

УДК 573.6

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА РАЗВИТИЕ ОРГАНОТИПИЧЕСКИХ КУЛЬТУР ТКАНЕЙ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

¹Земчихина В.Н., ²Поправка Е.С., ^{2,3}Линькова Н.С., ^{2,4}Чалисова Н.И.

¹ЗАО «Институт Новые медицинские технологии», Пермь, e-mail: vellbiogen@mail.ru;

²АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»,
Санкт-Петербург, e-mail: katrine1994@mail.ru;

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, e-mail: miayu@yandex.ru;

⁴Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: ni_chalisova@mail.ru

Альфа-фетопротейн (АФП) – гликопротеин с молекулярной массой 69 кДа, который образуется при развитии эмбриона. Лекарственный препарат АФП является иммуномодулятором и используется при лечении астмы, гепатитов, миомы матки, различных инфекционных заболеваний. Однако геропротекторное действие АФП на органы иммунной системы до сих пор не изучено. Цель работы – оценить влияние АФП в органотипических культурах тимуса и селезенки крыс разного возраста. Исследование проводили на органотипических культурах тимуса и селезенки молодых (3 мес.) и старых (20 мес.) крыс линии Wistar. В контрольные культуры добавляли физиологический раствор, а в экспериментальные – АФП в диапазоне концентраций 0,01–100 мкг/мл. Эксплантаты культивировали 3 дня в стандартных условиях. В процессе культивирования вокруг эксплантатов образовывалась зона роста, состоящая из мигрирующих и регенерирующих клеток. Определяли индекс площади (ИП), который рассчитывали в процентах как соотношение площади всего эксплантата вместе с зоной роста к площади центральной зоны эксплантата. Для расчета ИП эксплантатов использовали программу PhotoM 1.2. ИП зоны роста органотипической культуры ткани тимуса молодых и старых крыс при добавлении АФП в эффективной концентрации 1 мкг/мл достоверно возрастал соответственно на 35% и 21% по сравнению с контролем. ИП зоны роста органотипической культуры селезенки молодых и старых крыс при добавлении АФП в эффективной концентрации 1 мкг/мл достоверно увеличивался соответственно на 39% и 26% по сравнению с контролем. Таким образом, препарат АФП в эффективных концентрациях влияет стимулирующим образом на регенерацию в иммунной ткани, оказывая также геропротекторное действие на органы иммунной системы старых крыс – тимус и селезенку.

Ключевые слова: альфа-фетопротейн, геропротекция, иммунная система, органотипическая культура ткани

INFLUENCE OF ALPHA-FETOPROTEIN ON THE DEVELOPMENT OF TYMUS AND SPLEEN ORGANOTYPIC CULTURES OF YOUNG AND OLD RATS

¹Zemchikhina V.N., ²Popravka E.S., ^{2,3}Linkova N.S., ^{2,4}Chalisova N.I.

¹Institute of New Medical Technologies, Perm, e-mail: vellbiogen@mail.ru;

²St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, e-mail: katrine1994@mail.ru;

³Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, e-mail: miayu@yandex.ru;

⁴I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, e-mail: ni_chalisova@mail.ru

Alpha-fetoprotein (AFP) is a glycoprotein with a molecular mass of 69 kDa, which is formed when the embryo develops. The drug AFP is an immunomodulator and is used in the treatment of asthma, hepatitis, uterine fibroids, various infectious diseases. However, the geroprotective effect of AFP on the organs of the immune system has not yet been studied. The aim of the work is to evaluate the effect of AFP in organotypic cultures of the thymus and spleen of rats of different ages. The study was carried out on organotypic cultures of the thymus and spleen of young (3 months) and old (20 months) Wistar rats. In the control cultures, physiological saline was added, and in the experimental cultures AFP was added at concentration diapason 0.01 – 100 µg / ml. Explants was grown 3 days under standard conditions. During cultivation, a growth zone consisting of migrating and regenerating cells formed around the explants. The area index (PI) was calculated, which was calculated in% as the ratio of the area of the entire explant with growth zone to the area of the central explant zone. To calculate the explorer IP used the program PhotoM 1.2. The IP of the growth zone of the organotypic culture of the thymus tissue of young and old rats, when AFP was added at an effective concentration of 1 µg / ml, significantly increased by 35% and 21%, respectively, compared with the control. The IP of the growth zone of the organotypic culture of the spleen of young and old rats, when AFP was added at a concentration of 1 µg / ml, significantly increased by 39% and 26%, respectively, compared with the control. Thus, the AFP preparation at an effective concentrations has a regeneration stimulating effect on immune tissue, and so the geroprotective effect on the organs of the immune system in old rats – thymus and spleen.

