

УДК 577.27; 612.017.1:616-006

Т. М. БОГДАНОВА<sup>1</sup>, А. Ю. БОГДАНОВ<sup>1</sup>, Н. А. АЙТХОЖИНА<sup>2</sup>

## РОЛЬ ЦАМФ- И ERK1/2-ЗАВИСИМЫХ КАСКАДОВ В АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН-ИНДУЦИРОВАННОМ ИЗМЕНЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

(<sup>1</sup>Научный центр противоинфекционных препаратов, г. Алматы;

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, г. Алматы)

В работе изучена роль цАМФ- и ERK1/2-зависимых каскадов в АФП-индуцированном изменении функциональной активности ГСК костного мозга *in vitro* на примере CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК. В результате было выявлено, что цАМФ-зависимая система передачи АФП-стимулов в CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК является в большей степени РКА-регулируемой, то есть данный каскад вносит достоверно больший вклад в АФП-индуцированное изменение биологической активности данных субпопуляций опосредованное синтезом цАМФ, чем Ерас1/2-регулируемый каскад. В противоположность этому, в CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК цАМФ-зависимая система передачи АФП-стимулов является в равной степени Ерас1/2- и РКА-регулируемой, то есть данные каскады вносят равный вклад в цАМФ-опосредованную генерацию ответной реакции ГСК на АФП-индукацию. Анализ роли ERK1/2- зависимого каскада выявил, что в данный сигнальный путь вносят значительный (более 50%) вклад в проведение сигнала АФП-индуцированного изменения биологической активности ГСК. При этом в CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК ERK1/2-регулируемый каскад вносит достоверно больший вклад по сравнению с CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК. Таким образом, оба выявленных цАМФ- зависимых каскада и ERK1/2- зависимый каскад по-своему ответственны за передачу АФП-стимула в ГСК костного мозга, но являются не единственными сигнальными путями, вовлеченными в данный процесс.

Альфа-фетопротеин (АФП) – специфический сывороточный гликопротеин, который продуцируется клетками фетальной печени и желточного мешка и является главным компонентом ранней эмбриональной сыворотки млекопитающих [1-3]. Функциональная активность АФП была выявлена на всех стадияхпренатального развития: от оплодотворения до зиготы, в эмбриональном периоде и в развивающемся плоде [4, 5-10]. В ряде работ была показана прямая корреляционная взаимосвязь между активацией гемопоэза и повышением уровня АФП у пациентов с гепатомой, при этом поддержание высокого уровня продукции АФП напрямую коррелировало с наличием и активностью очагов гемопоэза в печени [11, 12]. В работах J. Bartha с соавт. показана прямая зависимость уровня АФП в сыворотке крови беременной с активностью гемопоэза у плода [8, 13]. В дальнейшем было доказано, что АФП является регулятором биологической активности начального звена гемопоэза – гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга *in vitro* [14, 15]. При этом исследования молекулярных механизмов регуляторного действия АФП на ГСК выявили активацию цАМФ- зависимых

сигнальных каскадов, а именно цАМФ/Ерас1/2 и цАМФ/РКА путей *in vitro* [16]. В тоже время в ГСК была доказана активация МАРК сигнального каскада, а именно B-Raf/ERK1/2 пути, в ответ на их АФП индукцию *in vitro* [17]. В связи с вышеизложенным, вопрос о роли выявленных цАМФ- и ERK1/2- зависимых каскадов в АФП-индуцированном изменении функциональной активности ГСК костного мозга остается открытым. В рамках данного исследования был изучен вклад обнаруженных цАМФ- и ERK1/2- зависимых каскадов в регуляцию некоторых функций ГСК костного мозга в ходе их АФП-стимуляции *in vitro*.

