

# ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.27; 612.017.1:616-006

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

## ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ IN VIVO

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

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

В наших предыдущих работах было доказано, что АФП является индуктором биологической активности CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК костного мозга мыши, в частности таких функций как ростовая функция, продукция супрессорных факторов, продукция факторов регуляции гемопоэза, клоногенной активности и дифференциации в условиях *in vitro*. Однако, четкие доказательства того, что АФП вовлечен в регуляцию данных видов биологической активности ГСК костного мозга в условиях организма отсутствуют. В результате проведенных исследований было показано, что все три основных процесса, вовлеченных в поддержание ростовой активности: пролиферация, синтез белка и метаболическая активность были достоверно повышены в выделенных субпопуляциях ГСК костного мозга АФП-обработанных животных по сравнению с животными контрольной группы. Экзогенное введение АФП привело к значительному повышению продукции таких супрессорных факторов как TGF- $\beta_1$ , IL-10, NO и PGE<sub>2</sub> в изученных субпопуляциях ГСК. Достоверное повышение секреции или *de novo* продукция таких регуляторных факторов гемопоэза как FLT3L, KL, SCTK1L, IL-3, M-CSF, GM-CSF, Epo, HGF и SCF были показаны в субпопуляциях ГСК АФП-обработанных животных по сравнению с животными контрольной группы. Клоногенная активность изученных субпопуляций ГСК АФП-обработанных животных была также значительно усиlena. Анализ дифференциации субпопуляции ГСК АФП-обработанных животных выявил, что они трансформируются в два направления – моноциты/макрофаги и эритроциты, тогда как другие линии не обнаруживались по сравнению с контрольной группой. Выявленные регуляторные эффекты АФП на биологическую активность ГСК были специфичны для АФП, поскольку использование наиболее гомологичного родственного белка – сывороточного альбумина не сопровождалось достоверным изменением в функциональном потенциале ГСК по всем изученным параметрам. Таким образом, полученные результаты и доказывают, что АФП играет роль регуляторного фактора биологической активности ГСК в костном мозге животных.

**Введение.** Альфа-фетопротеин (АФП) - эмбрио-специфический сывороточный гликопротеин, который продуцируется клетками фетальной печени и желточного мешка и является главным компонентом ранней эмбриональной сыворотки млекопитающих [1-3]. В настоящее время многочисленными данными доказано, что АФП играет ключевую роль впренатальном развитии плода в качестве ростового фактора [1, 2, 4-9]. Функциональная активность АФП была выявлена на всех стадияхпренатального развития: от оплодотворения до зиготы, в эмбриональном периоде и в развивающемся плоде [5, 9-13]. В последние десятилетия было продемонстрировано, что АФП является белком, регулирующим *in vitro* рост яйцеклеток, клеток плаценты, эпидермиса, эндотелия и матки, эмбриональных

клеток, гепатоцитов, печеночных фагоцитов, клеток яичника, яичка и молочной железы, а также клеток костного мозга [3, 10, 14-18]. Помимо этих эффектов, показана роль АФП в регуляции гемопоэза [8, 19-23]. Так, выявлена прямая корреляция активации гемопоэза и повышения уровня АФП у пациентов с гепатомой, причем поддержание высокого уровня продукции АФП напрямую коррелировало с наличием и активностью очагов гемопоэза в печени. В своих работах J. Bartha и др. показали прямую зависимость уровня материнского АФП с активностью гемопоэза у плода [8, 19]. В наших предыдущих работах было доказано, что АФП является индуктором биологической активности CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГСК костного мозга мыши, в частности, таких функций как ростовая

функция, продукция супрессорных факторов, продукция факторов регуляции гемопоэза, клоногенной активности и дифференциации в условиях *in vitro* [24, 25]. Эти данные позволяют предположить, что АФП в эндокринной или аутокринной манере может оказывать воздействие на их биологическую активность ГСК в костном мозге. Однако прямых доказательств о непосредственном взаимодействии АФП с ГСК и, более того, генерации ответной реакции ГСК в виде усиления их ростового потенциала под влиянием АФП в настоящее время нет. Однако четкие доказательства того, что АФП вовлечен в регуляцию данных видов биологической активности ГСК костного мозга в условиях организма отсутствуют. Поэтому основным направлением этих исследований было изучение регуляторно-модифицирующей роли АФП на функциональный потенциал трех различных по степени зрелости субпопуляций ГСК костного мозга АФП-обработанных мышей условия *ex vivo*.

