

ӘДЕБИЕТТЕР

1. Hanowski J.A., Howe R.V., Smith C.R. Are frog surveys useful for monitoring the environmental condition of coastal wetlands // 49 Annual Conference of the international Association Great lakes Research, Windsor, May 22-26, 2006: Abstracts, 72-73.
2. Roy Debjani. Amphibians as environmental sentinels // J. Biosci. - 2002. - 27. № 3. - С 187-188.
3. Иноземцев А.А. Озерная лягушка сильно выросла // Природа (Россия). - 2002. - № 12. - С. 57-58.
4. Кузьмин С.Л. Земноводные России: сокращение популяций — сигнал опасности. // Наука в России. — 2001. - № 1. - С. 92-93.
5. Bishop Christine A., Gendron Andree. Impacts of chemical pollutants on amphibian populations // Herpetol.'97 : Abstr. 3rd World Congr. Herpetol., Prague, 2-10 Aug.. 1997. - Prague, 1997. - С 1-2.

Проведено сравнительно-гистологическое исследование языка лягушки озерной (Rana ridibunda) и жабы зеленой (Bufo viridis), обитающих в районе Капчагайского водохранилища и накопителя сточных вод Сорбулак. В языке земноводных из района Сорбулака, загрязненного различными токсикантами, наблюдались патоморфологические изменения (дистрофия, воспаление, некроз).

There was a comparing histological research on tongues of frogs and toads inhabited in Kapchagay artificial lake and reservoir manufacturing water called Sorbulak. Pathological morphological changes such as dystrophy, inflammation and necrosis were observed in tongues of amphibious inhabited in polluted with toxins reservoir called Sorbulak.

УДК 577.27; 612.017.1:616-006

**Т.М. БОГДАНОВА, Т.А. СУПНИЯЗОВА, Е.В. РЫБАКОВА,
М.Е. КУЛМАНОВ, А.Ю. БОГДАНОВ**

АКТИВАЦИЯ Ca^{2+} - И α АМФ-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА АФП-ИНЪЕЦИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

(РГП «Научный центр противоифекционных препаратов», Алматы)

Ранее было показано, что индукция биологической активности мышинных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга под воздействием альфа-фетопротейна (АФП) в условиях *in vitro* в значительной степени зависит от активации двух типов Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей: Ca^{2+} /кальмодулин/кальциневринного- и Ca^{2+} /кальмодулин/СаМК каскадов, а также двух α АМФ-зависимых сигнальных путей: α АМФ/Ерас1/2- и α АМФ/РКА каскадов. Однако состояние данных ветвей общего механизма действия АФП в ГСК костного мозга в условиях организма не были изучены. В данной работе мы попытались изучить функционирование выявленных Ca^{2+} -зависимых- и α АМФ-зависимых сигнальных путей в мышинных ГСК костного мозга в условиях *in vivo* при экзогенном введении АФП. В результате, была доказана активация Ca^{2+} /кальмодулин/кальциневринного- и Ca^{2+} /кальмодулин/СаМК каскадов, как и α АМФ/Ерас1/2- и α АМФ/РКА каскадов в изученных субпопуляциях ГСК в костном мозге животных под воздействием экзогенного АФП.

Следовательно, АФП при взаимодействии с ГСК в костном мозге животных инициирует активацию тех же самых механизмов сигнальной трансдукции, что и в условиях *in vitro*, которые, вероятнее всего, и ответственны за генерацию их ответной реакции на данный стимул в виде изменения их биологической активности.

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 в пренатальном развитии плода в качестве ростового фактора /1,2,4-9/. Функциональная активность АФП была выявлена на всех стадиях пренатального 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 /8,19-24/. 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 продемонстрировано прямое индуцирующее влияние АФП на биологическую активность трех различных субпопуляций гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга мышей в условиях *ex vivo*, в частности, на их ростовую и клоногенную активности, самосохранение, коммитирование, дифференциацию и продукцию супрессорных факторов, и, следовательно, супрессорную активность /25-28/. Подобные изменения клеточной активности возможны только при наличии специфической системы внутриклеточной передачи и трансформации индуцирующего сигнала. В ряде работ по изучению молекулярного механизма регуляторного действия АФП /29,30/ была доказана роль ионов Ca^{2+} во внутриклеточной передаче АФП-стимула в ряде линий нормальных и опухолевых клеток *in vitro*. Это подтвердили и наши ранние работы по изучению молекулярного механизма активации биологической активности трех различных субпопуляций ГСК костного мозга мышей под влиянием АФП в условиях *in vitro* /31/.