### Материалы и методы

АФП или сывороточный альбумин (АЛБ) растворяли в стерильном апирогенном 0,9% растворе хлорида натрия и вводили животным однократно в хвостовую вену в дозе 100 мкг/мышь в объеме 0,2 мл в течение 2 мин. Контрольным животным вводили стерильный апирогенный 0,9% раствор хлорида натрия в том же объеме. Опытных животных умерщвляли эвтаназией через 24 ч после инъекции АФП или АЛБ. Эвтаназию

мышей осуществляли цервикальной дислокацией после наркотизирования животных.

Селезенку мышей гомогенизировали и гомогенат фракционировали на градиенте плотности переколла (Sigma, США) с=1,065 г/мл, соответствующей мононуклеарным клеткам мыши [18]. Мононуклеарную фракцию клеток отмывали центрифугированием, ресуспендировали в культуральной среде и инкубировали 4 ч в чашке Петри. Неадгезированные клетки собирали, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в культуральной среде. Во всех экспериментах использовали суспензии с долей жизнеспособных клеток больше 90%.

Костный мозг выделяли из бедренной и большой берцовой костей промыванием раствором для переноса клеток костного мозга (Sigma, США). Во всех экспериментах использовали суспензию клеток с долей жизнеспособных клеток больше 90%.

Суспензию клеток костного мозга центрифугировали в градиенте плотности переколла [19-21]. Клетки с плавучей плотностью с=1,090 г/мл [21] собирали и отмывали центрифугированием. Из полученной фракции клеток костного мозга иммуномагнитной сепарацией при помощи autoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Германия) выделяли популяцию CD34<sup>+</sup> клеток с использованием набора реагентов CD34 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя. Из полученной популяции CD34<sup>+</sup> клеток выделяли CD133<sup>+</sup> клетки и CD117<sup>+</sup> клетки при помощи наборов реагентов CD133 MicroBead Kit и CD117 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкциям производителя. CD135<sup>+</sup> клетки выделяли из пула CD34<sup>+</sup> клеток при помощи биотинилированного антитела к CD135 маркеру (eBioscience, США) и набора реагентов Anti-Biotin MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия).

Во всех экспериментах с мононуклеарными клетками использовали культуральную среду RPMI-1640, содержащую 10% фетальной сыворотки, 4 mM L-глутамина, 100 Ед/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина (Sigma, США). Культивирование клеток осуществляли при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. Во всех экспериментах с ГСК использовали культуральную среду Stemline II Methylcellulose Medium, содержащую 4 mM L-глутамина, 100 мг/мл стреп-

томицина и 100 ед/мл пенициллина (Sigma, США). Культивирование клеток осуществляли при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. В качестве индуктора ГСК использовали АФП, конечная концентрация которого составляла 50 мкг/мл. В ряде случаев перед добавлением АФП к суспензиям ГСК их предварительно культивировали в течение 6 ч в присутствии 3×10<sup>-5</sup> М ингибитора Н-8 (Biaffin GmbH, Германия), 10<sup>-7</sup> М брефельдина А (Sigma, США) или 2,5×10<sup>-7</sup> М ингибитора ERKInh (Calbiochem, Великобритания). Отрицательным контролем во всех экспериментах являлся сбалансированный солевой раствор Хенкса (Sigma, США).

Для оценки пролиферации суспензии ГСК доводили до концентрации 10<sup>7</sup> клеток/мл, рассеивали в 96-луночные круглодонные планшеты (BD Falcon, США) в концентрации 5×10<sup>5</sup> клеток/ячейка и инкубировали 48 ч. Изучение уровня пролиферации проводили с использованием набора реагентов APC BrdU Flow Kit (BD Bioscience, США) при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur (BD Bioscience, США), согласно инструкции производителя. Количественной характеристикой пролиферативной активности ГСК являлся индекс относительной пролиферации (ИП), вычисляемый по формуле:

$$ИП = ((F_{\text{опыт}} / F_{\text{контроль}}) - 1) \times 100\%, \quad (1)$$

где  $F_{\text{опыт}}$  – интенсивность флюoresценции BrdU-позитивных ГСК под воздействием индукторов;  $F_{\text{контроль}}$  – интенсивность флюoresценции BrdU-позитивных ГСК животных в отсутствии индукторов.