### **Материалы и методы**

**Используемые животные.** В работе использовали самцов мышей линии СВА весом 20-24 грамма. Животных содержали при температуре 22-24°C, 55-60% влажности и системе освещения «день-ночь». Эвтаназию мышей осуществляли цервикальной дислокацией после наркотизации животных.

**Введение животным индукторов.** 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 выводили из эксперимента через 24 ч после инъекции АФП или АЛБ.

**Получение суспензии клеток костного мозга.** Костный мозг выделяли из бедренной и большой берцовой костей путем их промывания раствором для переноса клеток костного мозга (Sigma, США). Смыв собирали в стерильные 15 мл пластиковые контейнеры (BD Falcon, США) и ресусцинировали в данном объеме до получения гомогенной суспензии. Суспензию центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при 4°C.

Клеточный осадок ресусцинировали в среде Stemline II Methylcellulose Medium (Sigma, США). Клетки подсчитывали и оценивали процент жизнеспособных клеток. Во всех экспериментах использовали суспензии с долей жизнеспособных клеток больше 90%.

**Получение субпопуляций ГСК.** Полученную суспензию клеток костного мозга насыщали на ступенчатый градиент плотности перколла (Sigma, США) со следующими плотностями ступенек:  $c_1=1,13$  г/мл,  $c_2=1,10$  г/мл,  $c_3=1,090$  г/мл,  $c_4=1,076$  г/мл,  $c_5=1,060$  г/мл и  $c_6=1,033$  г/мл [26-28]. Клетки центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин при 4°C. Клетки с плавучей плотностью  $c=1,090$  г/мл [28] собирали и отмывали центрифугированием при 300 g в 20-кратном объеме культуральной среды DMEM (Sigma, США) в течение 15 мин при 4°C. Из полученной фракции клеток костного мозга иммуномагнитной сепарацией при помощи autoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Германия) выделяли чистую популяцию CD34<sup>+</sup> клеток путем позитивной селекции с использованием коммерческих наборов реагентов CD34 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя. Затем из полученной популяции CD34<sup>+</sup> клеток выделяли CD133<sup>+</sup> клетки и CD117<sup>+</sup> клетки при помощи соответствующих 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). Чистоту выделенных субпопуляций ГСК контролировали проточной цитометрией. Во всех экспериментах использовали клеточные культуры, состоящие на 90% и более из фенотипически однородных клеток.

**Условия культивирования клеток.** Во всех экспериментах использовали культуральную среду Stemline II Methylcellulose Medium, содержащую 4 mM L-глутамина, 100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина (Sigma, США). Культивирование клеток осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе CO28IR Cell Culture Incubator (New Brunswick Scientific, Великобритания) при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности.

**Оценка пролиферативной активности.** Суспензии ГСК каждой субпопуляции доводили

культуральной средой до концентрации  $10^7$  клеток/мл и рассеивали в ячейки 96-луночных круглодонных планшетов (BD Falcon, США) в количестве  $5 \times 10^5$  клеток на ячейку и инкубировали 48 ч. За 30 мин до окончания инкубации в суспензии клеток добавляется 20 мкМ бромдиоксиуридина. Изучение уровня синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) субпопуляций ГСК проводили с использованием набора реагентов APC BrdU Flow Kit (BD Bioscience, США) при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur (BD Bioscience, США) и программного обеспечения BD FCAP Array Software (BD Bioscience, США), согласно инструкции производителя. Количественной характеристикой пролиферативной активности ГСК являлся индекс пролиферации (ИП), вычисляемый по формуле:

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

где  $F_{\text{опыт}}$  – значение флюресценции BrdU-позитивных ГСК инъецированных животных;  $F_{\text{контроль}}$  – значение флюресценции BrdU-позитивных ГСК животных в отсутствии вводимых веществ.