Keywords: alpha-fetoprotein, geroprotection, immune system, organotypic tissue culture

Альфа-фетопротейн (АФП) – гликопротеин с молекулярной массой 69 кДа, который образуется при развитии эмбриона. Лекарственный препарат АФП является иммуномодулятором и используется при лечении астмы, гепатитов, миомы матки, диабета, саркоидоза, онкологии, урогенитальных инфекций, рассеянного

склероза, постинфекционных поражений сердца и почек, постинсультных состояний, тромбоокклюзионных поражений сосудов, язвенных болезней кишечника, ожогов, для улучшения потенции, входит в состав косметики. АФП оказывает стимулирующее воздействие на рост и пролиферацию фибробластов. Обладает синергизмом по отношению к эпидермальному, трансформирующему и инсулиноподобному факторам роста, оказывает влияние на метаболизм стероидных гормонов. Способен активировать ген апоптоза и запускать механизм запрограммированной гибели раковой клетки (аналогично фактору некроза опухоли). Обнаружена способность препятствовать связыванию вирусов с мембранами лимфоцитов и ограничивать атаку аутоантител на специфические сайты и рецепторы клетки. Показана эффективность при лечении заболеваний с выраженным аутоиммунным компонентом (аутоиммунные поражения щитовидной и поджелудочной желез, спаечная болезнь, артриты, артрозы, астма, постинфекционные поражения сердца и почек, миастения и т.д.), изучается возможность применения в комплексной терапии сахарного диабета, ревматизма, злокачественных опухолей и ряда других заболеваний, ассоциированных с возрастом, трудно поддающихся лечению [1–3]. Несмотря на широкий список показаний к применению АФП при различных патологиях, его геропротекторное действие на органы иммунной системы до сих пор не изучено.

Эффективность АФП при лечении астмы. В последние десятилетия сохраняется тенденция к повышению количества пациентов с тяжелыми формами аллергических заболеваний, в первую очередь бронхиальной астмы (БА). Усугублению БА способствует применение традиционно применяемых лекарственных средств. Нарушение функции аутомикрофлоры и, как следствие, повторные курсы глюкокортикостероидов, антигистаминных антибиотиков приводят к нежелательным иммунным сдвигам [4, 5]. Был изучен иммунный статус у пациентов с БА со среднетяжелым и тяжелым течением с целью подбора эффективной иммунотерапии. В качестве иммуномодулятора применяли АФП. Будучи транспортным белком, АФП обладает регуляторными качествами, способствует активной отрицательной селекции аутореактивных клонов лимфоцитов и аутоантител, появившихся в условиях иммуносупрессии. АФП оказывал нормализующее влияние на обменные процессы у пациентов с БА, улучшал функции легких и дренаж мокроты, способство-

вал исчезновению одышки [6, 7]. Обладая гепатотропным действием, АФП обеспечивал детоксикационный эффект (особенно при внутривенном введении) у пациентов с БА. Препарат оказал положительное влияние на метаболизм стероидных гормонов, что позволило применять их в количестве 50–75% от необходимой лечебной дозы, что в случаях гормонозависимости достаточно успешно [8].

Эффективность АФП при лечении неспецифической патологии желудочно-кишечного тракта. Анализ эффективности препарата АФП в комплексном лечении больных с неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и болезнью Крона позволил выявить его выраженное положительное влияние на течение этих заболеваний и ближайший результат лечения. Указанные позитивные изменения верифицированы биохимическими, гематологическими и иммунологическими тестами, а также рентгенологическим и эндоскопическим исследованиями. Установлено, что применение АФП у больных неспецифическими заболеваниями кишечника (НЯК, гранулематозный илеоколит) способствует снижению уровня аутоиммунных реакций через реализацию подавления избыточного антителообразования (IgG) и активированных клеток иммунитета (CD54+, CD11b+). Наряду с выраженным положительным терапевтическим влиянием АФП ни в одном из наблюдений не отмечено ухудшения состояния пациентов или иных побочных эффектов, что свидетельствует о хорошей переносимости препарата. Получены статистически достоверные данные, позволяющие судить о безопасности и эффективности АФП в комплексном лечении больных НЯК и болезнью Крона [9, 10].