Изучение уровня общего синтеза белка в субпопуляциях ГСК проводили по методу определения уровня включения радиоактивно-меченых аминокислот в клетки монослоя [18]. Для этого суспензии ГСК доводили до концентрации 5×10<sup>6</sup> клеток/мл и рассеивали в 48-ячеечные плоскодонные планшеты (BD Falcon, США) в концентрации 5×10<sup>5</sup> клеток/ячейка. Клетки инкубировали 48 ч, после чего в каждую лунку добавляли [<sup>3</sup>H]-Leu (Amersham, Швеция) по 2,0 мКюри/ячейка, с которым инкубировали монослой в течение 3 ч. После инкубации, ячейки промывали, фиксировали метанолом (Sigma, США), высушивали и инкубировали 48 ч при 4°C. По истечении срока инкубации, ячейки последовательно промывали и инкубировали 8 ч при 25°C с 1Н раствором хлорида

натрия. Аликовоты вносили во флаконы со сцинтиллятором (Beckman Coulter, США). Содержание вошедшего в белки радиоактивного лейцина определяли на жидкостном счетчике LS 6500 Liquid Scintillation Counter (Beckman Coulter, США), согласно протоколу производителя. Количество-венным показателем общего уровня синтеза белка ГСК являлся индекс относительной белок-синтетической активности (ИБСА), вычисляемый по формуле:

$$\text{ИБСА} =$$

$$= ((\text{[}^3\text{H-Leu]}_{\text{опыт}} / \text{[}^3\text{H-Leu]}_{\text{контроль}}) - 1) \times 100\%, \quad (2)$$

где  $\text{[}^3\text{H-Leu]}_{\text{опыт}}$  – интенсивность излучения радиоактивной метки в ГСК инъцированных животных, имп/мин;  $\text{[}^3\text{H-Leu]}_{\text{контроль}}$  – интенсивность включения радиоактивной метки в ГСК животных в отсутствии вводимых веществ, имп/мин.

Для оценки метаболической активности суспензии ГСК каждой субпопуляции рассеивали в 48-ячеечные плоскодонные планшеты в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/ячейка и инкубировали 18 ч. Активность метаболизма клеток анализировали с использованием коммерческого набора Cell Proliferation Reagent WST-1 (Sigma, США) при помощи микропланшетного ридера Sunrise RC.4 (Tecan, Австрия), согласно инструкции производителя набора реактивов. Количество-венным показателем общего уровня метаболизма ГСК являлся индекс относительной метаболической активности (ИМА), вычисляемый по формуле:

$$\text{ИМА} = ((A_{\text{опыт}} / A_{\text{контроль}}) - 1) \times 100\%, \quad (3)$$

где  $A_{\text{опыт}}$  – значение оптической плотности ГСК под воздействием индукторов;  $A_{\text{контроль}}$  – значение оптической плотности ГСК в отсутствии индукторов.

Для оценки продукции супрессорных факторов и факторов регуляции гемопоэза суспензии ГСК рассеивали в 48-ячеечные плоскодонные планшеты в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/ячейка и инкубировали 24 ч. После инкубации в культуральных супернатантах определяли содержание трансформирующего фактора роста- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), интерлейкина(IL)-10, оксида азота (NO), простагландин E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), FLT3 лиганда (FLT3L), c-Kit лиганда (KL), SCTK1 лиганда (SCTK1L), IL-3, макрофагального колоние-стимулирующего фактора (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF),

эритропоэтина (Еро), фактора роста гепатоцитов (HGF) и фактора роста стволовых клеток (SCF) с использованием коммерческих наборов реагентов Quantikine mouse immunoassays и Colorimetric Assay Kit (все R&D Systems, США) согласно инструкциям производителя наборов реагентов при помощи микропланшетного ридера Sunrise RC.4.