**Оценка уровня общего синтеза белка.** Изучение интенсивности общего синтеза белка в субпопуляциях ГСК проводили по методу определения включения радиоактивно-меченных аминокислот в клетки монослоя [29]. Для этого суспензии ГСК каждой субпопуляции доводили культуральной средой до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл и рассеивали в 48-ячеечные плоскодонные планшеты (BD Falcon, США) в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/ячейка. Клетки инкубировали 48 ч, после чего в каждую лунку добавляли [ $^{3}\text{H}$ ]-Leu (Amersham, Швеция) по 2,0 мкКюри/ячейка, с которым инкубировали монослой в течение 3 ч. После инкубации, ячейки промывали, фиксировали метанолом (Sigma, США), высушивали и инкубировали 48 ч при  $4^\circ\text{C}$ . По истечении срока инкубации, ячейки последовательно промывали 10% раствором трихлоруксусной кислоты (Sigma, США) и метанолом. После финальной промывки в каждую ячейку добавляли 1 Н раствора гидроксида натрия (Sigma, США) и инкубировали 8 ч при  $25^\circ\text{C}$ . Из каждой ячейки изымали аликвоту и добавляли во флаконы со сцинтиллятором (Beckman Coulter, США). Содержание вошедшего в белки радиоактивного лейцина (имп/мин) определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS 6500 Liquid Scintillation Counter

(Beckman Coulter, США), согласно протоколу производителя. Количественным показателем общего уровня синтеза белка ГСК являлся индекс белок-синтетической активности (ИБСА), вычисляемый по формуле:

$$\text{ИБСА} =$$

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

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

**Оценка общей 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) и программного обеспечения Magelan (Tecan, Австрия), согласно инструкции производителя набора реактивов. Количественным показателем общего уровня метаболизма ГСК являлся индекс метаболической активности (ИМА), вычисляемый по формуле:

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

где  $A_{\text{опыт}}$  – значение оптической плотности ГСК инъецированных животных;  $A_{\text{контроль}}$  – значение оптической плотности ГСК в отсутствии вводимых веществ.

**Оценка продукции супрессорных факторов и факторов регуляции гемопоэза.** Суспензии ГСК каждой субпопуляции 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 (TGF- $\beta_1$ ), интерлейкина(IL)-10, оксида азота (NO), простагландина  $E_2$  (PGE $_2$ ), FLT3 лиганда (FLT3L), c-Kit лиганда (KL), SCKT1 лиганда (SCKT1L), IL-3, макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), эритропоэтина (Epo), 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) при помощи микропланшетного ридера Sunrise RC.4 и программного обеспечения Magelan, согласно инструкциям производителя наборов реагентов.

**Оценка клоногенной активности.** Суспензии ГСК каждой субпопуляции 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.

**Оценка 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-ячечные 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 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). Проточную цитометрию проводили при помощи цитофлуориметра FACS Canto(BD Bioscience, США), согласно протоколу производителя. Результаты выражали в процентной доле клеток по каждому изучаемому линейному маркеру.

**Статистическая обработка данных.** Все эксперименты проводились в 3-хкратной повторности. При этом высчитывалось среднее арифметическое значение (M) и стандартное отклонение (m). Коэффициент Стьюдента (t) использовался для выявления достоверности различий между экспериментальными значениями. Значения показателя достоверности  $P > 0,05$  считали статистически не достоверными.

## Результаты и обсуждение

Анализ ростовой активности показал, что пролиферативная, белок-синтетическая и метаболическая активности всех изучаемых субпопуляций ГСК костного мозга АФП-инъецированных животных были достоверно повышены, по сравнению с показателями контрольной группы животных (табл. 1). Это говорит о том, что АФП при своем влиянии на ГСК в их естественной нише костного мозга индуцирует их ростовой потенциал, то есть АФП проявляет функции ростового фактора.

