

УДК 612.67/68

ЭФФЕКТ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ СТАРЫХ МЫШЕЙ

© 2016 В.Н. Крутько^{1,2}, В.И. Донцов^{2*}, А.В. Халявкин¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: krutkovn@mail.ru

² Институт системного анализа Федерального исследовательского
центра «Информатика и управление» Российской академии наук,
117312 Москва, Россия; электронная почта: dontsovi@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.16

После доработки 22.07.16

Альфа-фетопротеин является одним из наиболее известных и изученных эмбриоспецифических белков, который используется для диагностики патологии плода и опухолевых процессов желудочно-кишечного тракта и печени и обладает выраженным иммуностимулирующим и детоксифицирующим эффектом, а также прямым апоптозным эффектом на опухолевые клетки. Назначение АФП мышам в самом старом возрасте в наших экспериментах резко повышало выживаемость животных и выражено увеличивало относительную массу иммуностимулирующих органов, видимо, вследствие характерного для АФП эффекта общего улучшения функций тканей и детоксифицирующего действия, а также улучшало внешний вид и относительную массу внутренних органов, при этом снижало возрастную аутоагрессию (количество аутоиммунных комплексов в крови).

Впервые обнаруженный в 1956 г. как дополнительная в электрофорезе фракция, следующая за альбумином в сыворотке плода, альфа-фетопротеин (АФП) был идентифицирован иммунохимически в 1961 г. как нормальный антиген сыворотки плода. На практике АФП известен прежде всего как онкомаркер для опухолей печени и желудочно-кишечного тракта, однако, показаны также его антиопухолевые эффекты, в том числе стимуляция апоптоза опухолевых клеток [1–3], и выраженные иммуностимулирующие влияния [4–6]. Вторым важным известным эффектом АФП является предохранение аутоиммунного конфликта плода с матерью [7, 8], видимо, за счет подавления экспрессии антигенов второго класса главного комплекса гистосовместимости, что препятствует процессам презентации антигена макрофагами на самых ранних этапах формирования иммунного ответа. У взрослых АФП обнаружен в фолликулярной жидкости и в печеночной ткани. Регенерация печени сопровождается временным, а злокачественный рост — постоянным синтезом АФП в печени, в котором участвует белок р53 как репрессор.

Попытки активации функций старого организма введением эмбриональных экстрактов предпринимались еще в начале XX в., также, как и использование их для стимуляции репаративных процессов различного типа. В настоящее время использование эмбриональных тканей составляет отдельное быстро развивающееся научное и практическое направление исследований.

Мы изучали биоактивирующие эффекты АФП у старых животных, исходя из развиваемой нами иммунорегуляторной теории старения [9] и наличия геропрофилактических свойств у иммуностимулирующих препаратов, а также на основании литературных данных о возможном наличии геропротекторных свойств у АФП [10] и его установленной иммунорегуляторной активности. Известно также, что альфа-фетопротеин в дозе 1 мкг/кг уже через 30 мин после его введения повышал половую активность крыс, кроме того, АФП увеличивал мозговой кровоток и обладал выраженной антигипоксической активностью [11].

Целью данной работы являлось изучение общего биоактивирующего эффекта АФП и влияния на продолжительность жизни старых мышей.

* Адресат для корреспонденции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе эксперимента были использованы 27 старых мышей линии BALB/c в возрасте 18 мес, самки из питомника «Столбовая». Мышей содержали в стандартных условиях вивария. В качестве источника АФП использовали препарат «Альфа-протеин» производства ЗАО «Институт новых медицинских технологий». Препарат АФП вводили 12 опытным животным в течение двух недель (утром) внутрибрюшинно в 0,5 мл физиологического раствора в расчете 10 мкг на кг массы тела. Контрольным 15 животным вводили тот же объем физиологического раствора без препарата.