Кроме того, нами была доказана АФП-индуцированная активация двух типов Ca^{2+} -зависимых путей в ГСК костного мозга: Ca^{2+} /кальмодулин/кальциневринового каскада и Ca^{2+} /кальмодулин/СаМК каскадов в данных типах клеток /32/. Однако, выявленные каскады являлись не единственными регуляторами АФП-индуцируемых транскрипционных факторов /32/. При этом в работах Li M.S. /29,30/ и наших ранних работах /31/ был доказан специфический индуцирующий эффект АФП на синтез цАМФ *in vitro*. Более того, нами были выявлены два цАМФ-зависимых пути: цАМФ/РКА- и цАМФ/Rap1 каскады, через которые реализовался цАМФ-зависимый механизм передачи индуцирующего сигнала АФП /33/. Поэтому в данной работе мы попытались определить активируются ли данные Ca^{2+} - и цАМФ -зависимые пути передачи АФП-стимула в трех изученных субпопуляциях ГСК костного мозга в условиях *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используемые животные

В качестве источника материала (костный мозг) в работе использовали самцов мышей линии СВА весом 20-24 грамма. Эвтаназию мышей осуществляли цервикальной дислокацией после наркотизирования животных.

Введение животным АФП

АФП растворяли в стерильном апиногенном 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 апиногенный 0,9% раствор хлорида натрия в том же объеме. Животных выводили из эксперимента через 24 ч после инъекции АФП.

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 ресуспендировали в данном объеме до получения гомогенной суспензии. Суспензию центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в среде Stemline II Methylcellulose Medium (Sigma, США). Клетки подсчитывали и оценивали процент жизнеспособных клеток при помощи включения раствора трипанового синего (Sigma, США). Во всех экспериментах использовали суспензии с процентом жизнеспособных клеток больше 90%.

Получение субпопуляций ГСК

Полученную суспензию клеток костного мозга наслаивали на ступенчатый градиент плотности перколла (Sigma, США) со следующими плотностями ступенек: $\rho_1=1,13$ г/мл, $\rho_2=1,10$ г/мл, $\rho_3=1,090$ г/мл, $\rho_4=1,076$ г/мл, $\rho_5=1,060$ г/мл и $\rho_6=1,033$ г/мл /33-35/. Клетки центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин при 4°C. Клетки с плавучей плотностью $\rho=1,090$ г/мл /35/ 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 выделяли чистую популяцию CD34⁺ клеток путем позитивной селекции с использованием коммерческих наборов реагентов CD34 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя. Затем из полученной популяции CD34⁺ клеток выделяли CD133⁺ клетки и CD117⁺ клетки при помощи соответствующих наборов реагентов CD133 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Германия) и CD117 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкциям производителя. CD135⁺ клетки выделяли из пула CD34⁺ клеток при помощи биотинилированного антитела к CD135 маркеру (eBioscience, США) и набора реагентов Anti-Biotin MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Процесс выделения популяции CD34⁺ клеток, а также CD34⁺CD133⁺-, CD34⁺CD135⁺- и CD34⁺CD117⁺ клеток из общего пула выделенных CD34⁺ клеток осуществляли при помощи магнитного сепаратора autoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Германия), согласно протоколу производителя. Чистоту выделенных субпопуляций ГСК контролировали проточной цитометрией, используя APC-конъюгированные антитела к CD34 (BD Pharmigen, США), FITC-конъюгированные антитела к CD133 (Miltenyi Biotec, Германия), Alexa Fluor 488-конъюгированные антитела к CD135 (Chemicon, США) и PE-Cy7-конъюгированные антитела к CD117 (BD Pharmigen, США) маркерам или соответствующие меченные изотипические контрольные антитела (BD Pharmigen, США) при помощи проточного цитофлуориметра FACS Canto (BD Bioscience, США), согласно протоколу производителя.

Во всех экспериментах использовали клеточные культуры, состоящие на 90% и более из фенотипически однородных клеток с процентом жизнеспособных клеток 90% и более.

Получение цитоплазматических экстрактов из суспензий ГСК

Цитоплазматические экстракты субпопуляций ГСК извлекали при помощи набора реагентов NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, США), согласно инструкции производителя. Все используемые в ходе выделения цитоплазматических белков растворы содержали 0,5% комплекса ингибиторов протеаз Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit (Pierce, США). После выделения цитоплазматические экстракты диализовали в 5 мл системе для диализа Slide-A-Lyzer MIDI Dialysis Cassette Kit (Pierce, США) против фосфатно-солевого буфера в течение 48 ч при 5°C. Для конечной очистки цитоплазматических белков от посторонних солевых примесей использовали набор реагентов RAGprep Protein Clean-Up and Enrichment Kit (Pierce, США). При невозможности проведения анализа образцов после конечной очистки, их лиофилизировали под вакуумом при помощи роторной лиофильной сушки Integrated SpeedVac Systems SPD2010 (Thermo Savant, Финляндия) и хранили при -86°C.