Изучение продукции выявленных *in vitro* [25] супрессорных факторов в клетках АФП-инъецированных животных вывило значительное повышение TGF- $\beta_1$  и NO в CD34 $^{+}$ CD133 $^{+}$  ГСК, TGF- $\beta_1$ , NO и IL-10 в CD34 $^{+}$ CD135 $^{+}$  ГСК, NO, IL-10 и PGE $_2$  в CD34 $^{+}$ CD117 $^{+}$  ГСК в сравнении с

Таблица 1. Ростовая активность субпопуляций ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Группы животных	ИП, %	ИБСА, %	ИМА, %
CD34 $^{+}$ CD133 $^{+}$	Контроль	4,5 $\pm$ 1,1	7,4 $\pm$ 2,7	6,5 $\pm$ 2,5
	АФП	87,2 $\pm$ 8,6*	98,3 $\pm$ 8,6*	125,6 $\pm$ 14,7*
	АЛБ	5,2 $\pm$ 2,1	8,1 $\pm$ 2,7	7,0 $\pm$ 2,9
CD34 $^{+}$ CD135 $^{+}$	Контроль	2,1 $\pm$ 1,0	4,6 $\pm$ 3,2	5,3 $\pm$ 2,0
	АФП	95,6 $\pm$ 9,5*	114,3 $\pm$ 14,4*	141,4 $\pm$ 10,4*
	АЛБ	3,2 $\pm$ 1,7	3,8 $\pm$ 2,0	6,7 $\pm$ 1,7
CD34 $^{+}$ CD117 $^{+}$	Контроль	3,2 $\pm$ 1,3	8,2 $\pm$ 3,3	7,6 $\pm$ 2,7
	АФП	58,3 $\pm$ 6,2*	77,6 $\pm$ 9,5*	87,3 $\pm$ 11,2*
	АЛБ	4,5 $\pm$ 2,0	7,4 $\pm$ 2,4	9,4 $\pm$ 1,8

*Примечания.* ИП - Индекс пролиферации; ИБСА - Индекс белок-синтетической активности; ИМА – Индекс метаболической активности; «\*» - достоверность результатов в сравнении с контролем  $P < 0,05$ .

Таблица 2. Продукция супрессорных факторов субпопуляциями ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Группы животных	Содержание супрессорных факторов			
		TGF- $\beta_1$ , пг/мл	NO, мкМ/мл	IL-10, пг/мл	PGE <sub>2</sub> , пг/мл
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	Контроль	9,6±7,8	3,5±1,1	–	–
	АФП	1850,8±75,6*	10,4±2,7*	–	–
	АЛБ	H/O	–	–	–
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	Контроль	7,4±6,0	2,4±0,9	6,5±5,2	–
	АФП	405,5±41,7*	30,1±4,2*	315,3±26,7*	–
	АЛБ	5,9±7,1	3,9±1,2	9,6±6,7	–
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	Контроль	–	5,7±1,3	7,3±5,6	8,5±7,4
	АФП	–	23,8±3,5*	426,2±31,3*	421,8±37,8*
	АЛБ	–	–	10,3±6,9	H/O

Примечания. TGF- $\beta_1$  – трансформирующий фактор роста- $\beta_1$ ; NO – оксид азота, IL-10 – интерлейкин-10; PGE<sub>2</sub> – простагландин E<sub>2</sub>; «\*» – достоверность результатов в сравнении с контролем P<0,05; H/O - не обнаружено.

аналогичными показателями ГСК контрольных животных (табл. 2). Необходимо отметить, что TGF- $\beta_1$ , IL-10 и PGE<sub>2</sub>, в соответствующих субпопуляциях ГСК, продуцировались под влиянием АФП *de novo*, а секреция NO лишь многократно возрастала под действием АФП. Следовательно, АФП, является регуляторным фактором продукции супрессорных молекул в изученных типах ГСК костного мозга в условиях организма.