Оценивали выживаемость животных в течение эксперимента в контроле и в опыте, а также некоторые показатели старения: внешний вид животных по состоянию шерсти (цвет и лоск), плешивость, клочковатость и выраженности возрастного горба. Физическое состояние животных оценивали во времени, в течение которого мыши были способны удерживаться на струне; учитывали массу животных и относительную массу внутренних органов (выраженную в мг массы органа на грамм массы животного).

По окончании опыта оставшихся животных забивали и оценивали ряд параметров, важных для оценки степени старения животных. Для определения иммунного статуса учитывали относительную массу органов иммунитета — селезенки и тимуса; степень возрастной аутоагрессии — по уровню аутоиммунных комплексов после добавления к сыворотке крови полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000), выраженную в у.е. — единицах оптической плотности при спектрофотометрическом исследовании. Степень содержания внутриклеточной воды в тканях оценивали по степени потери массы (для почек) в гипертоническом растворе (40%-ной сахарозе) через 4 ч инкубации.

Были построены графики выживания животных в течение исследуемого периода, в процентах к исходному числу, а также оценивали средние значения параметров проведенных тестов и стандартные отклонения для контроля и опыта, различия сравнивали по критерию Стьюдента, характеризующего нормальное распределение данных, и критерию U Манна–Уитни, характеризующее непараметрическое распределение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте мы использовали группу мышей на поздних стадиях старения, что отражалось на уровне смертности популяции: за

два предыдущих месяца погибла половина содержащихся в виварии старых мышей.

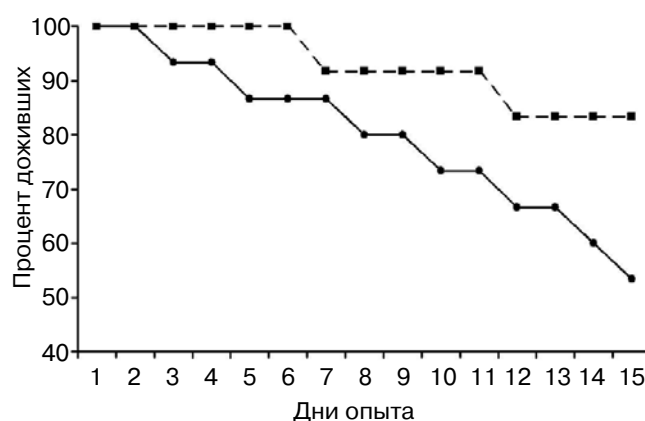
В течение эксперимента естественная гибель животных в контрольной группе составила 47%; тогда как введение АФП снижало смертность в опытной группе до 17% (рисунок), т.е. почти в три раза.

Для оставшихся в живых в конце эксперимента животных (восемь в контроле и десять в опыте) исследовали общее состояние, а затем забивали и исследовали ряд параметров, как описано в разделе методов.

Для всех животных, получавших АФП, наблюдалась четкая тенденция к улучшению внешнего вида: потеря шерсти и плешивые участки были меньше, шерсть лоснилась и утрачивала характерную для старого возраста желтизну и клочковатость. Внешний вид, оцениваемый по данным признакам, во всех случаях для животных опытной группы был неоспоримо лучше.

Физическая активность животных: время удержания на струне в секундах изменялась с $57,3 \pm 54,2$ в контроле до $77,3 \pm 48,9$ с в опыте. Эти различия были достоверны при обработке по Стьюденту ($<0,05$), но не достоверны для непараметрического параметра Манна–Уитни. Большие разбросы параметра определяются тем, что многие животные не держатся до конца на струне, а спрыгивают сразу же; поэтому большее значение имеет верхняя граница и общее распределение результатов. В данном наблюдении во всех, кроме одного случая, показатели в опыте были выше, чем в контроле.

Улучшение физиологического состояния тканей отмечалось также по повышению внутриклеточной воды, что, как известно, отражает общее состояние клеток, при старении содержание воды в клетках закономерно выражено



Эффект альфа-фетопротейна на кривые дожития старых мышей

снижается: снижение массы органа в процентах за счет миграции воды в гипертоническую среду увеличивалось с $24,34 \pm 1,35$ до $25,03 \pm 1,44$ ($p < 0,01$).