Количественный анализ содержания внутриклеточных ионов Ca^{2+} в нативном цитозоле и цАМФ в цитоплазматических экстрактах ГСК

Анализ концентрации внутриклеточных ионов Ca^{2+} в нативном цитозоле определяли иммунофлуоресцентным методом при помощи набора реагентов BD Calcium Assay Kit (BD Pharmingen, США), согласно инструкции производителя. Анализ концентрации цАМФ в экстрактах определяли иммуноферментным методом при помощи набора реагентов Cyclic AMP Parameter Assay (R&D Systems, США), согласно инструкции производителя.

Иммунопреципитация

При проведении иммунопреципитации использовали не диализированные цитоплазматические экстракты субпопуляций ГСК. Полученные экстракты очищали путем их смешивания в соотношении 1:1 с неспецифическими мышиными антителами (Clontech, США) в титре 1:2000 и 100 мкл суспензии протеин А-Сефарозы (Amersham Biosciences, Швеция) /36/. Суспензию инкубировали 3 ч при 4°C, а затем центрифугировали при 500 g в течение 2 мин при 4°C. К полученному супернатанту добавляли соответствующие специфические антитела (конечный титр 1:1000) к неактивной форме изучаемого сигнального белка в соотношении 1:1 и 100 мкл суспензии протеин G-Сефарозы (Amersham Biosciences, Швеция) /36/. В экспериментах использовали следующие антитела к сигнальным молекулам: анти-Erac1 (Santa Cruz Biotechnology, США) и анти-Erac2 (Santa Cruz Biotechnology, США). Суспензию инкубировали при постоянном встряхивании в течение 12 ч при 4°C и центрифугировали при 5000 g в течение 2 мин при 4°C. Супернатант удаляли, а осадок бидс отмывали 5 раз в 1 мл отмывочного буфера (0,5 mM Трис-HCl буфер с pH 8,0 (Sigma, США), содержащий 0,5 M NaCl (Sigma, США), 5,0 mM EDTA (Sigma, США), 0,02% NaN_3 (Sigma, США), 0,5% Тритона X-100 (Sigma, США), 0,5% DOC (Sigma, США) и 0,1% SDS (Sigma, США)) /36/. После конечной отмывки к осадку бидс добавляли 50 мкл 2-кратного буфера для образцов (0,0625 M Трис-HCl буфер (pH 6,8), включающий 2% SDS, 20% глицерина (Sigma, США), 5% меркаптоэтанола (Sigma, США) и 0,01% Бромфенолового синего (Sigma, США)), смешивали и нагревали на водяной бане при 100°C в течение 5 мин. Иммунопреципитат переносили напрямую в SDS гель для анализа.

Вестерн блоттинг и иммуноблоттинг

SDS-электрофорез проводили согласно протоколу Laemmli U. /36/, при этом концентрирующий гель состоял из 4% полиакриламида в 0,375 M Трис-HCl буфере (pH 8,8) с добавлением 0,1% SDS, 0,1% персульфата аммония (Bio-Rad, США) и 0,05% TEMED (Bio-Rad, США) /36/.

Разделяющий гель являлся 4-20% градиентным гелем, который готовили наслаиванием 2-х растворов акриламида с различным процентным содержанием, разведенных в 0,125 М Трис-НСl буфере (рН 6,8), включающем 0,1% SDS, 0,1% персульфата аммония и 0,05% TEMED /36/. Электродный буфер (рН 8,3) состоял из 0,025 М Триса, 0,192 М глицина (Sigma, США) и 0,1% SDS /36/. Образцы белков готовили в 0,0625 М Трис-НСl буфере (рН 6,8), включающем 2% SDS, 20% глицерина, 5% меркаптоэтанол и 0,01% Бромфенолового синего /36/. Электрофорез белков проводили при помощи PROTEAN II Ready Gel System (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя. Концентрирование белков проводили при 80 В и 100 мА, а разделение белков - при 120 В и 200 мА.