Исследование продукции выявленных *in vitro* [25] факторов регуляции гемопоэза показало, что экзогенно введенный АФП достоверно усиливал продукцию таких факторов как FLT3L, KL, HGF и SCF во всех трех изученных субпопуляциях ГСК (табл. 3). Что касается SCTK1L, IL-3, M-CSF,

GM-CSF и Epo, то их продукция происходила *de novo* в соответствующих субпопуляциях ГСК АФП-инъецированных животных по сравнению с контрольной группой животных (табл. 3 и 4). Следовательно, АФП для изученных субпопуляций ГСК является фактором, регулирующим продукцию ими естественных ростовых факторов (FLT3L, KL, SCTK1L, HGF и SCF) и цитокинов-регуляторов (IL-3, GM-CSF, M-CSF и Epo) гемопоэза в костном мозге.

Исследование колониестимулирующей активности выявило, что введенный экзогенно АФП достоверно повышал кластеро- и колониеобразование во всех изученных субпопуляциях ГСК по сравнению с контрольными животными (табл. 5).

Таблица 3. Продукция ростовых гемопоэтических факторов субпопуляциями ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Группы животных	Содержание гемопоэтических факторов				
		FLT3L, пг/мл	KL, пг/мл	SCTK1L, пг/мл	HGF, пг/мл	SCF, пг/мл
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	Контроль	10,9±5,6	12,3±3,0	H/O	115,9±21,0	13,6±3,1
	АФП	113,5±31,3	50,9±18,6*	89,6±18,9*	186,3±18,9*	41,5±8,9*
	АЛБ	15,8±5,3*	15,6±4,1	1,8±1,6	101,6±16,0	18,0±3,7
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	Контроль	12,3±4,3	10,9±4,2	H/O	58,9±11,6	8,2±3,0
	АФП	56,9±18,9*	49,8±11,7*	51,4±19,8*	110,2±11,4*	21,8±4,3*
	АЛБ	17,6±6,9	15,9±4,2	1,2±1,7	41,6±11,0	6,4±2,3
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	Контроль	18,9±7,3	10,9±3,7	1,1±1,4	112,8±21,3	18,9±8,4
	АФП	91,3±20,3*	59,6±11,8*	90,9±19,6*	196,0±18,3*	35,9±5,7*
	АЛБ	12,9±6,0	15,6±4,7	H/O	101,6±19,0	13,7±4,8

Примечания. FLT3L - FLT3 лиганд; KL - c-Kit лиганд; SCTK1L - SCTK1 лиганд; HGF - фактор роста гепатоцитов; SCF - фактор роста стволовых клеток; «\*» - достоверность результатов в сравнении с контролем P<0,05; H/O - не обнаружено.

Таблица 4. Продукция цитокинов-регуляторов гемопоэза субпопуляциями ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Группы животных	Содержание гемопоэтических факторов			
		IL-3, пг/мл	GM-CSF, пг/мл	M-CSF, пг/мл	Epo, пг/мл
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	3,5±4,2 51,8±7,9* 2,3±4,8	H/O 119,6±7,9* H/O	H/O 87,6±7,6* H/O	4,6±7,6* 48,3±7,9 H/O
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	H/O 98,9±11,2* 2,8±4,3	5,9±4,2 215,5±22,3 8,3±5,1	4,5±6,0 123,8±20,7* 6,7±5,8	H/O 35,6±5,7 H/O
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	1,0±3,1 25,6±6,0* H/O	H/O 44,5±4,9* H/O	H/O 19,0±3,2* H/O	2,3±5,5 138,0±8,7* H/O

*Примечания.* IL-3 – интерлейкин-3; GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор; M-CSF - макрофагальный колоние-стимулирующий фактор; Epo - эритропоэтин; «\*» - достоверность результатов в сравнении с контролем Р<0,05; H/O – не обнаружено.