Для оценки клоногенной активности суспензии ГСК доводили до концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл средой MACS HSC-CFU Basic (Miltenyi Biotec, Германия). Все процедуры с суспензиями ГСК были проведены согласно протоколу производителя среды MACS HSC-CFU Basic. Оценку и подсчет количества колоний ( $> 50$  клеток) и кластеров ( $< 50$  клеток) проводили *in situ* через 14 дней инкубации при помощи микроскопа IX81 (Olympus, Япония). Тип колоний устанавливали путем цитохимического и иммунохимического окрашивания фиксированных метанолом слайдов из извлеченных индивидуальных колоний.

Для оценки дифференциации суспензии ГСК каждой субпопуляции доводили средой Stemline II Methylcellulose Medium до концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл и рассеивали по 1 мл в 24-ячеечные культуральные планшеты (BD Bioscience, США). Клеточные суспензии культивировали в течение 4 недель. По окончанию 4 недель в культурах анализировали относительное содержание клеток позитивных по линейным маркерам путем проточной цитометрии при помощи цитофлуориметра FACS Canto(BD Bioscience, США) с использованием Alexa Fluor 647-меченного анти-CD3 антитела, APC-меченного анти-CD79a антитела, PE-меченного анти-Ly6G антитела, PE-Cy7-меченного анти-NK-1.1 антитела, APC-меченного анти-TER-119 антитела (BD Pharmigen, США) и FITC-меченного анти-CD66b антитела (eBioscience, США). Результаты выражали в процентной доле клеток по каждому изучаемому линейному маркеру.

Имунносупрессорную активность ГСК оценивали по влиянию секрецируемых ими супрессорных факторов на пролиферацию мононуклеарных клеток селезенки мыши, стимулированных фитогемагглютинином М [22]. Для этого суспензию ГСК каждой субпопуляции доводили до концентрации  $10^7$  кл/мл средой Stemline II Methylcellulose Medium, рассеивали в  $2 \times 10^6$  кл/мл в 2 мл круглодонные флаконы и культивировали 48 ч. Супернатанты отбирали и тестировали на куль-

туре мононуклеарных клеток селезенки. Для этого суспензию мононуклеарных клеток селезенки рассеивали в 96-ячеечные круглодонные планшеты в количестве  $5 \times 10^5$  клеток на ячейку в присутствии культуральных супернатантов ГСК (200 мкл) и фитогемагглютинином М (конечная концентрация 20 мкг/мл). Планшеты инкубировали 48 ч. Изучение уровня пролиферации мононуклеаров проводили с использованием набора реагентов APC BrdU Flow Kit (BD Bioscience, США) при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur (BD Bioscience, США), согласно инструкции производителя. Количествоюнственной характеристикой иммуносупрессорной активности ГСК являлся индекс относительной иммуносупрессорной активности (ИИА), вычисляемый по формуле:

$$\text{ИИА} = ((F_{\text{опыт}} / F_{\text{контроль}}) - 1) \times 100\%, \quad (4)$$

где  $F_{\text{опыт}}$  – значение флюресценции BrdU-позитивных мононуклеаров при наличии супернатанта ГСК;  $F_{\text{контроль}}$  – значение флюресценции BrdU-позитивных мононуклеаров при отсутствии супернатанта ГСК.

Все эксперименты проводились в 3-х кратной повторности. При этом высчитывалось среднее арифметическое значение (M) и стандартное отклонение (m). Коэффициент Стьюдента (t) использовался для выявления достоверности различий между экспериментальными значениями.