Гель переносили на 0,2 мкм PVDF мембрану FluoroTrans W (Pall, США) с помощью аппарата для электропереноса белков PROTEAN II Trans-Blot Cell (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя. PVDF мембрану обрабатывали 1 ч 3% раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в фосфатно-солевом буферном растворе при 24°C. После этого мембрану отмывали трижды фосфатно-солевым буферным раствором и инкубировали в течение 3 ч при 37°C с анти-фосфо(Thr196)-CaMKIV антителом (Santa Cruz Biotechnology, США) или, в случае использования антител к Erac1 и Erac2, со смесью анти-фосфотреонинового (BD Transduction Laboratories), анти-фосфотирозинового (BD Transduction Laboratories) и анти-фосфосеринового (BD Transduction Laboratories) антител (титр 1:1000) в соотношении 1:1. PVDF мембрану трижды отмывали фосфатно-солевым буфером. Иммунореактивные банды выявляли с помощью набора реагентов LumiGLO (Cell Signaling Technology, США), согласно инструкции производителя. Подсохшую мембрану укладывали в кассету с пленкой для регистрации X-лучей Kodak X-Omat Blue Autoradiography Film (Kodak, Япония). Распределение автордиографов белков на пленке документировали при помощи системы Polaroid Gel Documentation System (Bio-Rad, США), согласно инструкции производителя.

Оценка активности регуляторных энзимов

В клеточных экстрактах или цельных индуцированных клетках определяли уровень активности киназы CaMKII, кальциневрина PKA и Rap1 при помощи коммерческих наборов реагентов SignaTEST CaMKII Assay System (Promega, США), Calcineurin Assay Kit (Calbiochem, США), PKA Kinase Activity Assay Kit (Stressgen Bioreagents, США) и EZ-Detect Rap1 Activation Kit (Pierce, США), согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка данных

Эксперименты по качественному выявлению активных форм сигнальных молекул проводились в трех независимых экспериментах. Эксперименты по количественному анализу функциональной активности и содержания активированных форм сигнальных молекул проводились в трехкратной повторности в трех независимых экспериментах. Для всех численных данных высчитывалось среднее арифметическое значение (М) и стандартное отклонение (m). Коэффициент Стьюдента (t) использовался для выявления достоверности различий между экспериментальными значениями. Значения достоверности $P > 0,05$ считались не существенными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе анализа был изучен уровень выявленных *in vitro* вторичных мессенджеров в цитоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга инъектированных АФП животных. В результате, было показано, что введенный АФП достоверно повышал как транспорт ионов Ca^{2+} так и синтез цАМФ во всех трех изученных типах ГСК костного мозга *ex vivo* по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор (таблица 1).

На втором этапе были исследованы основные компоненты выявленных *in vitro* Ca^{2+} - и цАМФ-зависимых сигнальных путей в цитоплазме трех изученных субпопуляций ГСК костного мозга АФП-инъектированных животных.

Как показано на рисунке 1А и 1В, активность кальциневрина в $\text{CD34}^+\text{CD133}^-$ - и $\text{CD34}^+\text{CD117}^+$ ГСК, как и активность СаМКII были достоверно выше у АФП инъектированных животных по сравнению с контрольной группой. Кроме этого, содержание фосфорилированной формы СаМКIV в $\text{CD34}^+\text{CD133}^-$ - и $\text{CD34}^+\text{CD117}^+$ ГСК было в значительной степени преобладало над содержанием СаМКIV в аналогичных субпопуляциях ГСК контрольной группы животных (рисунок 1Б).