Таблица 5. Колониестимулирующая активность субпопуляций ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Группы животных	Количество кластеров, Ед	Количество колоний, Ед
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	14,5±3,2 44,6±6,5* 10,5±4,2	24,0±4,2 71,5±9,5* 20,9±5,7
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	15,7±3,7 53,7±8,3* 10,3±4,8	26,9±4,9 89,0±10,0* 30,5±7,1
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	9,7±4,1 34,0±5,8* 11,5±4,6	11,3±5,2 46,2±6,4* 8,9±3,7

*Примечание.* «\*» - достоверность результатов в сравнении с контролем Р<0,05.

Следовательно, АФП является колониестимулирующим фактором для изученных типов ГСК в костном мозге животных.

Анализ распределения линейных маркеров в культурах трех изученных субпопуляций ГСК

выявил, что экзогенно введенный АФП изменял направления их дифференциации в костном мозге (табл. 6). Во всех трех субпопуляциях ГСК он индуцировал развитие только двух ветвей гемопоэза: моноцитарно/макрофагальной и эритроидной.

Таблица 6. Дифференциация субпопуляций ГСК костного мозга

Субпопуляции ГСК	Группы животных	Относительное содержание клеток, %					
		CD79a <sup>+</sup>	NK-1.1 <sup>+</sup>	Ly6G <sup>+</sup>	CD69b <sup>+</sup>	CD41 <sup>+</sup>	TER-119 <sup>+</sup>
CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	15,8±3,6 H/O 11,6±3,5	5,4±3,2 H/O 8,6±3,0	43,9±7,3 67,8±6,9* 40,5±5,2	22,7±3,7 H/O 28,9±4,6	4,0±1,7 H/O 6,8±2,3	8,9±1,2 28,3±4,6* 6,4±1,9
CD34 <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	H/O H/O H/O	9,6±3,8 H/O 8,1±3,2	74,6±9,3 80,0±11,7 70,6±5,6	10,9±3,2 H/O 13,2±2,5	4,3±2,5 H/O 2,8±1,1	10,3±3,9 23,6±4,0* 8,6±2,5
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	Контроль АФП АЛБ	8,9±1,6 H/O 10,3±4,3	6,8±1,5 H/O 4,0±2,1	41,3±4,9 20,9±3,8* 36,9±5,6	30,7±4,5 H/O 25,6±4,2	7,9±9,3 H/O 11,6±3,73	15,9±2,9 65,7±9,6* 13,5±2,0

Остальные ветви, вероятнее всего, были ингибираны, так как ни один из линейных маркеров других типов гемопоэтических клеток не был обнаружен (табл. 6). Это означает, что АФП направленно индуцирует активацию макрофагальной и эритроидных ветвей. При этом среди изученных субпопуляций ГСК были выявлены различия в основном из двух выявленных направлений дифференциации (таблица 6). Так, в культурах CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК подавляющее большинство составляли моноциты/макрофаги, а в CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> ГСК – эритроидные клетки и эритроциты). Важно отметить, что данные результаты в значительной степени коррелируют ( $r_{\text{среднее по CD34+CD133+ ГСК}} = 0,90$ ,  $r_{\text{среднее по CD34+CD135+ ГСК}} = 0,95$ ,  $r_{\text{среднее по CD34+CD117+ ГСК}} = 0,96$ ) с результатами продуккции цитокинов-регуляторов гемопоэза изученными субпопуляциями ГСК (табл. 4), где было выявлено аналогичное распределение основных цитокинов, определяющих развитие моноцитарно/макрофагальной и эритроидной ветвей гемопоэза [30-32]. Это позволяет предположить, что данные цитокины вызывают подобные изменения в синергизме с АФП за счет обратной аутокринной регуляции, то есть IL-3, GM-CSF, M-CSF – переделяют развитие моноцитов/ макрофагальных, а Еро – эритроцитов.