## Результаты и их обсуждение

Изучение взаимосвязи активации Erac1/2 и РКА с биологической активностью ГСК, а именно пролиферацией, синтезом белка, метаболической, клоногенной и иммуносупрессорной активностей, индуцируемых АФП, показало разницу в роли данных основных сигнальных элементов цАМФ-зависимых каскадов между АФП-индуцированными субпопуляциями ГСК (табл. 1). Так, изменения в изученных видах биологической активности CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> ГСК достоверно в большей степени зависели от РКА-регулируемого пути, так как присутствие ингибитора РКА (Н-8) приводило в среднем к 20% снижению активности клеточного ответа. При этом применение ингибитора Erac1/2 (брефельдин А) также вызывало достоверное подавление изученных типов клеточной активности, но оно в среднем было менее 15% и достоверно отличалось от эффекта ингибитора Н-8 (табл. 1). Аналогичная ситуация также наблюдалась в ходе изучения биологической активности CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК, так как использование ингибитора Н-8 приводило в среднем к 35% ее подавлению, тогда как использование брефельдина А характеризовалось в среднем 20% ингибированием (табл. 1). Следовательно, цАМФ-зависимая система передачи АФП-стимулов в CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК является в большей степени РКА-регулируемой,

Таблица 1. Влияние ингибиторов Erac1/2 и РКА на АФП-индуцированное изменение биологической активности субпопуляций ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Индукторы	Функциональная активность ГСК				
		ИП, %	ИБСА, %	ИМА, %	ИКА, %	ИИА, %
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	АФП	73,2±4,3	120,7±10,0	140,9±8,7	194,5±11,3	42,8±1,2
	Брефельдин А+АФП	63,4±3,1*	109,7±2,7*	125,9±4,4*	158,5±7,5*	35,9±1,9*
	Ингибитор Н-8+АФП	55,4±3,0*#	100,6±3,1*#	118,5±7,0*#	140,5±9,9*#	32,5±2,1*#
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	АФП	89,7±5,8	80,4±5,3	165,7±10,4	179,0±10,4	38,6±2,4
	Брефельдин А+АФП	67,9±4,1*	61,9±4,0*	133,0±7,9*	142,1±9,4*	29,2±2,7*
	Ингибитор Н-8+АФП	57,1±3,2*#	52,7±2,7*#	116,5±9,5*#	123,6±5,6*#	22,5±1,5*#
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	АФП	48,7±1,6	89,9±2,6	92,9±3,6	136,2±10,7	24,5±2,0
	Брефельдин А+АФП	44,3±2,1*	84,8±2,0*	88,2±2,2*	122,1±6,1*	20,3±2,0*
	Ингибитор Н-8+АФП	43,5±3,8*	82,3±3,7*	84,9±2,5*	115,2±5,2*	17,2±2,5*

*Примечания.* ИП - Индекс пролиферации; ИБСА - Индекс белок-синтетической активности; ИМА – Индекс метаболической активности; ИКА – индекс клоногенной активности; ИСА – Индекс иммуносупрессорной активности «\*» - достоверность результатов в сравнении с контролем  $P<0,05$ ; «#» - достоверность результатов действия ингибиторов между собой  $P<0,05$ .

т.е. данный каскад вносит достоверно больший вклад в АФП-индуцированное изменение биологической активности данных субпопуляций опосредованное синтезом цАМФ. Анализ влияния ингибитора Н-8 и брефельдина А на АФП-индуцицию CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>ГСК выявил, что цАМФ-зависимое проведение митогенного и синтетического импульсов, а также повышение уровня клеточного метаболизма, клоногенной и иммуносупрессорной активностей в одинаковой степени (в среднем по 10%) определяется как Ерас1/2-, так и РКА-регулируемыми путями (табл. 1). Отсюда следует, что цАМФ-зависимая система передачи АФП-стимулов в CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК в равной степени Ерас1/2- и РКА-регулируемой, т.е. данные каскады вносят равный вклад в цАМФ-опосредованную генерацию ответной реакции ГСК на АФП-индуцицию.