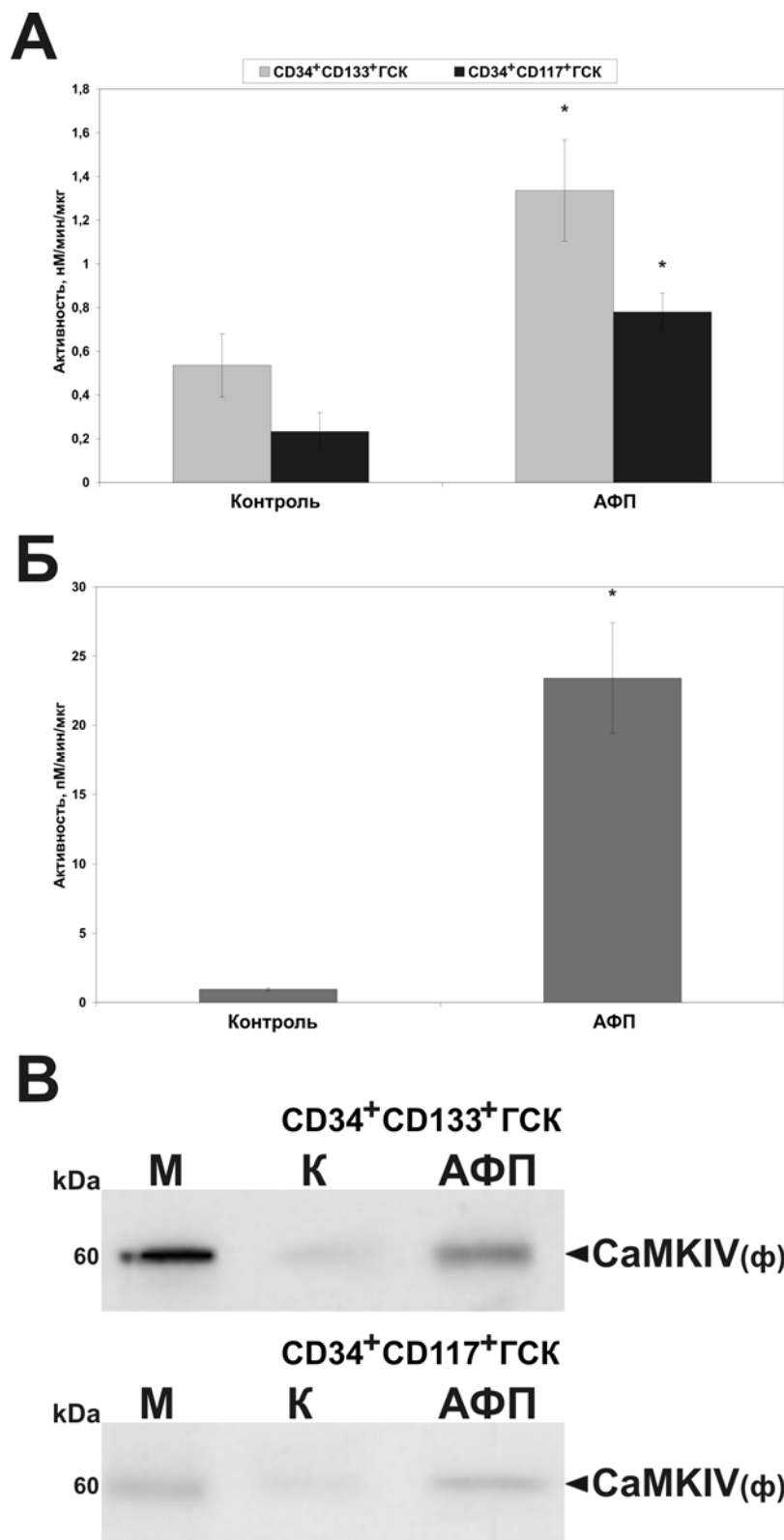
Таблица 1

Уровень ионов Ca^{2+} и цАМФ в цитоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга после введения животным АФП

Субпопуляции ГСК	Группы животных	Вторичные мессенджеры	
		vCa^{2+} , нМ/мл	цАМФ, пМ/мл
$\text{CD34}^+\text{CD133}^+$	Контроль	54,5±9,2	6,0±1,9
	АФП	148,5±8,7*	35,1±8,51*
$\text{CD34}^+\text{CD135}^+$	Контроль	11,6±4,4	2,0±0,4
	АФП	117,4±19,9*	23,2±3,8*
$\text{CD34}^+\text{CD117}^+$	Контроль	34,8±7,8	5,1±1,3
	АФП	84,7±7,6*	15,2±3,3*
Обозначения: vCa^{2+} - внутриклеточные ионы Ca^{2+} ; цАМФ – циклический аденозин-монофосфат; «*» - достоверность результатов по сравнению с контролем $P<0,05$			