Статистически значимое увеличение ($p < 0,05$) отмечались для показателей относительной массы внутренних органов (сердца) и органов иммунитета (тимус и селезенка). Улучшение функции иммунитета регистрировалось также по снижению количества ауто-антител, оцениваемых по увеличению оптической плотности раствора в присутствии ПЭГ 6000 показатель снижался с $0,163 \pm 0,030$ до $0,136 \pm 0,033$ у.е. ($p < 0,001$).

В то же время, относительная масса печени и почек статистически значимо снижалась в опытной группе в сравнении с контролем. Это можно объяснить исходя из представлений о регулирующем и дезинтоксикационном эффектах АФП: улучшение функции тканей стареющего организма снижает нагрузку на детоксицирующие органы животных — печень и почки; этому же способствует снижение возрастной аутоагрессии к тканям, оцениваемой по количеству аутоиммунных комплексов в крови.

Наиболее интересным из наблюдаемых является эффект резкого повышения выживаемости мышей в опытной группе. Известно из литературы, что АФП повышает выживаемость при самых различных заболеваниях, а также при опухолевых процессах, химиотерапии и радиоактивном облучении, что определяется общим стимулирующим и общерегуляторным действием АФП, а также благоприятным иммунотропным эффектом [4—6, 10—12].

Известны влияния АФП как геропротектора *in vitro*: АФП обнаружил свойства активатора анаэробного катаболизма с цитопротективным эффектом и антиоксидантный механизм действия в биообразцах; также АФП снижал кардиальный биологический возраст у пациентов в зрелом возрасте, благотворно влияя на сердечно-сосудистую систему [10].

АФП влияет на специфический иммунитет [4—6], подавляя формирование антител и цитотоксических Т-лимфоцитов на Т-зависимые антигены, но не влияет на зрелые Т- и В-лимфоциты, влияя главным образом на пролиферирующие Т-хелперы. В смешанной культуре лимфоцитов АФП способен активировать Т-супрессоры, подавляя митогенез. АФК супрессирует синтез TNF- α и IL-1 β через влияние на проста-

гладины группы Е и снижает активность естественных киллеров.

Биологические свойства АФП простираются также на другие физиологические процессы: он является регулятором гомеостаза в норме и патологии, связывая стероиды и ретиноиды, жирные кислоты, фаловониды, билирубин и ряд лекарственных препаратов и токсинов; АФП влияет на обеспечение клетки энергетическим и пластическим материалом, усиливает экспрессию рецепторов клетки и влияет на синтез регуляторных простых молекул: простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов.

Обнаруженные общебиологические и иммунотропные эффекты АФП могут лежать в основе его общего биоактивирующего действия и повышения выживаемости мышей, что особенно наглядно для самых старых возрастов, когда смертность животных высока. Наиболее интересны в этом плане детоксицирующие, общерегуляторные и общие трофические свойства, противодействующие таким известным механизмам старения, как возрастные интоксикация, дистрофия и дисрегуляция. Важной особенностью является иммунотропная активность АФП: способность, с одной стороны, повышать иммунный ответ и анти-опухолевую активность, противодействуя возрастному иммунодефициту, с другой стороны, противодействовать возрастному увеличению иммунных комплексов (возрастная аутоагрессия). Особый интерес может представлять иммунотропная активность АФП в связи с развиваемой отечественными исследователями особой функции иммунотропных клеток: способности прямо активировать регенерацию соматических тканей [13, 14], что послужило основанием разработать нами иммуно-регуляторную теорию старения: возрастной иммунодефицит ответственен прямо за снижение естественной регенерации обновляющихся соматических тканей и их возрастную атрофию [9].