**Таблица 2. Влияние ингибитора ERK1/2 на АФП-индуцированное изменение биологической активности субпопуляций ГСК костного мозга**

Субпопуляции ГСК	Индукторы	Функциональная активность ГСК				
		ИП, %	ИБСА, %	ИМА, %	ИКА, %	ИСА, %
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	АФП Ингибитор ERKInh+АФП	73,2±4,3 38,2±3,9*	120,7±10,0 79,4±6,1*	140,9±8,7 89,8±4,6*	194,5±11,3 84,4±5,7*	42,8±1,2 20,4±2,0*
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	АФП Ингибитор + АФП	89,7±5,8 19,8±3,1*	80,4±5,3 20,3±3,5*	165,7±10,4 55,6±4,1*	179,0±10,4 54,3±3,9*	38,6±2,4 8,4±2,6*
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	АФП Ингибитор ERKInh+АФП	48,7±1,6 24,9±3,0*	89,9±2,6 50,1±6,0*	92,9±3,6 54,2±5,9*	136,2±10,7 58,2±5,0*	24,5±2,0 8,9±1,1*

*Примечания.* ИП - Индекс пролиферации; ИБСА - Индекс белок-синтетической активности; ИМА – Индекс метаболической активности; ИКА – индекс клоногенной активности; ИСА – Индекс иммуносупрессорной активности «\*» - достоверность результатов в сравнении с контролем Р<0,05.

ГСК был показан достоверно более высокий уровень АФП-зависимого фосфорилирования ERK1/2 в цитозоле и нуклеоплазме, а в CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК был выявлен наиболее широкий спектр ERK1/2-регулируемых сигнальных белков [17]. Несмотря на данные различия, ERK1/2 сигнальный каскад вносит значительный вклад в проведение АФП-стимула в изученных типах ГСК костного мозга. Такое большое значение данного каскада, по всей видимости, обусловлено тем, что он является не только результатом активации обоих выявленных цАМФ-зависимых каскадов [17], но Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин/CaMK каскадов, также функционирующих в изучаемых субпопуляциях ГСК в ответ на воздействие АФП и регулирующих активность ERK1/2 в цитозоле [23].

Анализ биологической активности АФП-индуцированных ГСК после их преинкубации с ингибитором ERK1/2 (ERKInh) показал, что она в значительной степени (на ~50% и более) определялась ERK1/2-регулируемым каскадом (табл. 2). Однако между субпопуляциями ГСК была выявлена разница в эффектах ингибитора ERKInh на АФП-модулируемую биологически активность. В CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК присутствие ингибитора приводило в среднем к 51% подавлению эффектов действия АФП (табл. 2). Тогда как в CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК наблюдалось в среднем более чем 70% ингибирование АФП-индуцированного изменения биологической активности ГСК (табл. 2). Подобный эффект, вероятнее всего, зависит от уровня фосфорилирования ERK1/2 и/или спектра ERK1/2-регулируемых мишней. Так, в CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>

Таким образом, доказана роль двух составляющих общего молекулярного механизма действия АФП в генерации биологической активности различных субпопуляций ГСК костного мозга на его воздействие *in vitro*: цАМФ-зависимой ветви и ERK1/2-зависимой ветви, которые по-своему ответственны за функциональную активность изученных субпопуляций при специфическом взаимодействии АФП с его рецепторами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Trojan J., Uriel J. Immunocytochemical localization of alpha-fetoprotein (AFP) and serum albumin (ALB) in ecto-, meso- and endodermal tissue derivatives of the developing rat // Oncodev. Biol. Med. 1982. V. 3. P. 13-22.
2. Gabant P., Forrester L., Nichols J., van Reeth T., de Mees C., Pajack B., Watt A., Smitz J., Alexandre H., Szpirer C.,