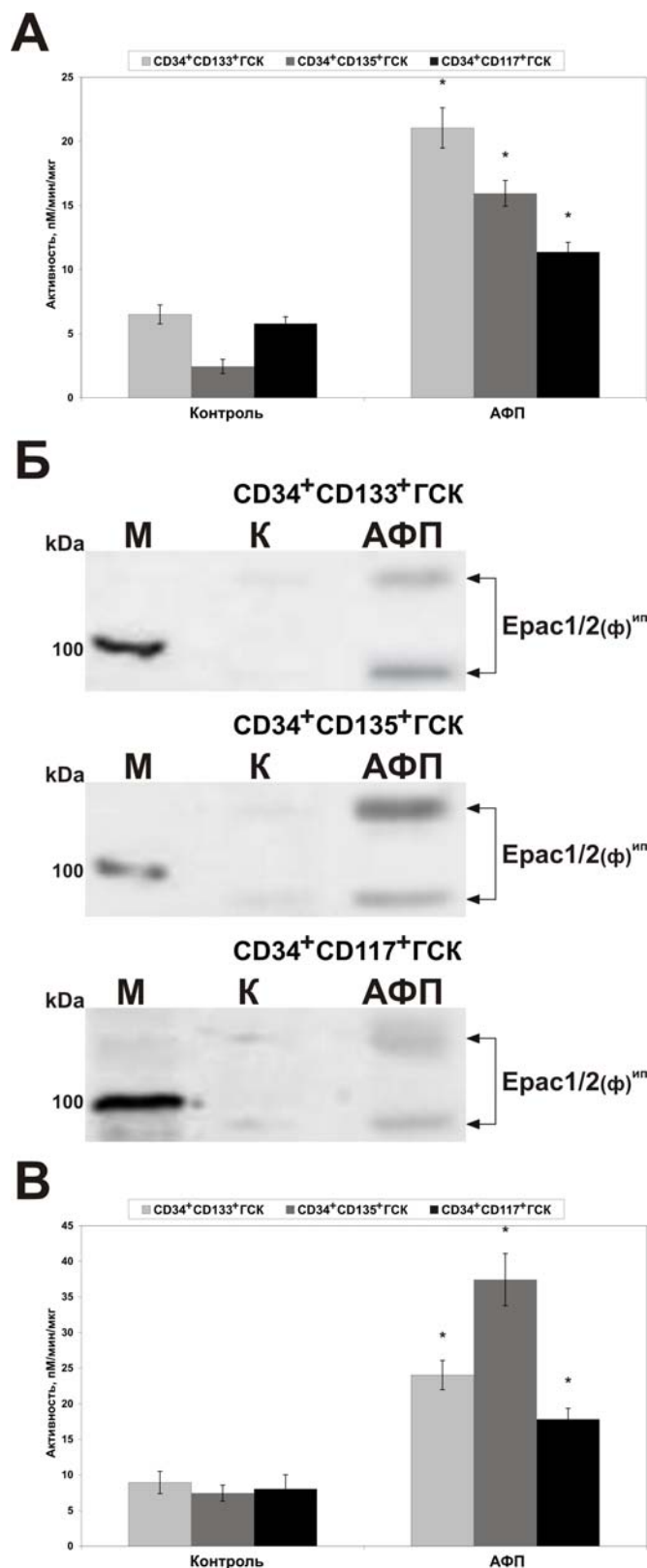
Изучение состояния основных компонентов цАМФ-зависимых сигнальных путей в цитоплазме трех ГСК, показало достоверное увеличение активности обоих РКА и Rap1 у АФП инъектированных животных, по сравнению с контрольной группой (рисунок 2А и 2В). Кроме этого, содержание фосфорилированного Ерас1/2 во всех изучаемых субпопуляциях ГСК преобладало над содержанием активного Ерас1/2 в аналогичных субпопуляциях контрольных животных (рисунок 2 Б).

Таким образом, на основании полученных результатов, можно констатировать активацию выявленных Ca^{2+} /кальмодулин/кальциневринового- и Ca^{2+} /кальмодулин/СаМК каскадов, как и цАМФ/Ерас1/2- и цАМФ/РКА каскадов, в трех изученных субпопуляциях ГСК в костном мозге животных под воздействием экзогенного АФП. Следовательно, АФП при взаимодействии с ГСК в костном мозге животных инициирует активацию тех же самых механизмов сигнальной трансдукции, что и в условиях *in vitro*, которые, вероятнее всего, и ответственны за генерацию их ответной реакции на данный стимул в виде изменения их биологической активности в костном мозге.



Обозначения: А – Уровень активности кальциневрина; Б – Уровень активности CaMKII в CD34⁺CD133⁺ ГСК; В – Содержание фосфорилированной CaMKIV; «*» - достоверность результатов в сравнении с контролем $P < 0,05$.

Рисунок 1. Активация основных структурных компонентов Ca^{2+} -зависимых путей в цитоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга после введения животным АФП



Обозначения: А – Уровень активности РКА; Б – Содержание фосфорилированного Ерас1/2; В – Уровень активности Раp1; «*» - достоверность результатов в сравнении с контролем $P < 0,05$.

Рисунок 2. Активация основных структурных компонентов цАМФ-зависимых путей в цитоплазме трех субпопуляций ГСК костного мозга после введения животным АФП