Необходимо отметить, что выявленные регуляторные эффекты АФП на биологическую активность ГСК были специфичны для данного белка, поскольку АЛБ, являющийся наиболее гомологичным АФП родственным белком [3, 10] и взаимодействующий с поверхностью ГСК [34], не вызывал достоверных изменений в функциональном потенциале ГСК по всем изученным параметрам. Таким образом, полученные результаты и доказывают, что АФП играет роль регуляторно-модифицирующего фактора биологической активности ГСК в костном мозге животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mizejewski G.J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development // Exp. Biol. Med. 2004. V. 229. P. 439-463.
2. Yin Z.F., Wang C.H. Research advances on alpha-fetoprotein physiological function and clinical potential // Ai Zheng. 2003. V. 22. P. 108-121.
3. Mizejewski G.J. Alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: Relevance to domain and subdomain structure // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1997. V. 215. P. 333-362.
4. Sell S., Becker F.F., Leffert H.L., Watabe L. Expression of an oncodevelopmental gene product (alpha-fetoprotein) during fetal development and adult oncogenesis // Cancer Res. 1976. V. 36. P. 4239-4249.
5. 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.
6. Mares V., Kovaru F., Kovaru H. Alpha-fetoprotein in the brain of developing rats and pigs. An immunofluorescent study of cell-and-tissue differentiation // Basic Appl. Histochim. 1982. V. 261. P. 53-63.
7. Bartha J.L., Comino-Delgado R., Arce F., Alba P., Brooulon J.P., Manel B.M. Relationship between alpha-fetoprotein and fetal hematopoiesis // J. Reprod. Med. 1994. V. 44. P. 689-697.
8. Ruoslahti E., Seppala M. Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development // Adv. Cancer Res. 1979. V. 29. P. 275-234.
9. 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.
10. Gillespie J.R., Uversky V.N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical review // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1480. P. 41-56.
11. Chen H., Egan J., Chiu J.F. Regulation and activities of alpha-fetoprotein // Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Exp. 1997. V. 7. P. 11-41.
12. Mizejewski G. Levels of AFP during pregnancy and early infancy in normal and disease states // Obstet. Gynecol. Surv. 2003. V. 58. P. 17-35.
13. Dudich E., Semenkova L., Gorbatova E., Dudich I., Khromykh L., Tatulov E., Grechko G., Sukhikh G. Growth-regulatory activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells // Tumor Biol. 1988. V. 19. P. 30-40.
14. Toder V., Bland M., Gold-Gefter L., Nebel J. The effect of alpha-fetoprotein on the growth of placental cells *in vitro* // Placenta. 1983. V. 4. P. 79-86.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Scrova I.A., Yunker V.M., Kaledin V.I. High levels of alpha-fetoprotein and persistence of hemopoiesis in the liver of nude mice // Oncodev. Biol. Med. 1982. V. 3. P. 351-363.
20. 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.

21. Sakisaka S., Watanabe M., Tateishi H., Harada M., Shakado S. Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: Immunohistochemical evidence // Hepatology. 1993. V. 18. P. 1357-1362.
22. Hammer R.E., Krumlauf R., Camper S.A., Brinster R.I., Tilghman S.M. Diversity of AFP gene expression in mice is generated by a combination of separate enhancers // Science. 1987. V. 235. P. 53-58.
23. Kubota H., Storms R.W., Reid L.M. Variant forms of AFP transcripts expressed in human hepatopoietic progenitors // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 27629-27635.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Закирьянова Г.К., Беляев Н.Н. Изопикническое разделение клеток костного мозга // Методы молекул. биол. биохим. иммunoхим. биотех. Алматы: Гридан, 1999. С. 175-178.
28. Богданов А.Ю., Саввушкин 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.
29. Freshney R.I. Culture of Animal Cells. New York: Wiley-Liss Inc, 2000. 438 p.
30. Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G., Prohaska S.S., Scherer D.C., Beilhack G.F., Shizuru J.A., Weissman I.L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors // Ann. Rev. Immunol. 2003. V. 21. P. 759-806.
31. Arai F. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche // Rinsho. Ketsueki. 2006. V. 47. P. 355-362.
32. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors // N. Engl. J. Med. 2006. V. 354. P. 2034-2045.
33. Kanevsky V.Yu., Pozdnyakova L.P., Aksanova O.A., Severin S.E., Katukov V.Yu., Severin E.S. Isolation and characterization of AFP-binding proteins from tumor and fetal human tissues // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 41. P. 1143-1151.