Эффективность АФП при лечении аутоиммунного тиреоидита. АФП применяется в комплексной терапии при аутоиммунном тиреоидите (болезни Хашимото). Прием данного препарата помогает снизить уровень антител против тиреоглобулина, являющегося одним из необходимых компонентов для синтеза гормонов щитовидной железы. Кроме этого, АФП восстанавливает уровень CD3+ и CD8+ Т – клеток, повышает исходно сниженный уровень иммуноглобулинов (IgA, M, G), увеличивает продукцию эндогенного тироксина и трийодтиронина [11, 12]. Однако исследований о влиянии АФП на регенерацию тканей иммунной системы не проводилось.

Цель исследования: оценить влияние АФП на развитие органотипических культур тканей тимуса и селезенки крыс разного возраста.

Материалы и методы исследования

В экспериментах было использовано более 300 фрагментов тимуса и селезенки 3-месячных (молодых) и 20-месячных (старых) самцов крыс линии Вистар. Работа проведена на крысах из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России. Отпрепарированные фрагменты ткани разделяли на фрагменты величиной около 1 мм³, которые помещали в чашки Петри с полилизинным покрытием. Питательная среда состояла из 35 % среды Игла, 35 % раствора Хенкса, 25 % фетальной телячьей сыворотки. В среду добавляли глюкозу (0,6%), инсулин (0,5 ед/мл), гентамицин (100 ед/мл).

Далее исследуемые культуры (селезенки и тимуса молодых и старых крыс) были разделены на группы, как показано в таблице. В чашки Петри с экспериментальными эксплантатами добавляли 3 мл питательной среды с исследуемой концентрацией АФП, в чашки Петри с контрольными эксплантатами – 3 мл питательной среды, без добавления препарата. Таким образом, эксплантаты экспериментальных и контрольной групп развивались в одинаковых объемах питательной среды. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37 °С в условиях постоянного поступления 5 % СО₂ и через 3 сут просматривали под фазово-контрастным микроскопом. Определяли индекс площади (ИП), как отношение площади эксплантата вместе с зоной роста к исходной площади. Статистическая обработка данных проведена в программе «Statistica 6.0».

Схема проведения эксперимента

Тип органотипической культуры ткани	Группы
Тимус молодых крыс	1 – контроль 2 – АФП, 0,01 мкг/мл
Тимус старых крыс	3 – АФП, 0,1 мкг/мл 4 – АФП, 1 мкг/мл 5 – АФП, 10 мкг/мл
Селезенка молодых крыс	6 – АФП, 100 мкг/мл 4 – АФП, 1 мкг/мл
Селезенка старых крыс	5 – АФП, 10 мкг/мл 6 – АФП, 100 мкг/мл

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние альфа-фетопротейна на рост органотипической культуры тимуса молодых крыс. ИП зоны роста органотипической культуры ткани тимуса молодых крыс при добавлении АФП в концентрации 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл достоверно возрастал соответственно на 26 % и 35 % по сравнению с контролем (рис. 1), что свидетельствует о стимулирующем воздействии АФП в данных концентрациях на пролиферацию ткани органотипической культуры тимуса молодых крыс. Добавление данно-

го пептида в концентрациях 0,01; 10; 100 и 1000 мкг/мл не обладало выраженным эффектом. Кроме того, добавление АФП в концентрации 1000 мкг/мл обладало ингибирующим действием на рост органотипической культуры ткани тимуса молодых крыс и незначительно понижало ИП по сравнению с контролем. Это связано с тем, что в культуре ткани большие концентрации биологически активных веществ являются уже сверхсильными и вызывают контактное торможение роста клеток. Таким образом, препарат АФП в эффективных концентрациях 0,1 и 1 мкг/мл оказывал иммуностимулирующее действие на тимус молодых крыс.