- Szpirer J.* Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility // Proc. Natl. Acad. Sci. 2002. V. 99. P. 12865-12870.
3. *Gillespie J.R., Uversky V.N.* Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical review // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1480. P. 41-56.
4. *Mizejewski G.* Levels of AFP during pregnancy and early infancy in normal and disease states // Obstet. Gynecol. Surv. 2003. V. 58. P. 17-35.
5. *Keel B.A., Eddy K.B., Cho S., Gangrade B.K., May J.V.* Purified human alpha fetoprotein inhibits growth factor-stimulated estradiol production by porcine granulosa cells in monolayer culture // Endocrinology. 1992. V. 130. P. 3715-3717.
6. *Leffert H.I., Sell S.* Alpha-fetoprotein biosynthesis during the growth cycle of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture // J. Cell. Biol. 1974. V. 61. P. 823-829.
7. *Hamel S., Hoskin D.W., Hooper D.C., Murgita R.A.* Phenotype and function of bone marrow-derived T and non-T cells activated *in vitro* by alpha-fetoprotein // In Mizejewski G.J., Jacobson H.I., Eds. Biological Activities of Alpha-Fetoprotein. Boca Raton: CRC Press, 1987. P. 167-177.
8. *Bartha J.L., Romero-Carmona R., Comino-Delgado R., Arce F., Arrabal J.* Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid // Obstet. Gynecol. 2000. V. 96. P. 588 -592.
9. *Ruoslahti E., Seppala M.* Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development // Adv. Cancer Res. 1979. V. 29. P. 275-234.
10. *Toder V., Bland M., Gold-Geffter L., Nebel J.* The effect of alpha-fetoprotein on the growth of placental cells *in vitro* // Placenta. 1983. V. 4. P. 79-86.
11. *Hwang S.J., Lee S.D., Wu J.C.* Clinical evaluation of erythrocytosis in patients with hepatocellular carcinoma // Chuang. Hua. Hsueh. Tsa. Chih. Tapei. 1994. V. 53. P. 262-269.
12. *Sakisaka S., Watanabe M., Tateishe H., Harada M., Shakado S.* Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: Immunohistochemical evidence // Hepatology. 1993. V. 18. P. 1357-1362.
13. *Bartha J.L., Comino-Delgado R., Arce F., Alba P., Broouillon J.P., Manel B.M.* Relationship between alpha-fetoprotein and fetal hematopoiesis // J. Reprod. Med. 1994. V. 44. P. 689-697.
14. *Рыбакова Т.М., Фомичева Е.В., Дубешко С.Ю., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю.* Влияние альфа-фетопротеина на биологическую активность гемопоэтических стволовых клеток в условиях *ex vivo* I: воздействие на ростовой потенциал // Биотех. теор. практик. 2007. № 1. С. 76-91.
15. *Рыбакова Т.М., Низкородова А.С., Жигайлова А.В., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю.* Влияние альфа-фетопротеина на биологическую активность гемопоэтических стволовых клеток в условиях *ex vivo* II: воздействие на экспрессию и продукцию супрессорных факторов, клоногенную активность, самоподдержание и дифференциацию // Биотех. теор. практик. 2007. № 1. С. 92-114.
16. *Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Дубешко С.Ю., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Кулманов М.Е., Богданов А.Ю.* Структура цAMP-зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного импульса альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // Здор. и болез. 2009. № 6. С. 120-143.
17. *Bogdanov A.Yu., Rybakova T.M., Belyaev N.N.* The role of signaling from cAMP to MAPK in the regulation of bone marrow hematopoietic stem cells growth by  $\alpha$ -fetoprotein // Abstracts-book of 5<sup>th</sup> ISSCR Annual Meeting, July 24-29, Cairns, Australia, 2007. P. 145.
18. *Freshney R.I.* Culture of Animal Cells. New York: Wiley-Liss Inc, 2000. 438 p.
19. *Sugiura K., Ikebara S., Inaba M.* Enrichment of murine bone marrow natural suppressor activity in the fraction of hematopoietic progenitors with interleukin-3 receptor-associated antigen // Experim. Hematol. 1992. V. 20. P. 256-263.
20. *Закирьянова Г.К., Беляев Н.Н.* Изопикническое разделение клеток костного мозга // Методы молекул. биол. биохим. иммунохим. биотех. Алматы: Гридан, 1999. С. 175-178.
21. *Богданов А.Ю., Саввуди Ф.Г., Тлеулиева Р.Т., Беляев Н.Н.* Альфа-фетопротеин как индуктор натуральных супрессорных (NS) клеток костного мозга I. Изотипические фракции NS-клеток и их супрессорные эффекты // Биотех. теор. практик. 2004. № 3. С. 83-89.
22. *Segerson E.C., Beetham P.K.* Suppressor activity of bone marrow cells and localization of fluorescent-labeled bone marrow cells within ovine and endometrial tissue // J. Anim. Sci. 2000. V. 78. P. 709-717.
23. *Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Дубешко С.Ю., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Кулманов М.Е., Богданов А.Ю.* Структура цAMP-зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного импульса альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // Здор. и болез. 2009. № 6. С. 120-143.

