотоксичности PBPfNHS проводилась при помощи теста Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA). На рисунке 4 представлены данные по интенсивности АТФ-индуцированной флуоресценции клеток,

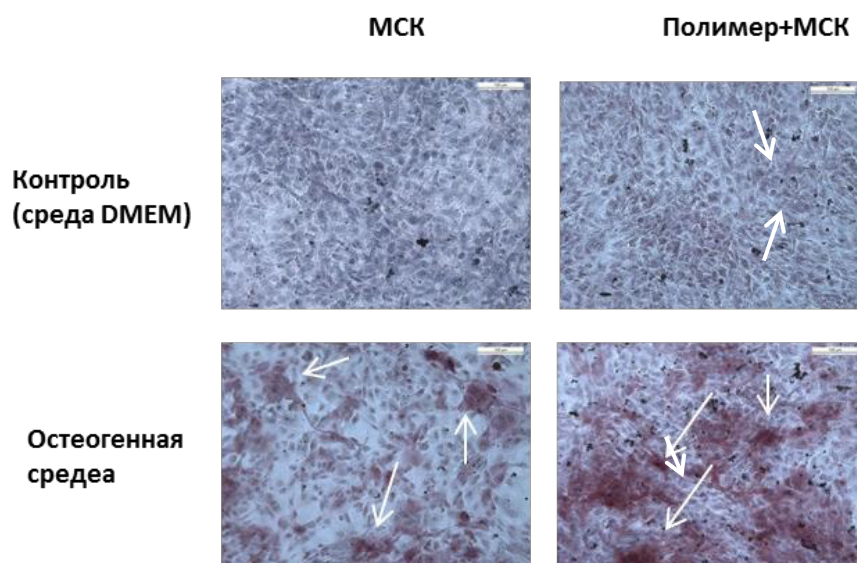


Рисунок 5 – Активность щелочной фосфатазы в МСК, культивируемых в среде DMEM и остеогенной среде. Обх20.

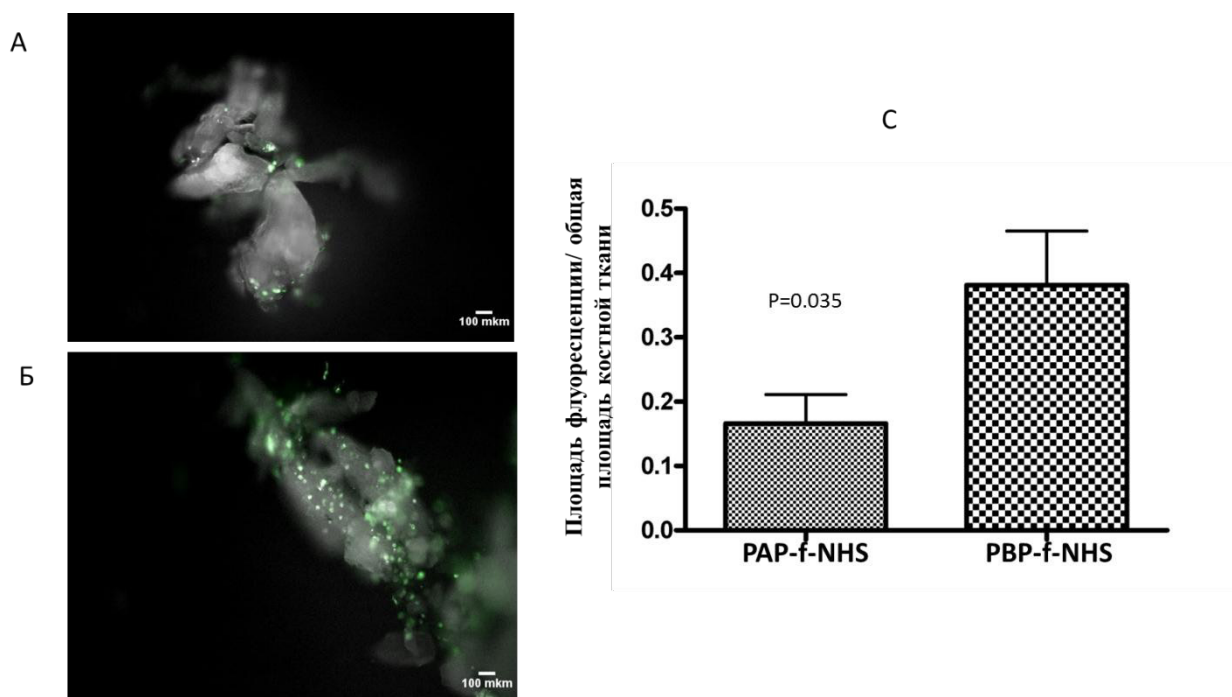


Рисунок 6 – Микрофотографии костных фрагментов, инкубированных с МСК, модифицированных полимером PABfNHS (А) и полимером PBPfNHS (Б); количественный анализ площади костных фрагментов, имеющих на своей поверхности флуоресцирующие клетки по отношению к общей площади фрагмента (С). Обх10

инкубированных с 1, 2, и 4 мг/мл PVPfNHS на протяжении 0-72 часов. Согласно полученным данным достоверной разницы между степенью пролиферации контрольных МСК и клеток, обработанных PVP-f-NHS, не наблюдалось. В связи с этим есть все основания полагать, что данный полимер не имеет выраженного краткосрочного (4 часа) и долгосрочного (72 часа) токсического эффекта на культуры мезенхимальных клеток *in vitro*.

Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференцировки МСК

На рисунке 5 приведены микрофотографии МСК, культивировавшихся либо в обычной DMEM, либо в остеогенной среде, и окрашенные реагентом, специфичным к щелочной фосфатазе. При взаимодействии красителя с клетками в местах повышенной активности щелочной фосфатазы появляется насыщенный розовый цвет (показан стрелкой).

Как видно из представленных микрофотографий, в контрольных МСК, культивировавшихся в обычной питательной среде, активности щелочной фосфатазы не наблюдается. На изображениях клеток, как связанных с полимером, так и немодифицированных, и культивировавшихся в остеогенной среде, степень распространения участков с высокой активностью щелочной фосфатазы практически одинакова. Таким образом, можно заключить, что полимер PVPfNHS не влияет на процессы остеогенной дифференцировки МСК.

Изучение способности клеток, модифицированных полимером, стабильно присоединяться к фрагментам костной ткани in vitro

Для оценки эффективности связывания модифицированных клеток с костной тканью, костные фрагменты инкубировали с МСК, после чего промывали, фиксировали и фотогра-

фировали в флуоресцентном свете (длины волн возбуждения и эмиссии молекул флуоресцеина 480 нм и 520 нм соответственно). На представленных микрофотографиях (Рис.6) хорошо видно большое количество модифицированных полимером PVPfNHS клеток, адгезированных на поверхности костных фрагментов. В то же самое время, когда костные фрагменты инкубировали с PAVfNHS (полимер, не содержащий бисфосфоната), количество адгезированных клеток было значительно меньшим. Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки, модифицированные PVPfNHS полимером, обладают способностью стабильно присоединяться к фрагментам костной ткани *in vitro*, и что именно наличие функциональных бисфосфонатных групп в структуре полимера обеспечивает его сродство к костной ткани.

В результате проведенных исследований была показана способность остеоспецифичного синтетического полимера стабильно связываться с мезенхимальными стволовыми клетками *in vitro*; при этом, наиболее эффективное связывание PVPfNHS с клетками происходило при концентрации полимера 1 мг/мл на $2 \pm 1 \times 10^6$ /мл клеток, температуре 37°C и pH 8,0 и времени инкубации 10 минут. Было показано, что полимер PVPfNHS в концентрации 1 мг/мл не обладает цитотоксичностью и не влияет на процессы остеогенной дифференциации МСК. Было показано, что МСК модифицированные полимером, способны стабильно присоединяться к фрагментам костной ткани *in vitro*, и что именно наличие функциональных бисфосфонатных групп в структуре полимера обеспечивает его сродство к костной ткани. Полученные результаты послужат основанием для исследования регенеративного потенциала модифицированных остеофильным полимером МСК на животной модели остеопороза.

Литература

- 1 Консуэлла Х. Остеопороз – «безмолвная эпидемия» – Алматы, 2010.
<http://www.omoloke.kz/news/128>
- 2 Bone H.G., Hosking D., Devogelaer J.P., Tucci J.R., Emkey R.D., Tonino R.P., Rodriguez-Portales J.A., Downs R.W., Gupta J., Santora A.C., Liberman U.A. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women // The New England journal of medicine. -2004. -Vol. 350. – 12. – P. 1189-99.
- 3 Uludag H. Bisphosphonates as a foundation of drug delivery to bone // Current pharmaceutical design. -2002. -Vol. 8. – 21. – P. 1929-44.

- 4 Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J.C., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // *Nature medicine*. -1999. -Vol. 5. – 3. – P. 309-13.
- 5 Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A., Kon E., Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells // *The New England journal of medicine*. -2001. -Vol. 344. – 5. – P. 385-6.
- 6 Cancedda R., Mastrogiacomo M., Bianchi G., Derubeis A., Muraglia A., Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone // *Novartis Foundation symposium*. -2003. -Vol. 249. – P. 133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41.
- 7 Gangji V., Hauzeur J.P., Matos C., De Maertelaer V., Toungouz M., Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study // *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. -2004. -Vol. 86-A. – 6. – P. 1153-60.
- 8 Crouch S.P., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity // *Journal of immunological methods*. -1993. -Vol. 160. – 1. – P. 81-8.
- 9 Soleimani M, Nadri S: A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 2009, 4(1):102-106.