Влияние альфа-фетопротейна на рост органотипической культуры тимуса старых крыс. ИП зоны роста органотипической культуры ткани тимуса старых крыс при добавлении АФП в концентрациях 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл достоверно возрастал соответственно на 16 %, 21 % и 15 % по сравнению с контролем (рис. 2), что свидетельствует о стимулирующем воздействии АФП в данных концентрациях на рост органотипической культуры тимуса старых крыс. Добавление АФП в концентрациях 0,01; 100 и 1000 мкг/мл не влияло на ИП эксплантатов тимуса старых крыс. Таким образом, препарат АФП в эффективной концентрации 0,1; 1 и 10 мкг/мл оказывает геропротекторное действие на центральный орган иммунной системы – тимус.

Влияние альфа-фетопротейна на рост органотипической культуры селезенки молодых крыс. ИП зоны роста органотипической культуры ткани селезенки молодых крыс при добавлении АФП в концентрации 0,1 мкг/мл достоверно возрастал на 20 %, а при добавлении препарата в концентрации 1 мкг/мл ИП достоверно возрастал на 39 % по сравнению с контролем (рис. 3). ИП зоны роста органотипической культуры ткани селезенки молодых крыс при добавлении АФП в концентрации 10 мкг/мл возрастал на 16 %, а при концентрации 100 мкг/мл – на 12 % по сравнению с контролем (рис. 3), что свидетельствует о стимулирующем действии АФП в данных концентрациях на рост органотипической культуры селезенки молодых крыс. Добавление АФП в концентрациях 0,01 и 1000 мкг/мл не обладало стимулирующим эффектом на ИП зоны роста органотипической культуры селезенки молодых крыс. Таким образом, препарат АФП в эффективных концентрациях 0,1; 1; 10 и 100 мкг/мл оказывал иммунопротекторное действие на селезенку молодых крыс.

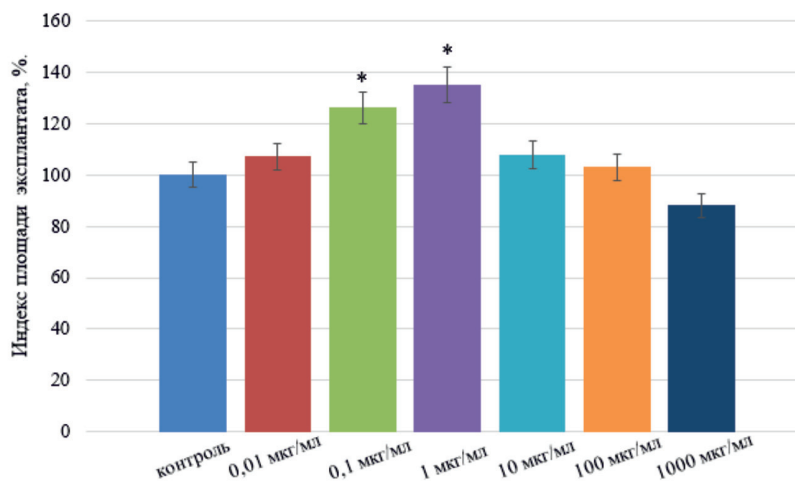


Рис. 1. Влияние альфа-фетопротейна на индекс площади эксплантатов органотипической культуры тимуса молодых крыс. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

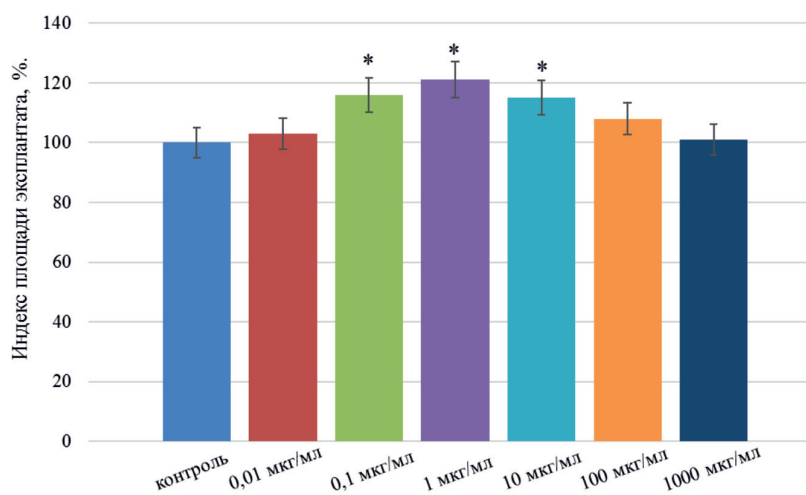


Рис. 2. Влияние альфа-фетопротейна на индекс площади эксплантатов органотипической культуры тимуса старых крыс. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