ЛИТЕРАТУРА

1. Mizejewski G.J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development // Exp. Biol. Med. - 2004. - Vol. 229, - P. 439-463.
2. Yin Z.F., Wang C.H. Research advances on alpha-fetoprotein physiological function and clinical potential // Ai Zheng. - 2003. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. Histochem. - 1982. - Vol. 261, - P. 53-63.
7. 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. - Vol. 44, - P. 689-697.
8. Ruoslahti E., Seppala M. Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. // Adv. Cancer Res. - 1979. - Vol. 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. - Vol. 99, - P. 12865-12870.
10. Gillespie J.R., Uversky V.N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical review // Biochim. Biophys. Acta. - 2000. - Vol. 1480, - P. 41-56.
11. Chen H., Egan J., Chiu J.F. Regulation and activities of alpha-fetoprotein // Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Exp. - 1997. - Vol. 7, - P. 11-41.
12. Mizejewski G. Levels of AFP during pregnancy and early infancy in normal and disease states // Obstet. Gynecol. Surv. - 2003. - Vol. 58, - P. 17-35.
13. Dudich E., Semenkova L., Gorbatoeva E., Dudich I., Khromykh L., Tatulov E., Grechko G., Sukhikh G. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells // Tumor Biol. - 1988. - Vol. 19, - P. 30-40.
14. Toder V., Bland M., Gold-Geftel L., Nebel J. The effect of alpha-fetoprotein on the growth of placental cells *in vitro* // Placenta. - 1983. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 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. - Vol. 277, - P. 27629-27635.
24. Рыбакова Т.М., Фомичева Е.В., Дубешко С.Ю., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. Влияние альфа-фетопротейна на биологическую активность гемопоэтических стволовых клеток в условиях *ex vivo* I: воздействие на ростовой потенциал // Биотех. Теор. Практ. - 2007. - №1, - С.76-91.

25. Рыбакова Т.М., Низкородова А.С., Жигайлов 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. и Практик. - 2007. - №1, - С. 92-114.
26. Rybakova T.M., Bogdanov A.Yu., Belyaev N.N. Alpha-fetoprotein activated hematopoietic stem cells modulate cell mediated immune response // Abstracts-book of 16th European Congress of Immunology, September 6-9, Paris, France. - 2006. - P. 181.
27. Bogdanov A.Yu., Rybakova T.M., Belyaev N.N. Effect of alpha-fetoprotein activated hematopoietic stem cells on B cells differentiation and effector functions // Abstracts-book of 16th European Congress of Immunology, September 6-9, Paris, France. - 2006. - P. 182.
28. Li M.S., Li P.F., He S.P., Du G.G., Li G. The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line // World J. Gastroenterol. - 2002. - Vol. 8, - P. 469-475.
29. Li M.S., Li P.F., Yang F.Y., He S.F., Du G.G., Li G. The intracellular mechanism of alpha-fetoprotein promoting the proliferation of NIH 3T3 cells // Cell. Res. - 2002. - Vol. 12, - P. 151-156.
30. Богданова Т.М., Богданов А.Ю., Беляев Н.Н. Анализ вторичных мессенджеров в функциональной активности гемопоэтических стволовых клеток при их индукции альфа-фетопротеином // Биотех. Теор. и Практик. - 2008. - №1, - С. 50-68.
31. Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Фомичева Е.В., Калыкова А.С., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. Структура Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного сигнала альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // Здор. и Болез. - 2008. - №6, - С.121-138.
32. Богданова Т.М., Рыбакова Е.В., Дубешко С.Ю., Бедарева Т.Е., Беляев Н.Н., Кулманов М.Е., Богданов А.Ю. Структура цАМФ-зависимых сигнальных путей, вовлеченных в передачу регуляторного импульса альфа-фетопротеина в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга // Здор. и Болез. - 2009. - №6, - С.120-143.
33. Sugiura K, Ikehara 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. - Vol. 20, - P. 256-263.
34. Закирьянова Г.К., Беляев Н.Н. Изопикническое разделение клеток костного мозга // Методы молекул. биол. биохим. иммунохим. биотех. - Алматы: Гридан, 1999. - С. 175-178.
35. Богданов А.Ю., Саввулиди 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. и Практик. - 2004. - № 3, - С. 83-89.
36. Rosenberg I.M. Protein analysis and Purification. - Boston: Birkhäuser. 1996. - 434p.

Біздің алдыңғы еңбектерімізде альфа-фетопротеинның (АФП) әсерінен *in vitro* жағдайында тышқан сүйек кемігінің гемопоэздық бағаналы жасушаларының (ГБЖ) биологиялық белсенділігінің индукциясы көбінесе 2 типті Ca^{2+} -тәуелді сигналдық жүйенің - Ca^{2+} /кальмодулин/ кальциневринді және Ca^{2+} /кальмодулин/ CaMK каскадтары мен 2 цАМФ-тәуелді сигналдық жүйе - цАМФ/Ерас 1/2 - және цАМФ/РКА каскадтарының белсенденуіне тәуелді екенін дәлелдегенбіз. Бірақ бұл жолдардың сүйек кемігінің ГБЖ-ғы АФП-нің жалпы әсер ету механизмінің көрінісі ағза жағдайында зерттелінбеген болатын. Қазіргі еңбегімізде біз *in vivo* жағдайында АФП экзогенді жолмен енгізгендегі тышқан сүйек кемігінің ГБЖ-дағы анықталған Ca^{2+} -тәуелді және цАМФ-тәуелді сигналдық жүйелердің қызмет етуін зерттеуге тырыстық. Жануарлардың ГБЖ субпопуляцияларындағы анықталған Ca^{2+} /кальмодулин/ кальциневринді, Ca^{2+} /кальмодулин/ CaMK каскадтарының, сонымен қатар цАМФ/Ерас 1/2 - және цАМФ/РКА каскадтарының экзогенді АФП әсерінен белсенділігі жоғарылайтыны анықталды. Яғни, АФП жануарлардың ГБЖ-мен әсерлескенде берілген стимулға биологиялық белсенділіктің өзгерісі түріндегі жауаптың генерациясына жауапты *in vitro* жағдайындағыдай сигналды трансдукция механизмдерінің активациясын шақырады.