## Резюме

Жұмыста *in vitro* сүйек кемігінің АФП-белсендендірілген CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> және CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГБЖ мысалында сүйек кемігінің ГБЖ функционалдық белсенелілігінің өзгерісіндегі цAMP және ERK1/2-тәуелді каскадтардың рөлі зерттелді. Нәтижесінде CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГБЖ АФП стимулының цAMP-тәуелді өткізу жүйесінің, көбінесе, РКА арқылы реттелетіні анықталды, яғни бұл каскад цAMP синтезімен байланысты аталған субпопуляциялардың биологиялық белсенелілігін өзгертуге айтарлықтай үлесін қосады. Ал CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГБЖ Erac1/2 және РКА арқылы бірдей деңгейде реттелетін болып шыкты, ейткені аталған каскадтар АФП-индукиацияландырылған ГБЖ цAMP байланысты жауабының генерациясына бірдей жарнасын қосады. ERK1/2-тәуелді каскад рөлінің анализі оның зерттелген ГБЖ АФП-индукиацияландырылған биологиялық жауабына ерен (50% жоғары) үлесі бар екенін анықтады. Бірақ CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГБЖ ERK1/2-тәуелді каскадтың жарнасы CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> және CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГБЖ қарағанда әлдекайда жоғары болды. Яғни, белгілі болған екі цAMP-тәуелді және ERK1/2-тәуелді каскадтары сүйек кемігінің ГБЖ АФП стимулының өткізілуіне әрқайсысы езінше жауапты болғанымен, бұл үрдіске қатысты бірден-бір белгі беру жолы болып табылмайды.

## Summary

In current work the role of cAMP and ERK1/2-dependent cascades in AFP-induced alterations in functional activity of bone marrow' HSCs *in vitro* was studied by example of CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> HSCs. It was established that, cAMP-dependent AFP-stimulus

transduction in CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> HSCs is greatly PKA-regulated, notably this cascade significantly contributes to AFP-induced changes of biological activity of present subpopulations that is mediated by cAMP synthesis. Oppositely, in CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> HSCs cAMP-dependent system of AFP-stimulus transduction is equally Epac1/2- and PKA-regulated, that is present cascades equally contribute to cAMP-mediated generation of HSCs response to AFP induction. Analysis of ERK1/2-dependent cascade

had revealed, that present signal way significantly (more than 50%) contributes in AFP-induced changes in biological activity of HSCs studied. Also ERK1/2-regulated cascade greatly contribute to CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> HSCs as compared with CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> HSCs. Thereby both cAMP and ERK1/2-dependent cascades are responsible for AFP-stimulus transduction in bone marrow' HSCs in their own way, but they are not only the signal ways involved in this process.