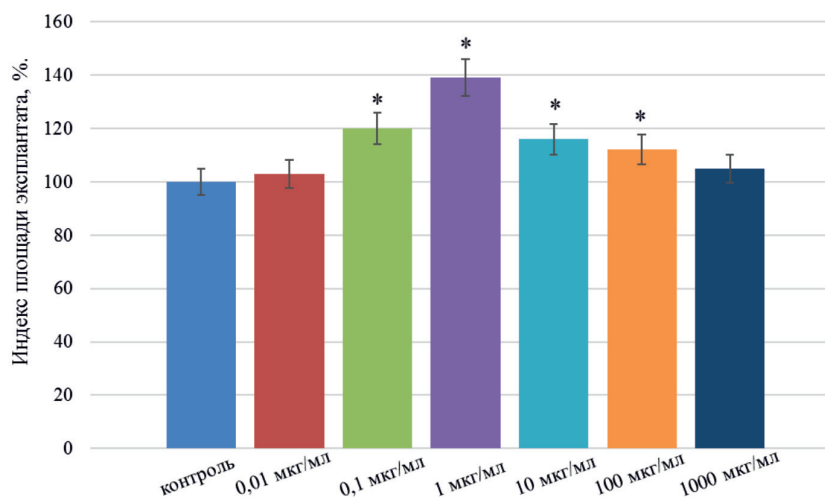


Рис. 3. Влияние альфа-фетопротейна на индекс площади эксплантатов органотипической культуры селезенки молодых крыс. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

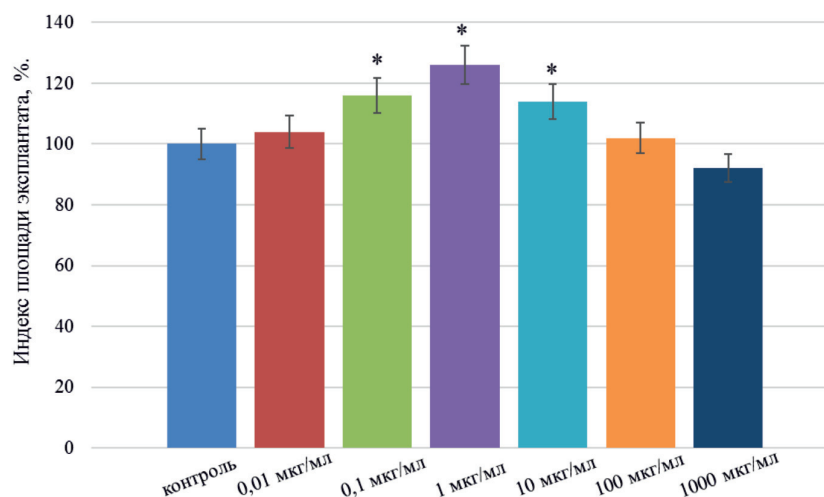


Рис. 4. Влияние альфа-фетопротейна на индекс площади эксплантатов в органотипической культуре селезенки старых крыс. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Влияние альфа-фетопротейна на рост органотипической культуры селезенки старых крыс. Эффективное влияние АФП на рост органотипической культуры селезенки старых крыс было обнаружено при концентрациях препарата 0,1; 1 и 10 мкг/мл, где ИП зоны роста достоверно возростал соответственно на 16, 26 и 14% по сравнению с контролем (рис. 4). Этот факт свидетельствует о стимулирующем воздействии АФП в данных концентрациях на рост органотипической культуры селезенки старых крыс. Добавление АФП в концентрациях 0,01; 100 и 1000 мкг/мл не обладало статистически значимым эффектом в отношении ИП зоны роста эксплантатов органотипической культуры селезенки старых крыс. АФП в концентрации 1000 мкг/мл обладал ингибирующим действием на рост органотипической культуры селезенки старых крыс. Таким образом, препарат АФП в эффективных концентрациях 0,1; 1 и 10 мкг/мл оказывает геропротекторное действие на селезенку.

Закключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрации АФП, стимулирующие рост органотипической культуры ткани тимуса молодых крыс, находились в диапазоне 0,1 и 1 мкг/мл, концентрации АФП, стимулирующие рост органотипической культуры ткани тимуса старых крыс, в диапазоне 0,1–10 мкг/мл. В таком же диапазоне АФП влиял стимулирующим образом на эксплантаты ткани селезенки

ки старых крыс. В тканях селезенки молодых крыс этот диапазон был наиболее широким 0,1–100 мкг/мл. Эффективными концентрациями АФП оказались концентрации 1 мкг/мл, оказывающие наибольшее влияние на клеточную регенерацию, ИП при этом увеличивался на 35% и 21% в тканях тимуса молодых и старых крыс соответственно, и на 39% и 26% в тканях селезенки молодых и старых крыс соответственно. Таким образом, препарат гликопротеин альфа-фетопротейн оказывает выраженное стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию в иммунных тканях не только у молодых животных, но и у старых. Это открывает перспективы для применения АФП при различной патологии органов иммунной системы, в том числе при заболеваниях, ассоциированных с возрастом.

Список литературы

1. Krut'ko V.N., Dontsov V.I., Khalyavkin A.V. Effect of Alpha-Fetoprotein on Lifespan of Old Mice. *Biochemistry*, 2016, vol. 81, no. 12, pp. 1477–1479.
2. Meng W., Li X., Bai Z., Li Y., Yuan J., Liu T., Yan J., Zhou W., Zhu K., Zhang H., Li Y. Silencing alpha-fetoprotein inhibits VEGF and MMP-2/9 production in human hepatocellular carcinoma cell. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 28.
3. Bredaki F.E., Poon L.C., Birdir C., Escalante D., et al. First-trimester screening for neural tube defects using alpha-fetoprotein. *Fetal. Diagn. Ther.* 2012, vol. 31, no. 2, pp. 109–114.
4. Nikulina D, Terentyev A, Galimzyanov K, Jurisic V. Fifty years of discovery of alpha-fetoprotein as the first tumor marker. *Srp Arh Celok Lek*, 2015, vol.143, pp. 100–104.
5. Deshpande N., Chavan R., Bale G. Hereditary Persistence of Alpha-Fetoprotein Is Associated with the -119G>A

Polymorphism in AFP Gene. ACG Case Reports Journal, 2017. vol. 4, pp. 33.

6. Ertle J.M., Heider D., Wichert M., Keller B. et al. A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. Digestion. 2013. vol. 87, no. 2, pp. 121–131.

7. Wang H., Bi X., Xu L., Li Y. Negative interference by rheumatoid factor in alpha-fetoprotein chemiluminescent micro-particle immunoassay. Ann Clin Biochem. 2017. vol. 54, no. 1, pp. 55–59.

8. Wong R.J., Ahmed A., Gish R.G. Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis – hepatocellular carcinoma and other disorders. Clin Liver Dis, 2015, vol. 19, no. 2, pp. 309–323.

9. Lemanske R.F., Busse W.W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. J. Allergy Clin. Immunol, 2010, vol. 125, no. 2., pp. 95–102.

10. Arkhipkin A.A., Liang O.V., Kochetov A.G. The alpha-fetoprotein in prognosis of survival of and functional rehabilitation of patients with ischemic stroke. Klin Lab Diagn, 2014, vol. 59, no. 10, pp. 12–15.

11. Van de Loo K.F., van Gelder M.M., Roukema J., Roeleveld N. Prenatal maternal psychological stress and childhood asthma and wheezing: a meta-analysis. The European respiratory journal, 2016, vol. 47, no. 1, pp. 133–146.

12. Pak V.N. The use of alpha-fetoprotein for the treatment of autoimmune diseases and cancer. Ther Deliv, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 37–46.