It was shown in our previous work that induction of biological activities of mouse bone marrow hemopoietic stem cells under AFP exposure *in vitro* is depending on activation of 2 types of Ca^{2+} -depending pathways: Ca^{2+} /calmodulin/calcineurin - and Ca^{2+} /calmodulin/CaMK. It also depends on activation of 2 cAMP-mediated pathways: cAMP/Epac1/2- and cAMP/PKA. However, organization of such AFP-induced pathways in bone marrow HSC is still unclear. In this work we tried to investigate organization of Ca^{2+} -depending pathways and cAMP-mediated pathways in mouse bone marrow HSC *in vivo* under AFP treatment.

It was shown that intravenous administration of AFP leads to increase of calcium ion transport and cAMP synthesis in all HSC subpopulations *ex vivo* compared with control animals. The activity elevation of calcineurin in CD34⁺CD133⁻ and CD34⁺CD117⁺ HSC and activity of CaMKII in CD34⁺CD135⁺ HSC were detected in AFP treated animals comparing with control group. The analysis of components of cAMP-depending pathways in cytoplasm of all studied HSC subpopulations revealed the increase of PKA and Rap1 activities of AFP-treated mice comparing with control animals. The content of phosphorylated Epac1/2 in all studied HSC subpopulations prevailed over the content of activated Epac1/2 in same cell subpopulations of control group. Thus, we could establish the influence of exogenous AFP on activation of Ca²⁺/calmodulin/calcineurin, Ca²⁺/calmodulin/CaMK, cAMP/Epac1/2- and cAMP/PKA cascades in all studied mouse HSC subpopulations in bone marrow. So, we can conclude that administration of AFP *in vivo* activates the same signal transduction mechanisms as in *in vitro* experiments.

УДК 631. 527:633.11.

А.С. ЖАНГАЗИЕВ

СОЗДАНИЕ ТОЛЕРАНТНЫХ К БОЛЕЗНЯМ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ КАК ФАКТОР ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОЙ ТЕХНОЛОГИИ

(Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства)

В Казахском НИИ земледелия и растениеводства проводится работа по созданию высокоурожайных, устойчивых к болезням сортов озимой мягкой пшеницы. Внедрены 18 высокоурожайных (от 50 до 70 ц/га), устойчивых к болезням сортов озимой пшеницы. Выявлено, что сорта озимой пшеницы Алмалы, Арап, Наз обладают нерасовоспецифической устойчивостью к желтой, бурой ржавчине и септориозу.

На современном этапе, перед аграрной наукой ставят задачи по обеспечению сельскохозяйственного производства экологически чистой, конкурентоспособной продукцией. В рамках экологического Кодекса важно создание и внедрение в производство наилучших доступных передовых разработок и их технологии. При этом намечается переход к экологически безопасным методам природопользования, т.е. биологизация систем земледелия, отрицающая применение минеральных удобрений и пестицидов; интенсификация сельскохозяйственного производства, основанная на достижениях науки и новых технологий.

В КазНИИ земледелия и растениеводства проводятся исследования по экологизации орошаемого и богарного земледелия. Это основывается на использовании отдельных экологических средств и приемов, в первую очередь, введение и освоение биологизированных севооборотов с посевом многолетних однолетних бобовых трав и бобово-злаковых травосмесей, промежуточных и пожнивных культур на зеленое удобрение, а также создание и внедрение в производство устойчивых к болезням сортов озимой пшеницы.

В современных условиях переход на мелкие масштабы хозяйствования изменило чередование культур в севообороте. Преобладание монокультуры также повлияло на изменение видового состава возбудителей ржавчинных болезней возделываемых культур и их вирулентности. Длительное использование генетически однородных сортов, в свою очередь, усиливают давление естественного отбора в агросистеме и тем самым способствуют появлению более агрессивных биотипов патогенов /1/. Вполне реальным, является создание экологически безопасных и экономически оправдавших себя на практике устойчивых сортов.