### Резюме

Біздің алдынғы жұмыстарымызда АФП сүйек кемігінің CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> және CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> ГБЖ биологиялық белсенділігінің, сонын ішінде осы функциясы, супрессорлық факторлар өндірісі, гемопоэзды реттеуіші факторлар өндірісі *in vitro* жағдайында клоногендік белсенділік пен дифференциация сияқты функцияларының индукторы болып табылатыны атап көрсетілді. Бірақ осыны дәлелдейтін нақты мәліметтер жок. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде пролиферация,

белок синтезі және метаболизмың белсенділік сияқты осы белсенділігіне қатысты негізгі үш негізгі үрдістің бақылау тобына қарағанда АФП-егілген жануарлардың сүйек кемігінің ГБЖ субпопуляцияларында едөур карынды жүретін анықталды. АФП экзогенді енгізу зерттелген ГБЖ субпопуляцияларында TGF- $\beta_1$ , IL-10, NO және PGE<sub>2</sub> сияқты супрессорлық факторлардың өндірісінің жоғарылауына өкелді. FLT3L, KL, SCK1L, IL-3, M-CSF, GM-CSF, Epo, HGF және SCF гемопоэздың реттеуіші факторларының секрециялануының немесе *de novo* өндірісінің айтарлықтай жоғарылауы бақылау тобына қарағанда АФП-егілген жануарларда анықталды. АФП-өндөлген жануарлардың ГБЖ субпопуляцияларында клоногендік белсенділігі де салыстырмалы жоғары болған. ГБЖ субпопуляциясының дифференциациясының анализі АФП-өндөлген жануарларда олардың екі бағытқа трансформацияланатынын көрсетті - монопиттер/макрофагтар және эритроциттер, ал бақылау топтеп салыстырған кезде басқа түрлөрі анықталмағанымен айқындалады. Анықталған реттеуіші өсерлер тек АФП қатысты болды, ейткені гомологиялық ең жақын сарысулық альбуминді қолдану бұл параметрлердің айтарлықтай өзгерісіне өкелмеді. Сөйтіп алынған мәліметтер АФП жануарлардың сүйек кемігінің ГБЖ биологиялық белсенділігінің реттеуіші факторының қызметін атқаратаңын дәлелдейді.

### Summary

In our previous work, we discovered AFP as a biological activity inductor of mice bone marrow CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> hematopoietic stem cells (HSCs) *in vitro* such functions as growth function, production of suppressorogenic factors, hematopoiesis regulatory factors production, clonogenic activity and differentiation. However, the strong evidence of AFP involving in related biological functions of HSCs *in vivo* is absence. As a result three major cell processes involved in maintenance of cell growth functions: proliferation, protein synthesis and metabolism were significantly elevated in isolated subpopulation of bone marrow HSCs from AFP-treated animals in comparison with control group of animals. Exogenous AFP administration led to considerable increase production such suppressorogenic factors as TGF- $\beta_1$ , IL-10, NO and PGE<sub>2</sub> in studied HSCs subpopulation. In comparison to control animals production of hematopoiesis regulatory factors such as FLT3L, KL, SCK1L, IL-3, M-CSF, GM-CSF, Epo, HGF and SCF were rose or displayed *de novo* under AFP treatment. Clonogenic activity of in studied HSCs subpopulation of AFP-treated animals was significantly increased. Differentiation analysis of AFP-treated animals HSCs subpopulation demonstrated their transformation into both monocytes/macrophages and erythrocytes while other line markers weren't detected in comparison to control animals. These AFP regulatory effects on HSCs biological activity were strictly AFP-depended, because serum albumin which is the protein more closely stands to AFP by the structure and nonspecifically interacts with HSCs surface reliable effected on functional potential of HSCs by all investigated parameters. These findings, along with those of our previous *in vitro* studies showing that AFP play role regulatory factor of biological activity HSCs in animal bone marrow.