Таким образом, назначение АФП мышам в самом старом возрасте в наших экспериментах резко повышало выживаемость и оказывало выраженный биоактивирующий эффект, в том числе увеличивало относительную массу иммунотропных органов, видимо, вследствие характерного для АФП эффекта общего улучшения функций тканей, детоксицирующего и прямого иммунотропного действия. Это служит основанием исследовать его более подробно как кандидата на геропротекторное средство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никогосян С.О., Кадагидзе З.Г., Шелепова В.М., Кузнецов В.В. (2014) Современные методы иммунодиагностики злокачественных новообразований яичников, *Онкогинекология*, **3**, 49–54.
2. Wong, R.J., Ahmed, A., and Gish, R.G. (2015) Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis-hepatocellular carcinoma and other disorders, *Clin. Liver Dis.*, **19**, 309–323.
3. Zhang, S.Y., Lin, B. D., and Li, B.R. (2015) Evaluation of the diagnostic value of alpha-L-fucosidase, alpha-fetoprotein and thymidine kinase 1 with ROC and logistic regression for hepatocellular carcinoma, *FEBS Open Bio*, **5**, 240–244.
4. Богданов А.Ю., Саввулиди Ф.Г., Тлуелиева Р.Т., Беляев Н.Н. (2004) Альф-фетопротеин как индуктор натуральных супрессорных (NS) клеток костного мозга, *Биотехнол. теор. практ.*, **3**, 83–89.
5. Мусатов О.В., Коханов А.В. (2009) Диагностические возможности альфа-фетопротеина в оценке репаративных и иммунорегуляторных процессов при травмах печени, *Int. J. Immunorehab.*, **11**, 28a.
6. Рыбакова Т.М., Низкородова А.С., Жигайлов А.В., Беляев Н.Н., Богданов А.Ю. (2007) 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, *Биотехнол. теор. практ.*, **1**, 92–114.
7. Алексеева М.Л., Пустотина О.А., Фанченко Н.Д., Понкратова Т.С. (2005) АФП как прогностический показатель состояния новорожденного, *Проблемы репродукции*, **11**, 79–82.
8. Demers, S., Roberge, S., and Bujold, E. (2015) Low-dose aspirin for the prevention of adverse pregnancy outcomes in women with elevated alpha-fetoprotein, *J. Maternal-Fetal Neonatal Med.*, **28**, 726–726.
9. Донцов В.И., Крутько В.Н., Труханов А.И. (2010) *Медицина антистарения: фундаментальные основы*, URSS, Москва.
10. Мещанинов В.Н., Жиборкин Г.В., Яковлев Н.В., Гаврилов И.В. (2011) Метаболические механизмы геропротективной активности L-аргинина и альфа-фетопротеина. Материалы Конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий», посвященной 80-летию кафедры медицинской биологии и генетики Уральской государственной медицинской академии. Материалы I Международной научно-практической конференции 31 марта 2011 г., стр. 192.
11. Русских А.А., Юшков В.В., Ивашев М.Н. (2011) О влиянии альфа-фетопротеина на центральную нервную систему, *Вестник Урал. мед. акад. науки. Тем. вып. фармац.*, **3/1**, 46–48.
12. Зубкова Е.С., Семенова Л.Н., Дудич И.В., Дудич Е.И., Хромых Л.М., Макаревич П.И., Парфенова Е.В., Меньшиков М.Ю. (2012) Рекombинантный человеческий альфа-фетопротеин как регулятор активности стромальных клеток жировой ткани, *Биоорган. хим.*, **38**, 524–531.
13. Бабаева А.Г. (1995) Прошлое, настоящее и будущее проблемы лимфоидной регуляции нелимфоидных клеток, *Бюлл. exper. биол. мед.*, **120**, 230–234.
14. Бабаева А.Г., Зуев В.А. (2007) Перенос признаков старения молодым мышам лимфоцитами от старых доноров, *Бюлл. exper. биол. мед.*, **144**, 100–102.

EFFECT OF ALPHA-FETOPROTEIN
ON LIFESPAN OF OLD MICEV. N. Krut'ko^{1,2}, V. I. Dontsov^{1*}, and A. V. Khalyavkin¹¹ Sechenov First Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: krutkovn@mail.ru² Institute for Systems Analysis, Federal Research Center
«Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences,
117312 Moscow, Russia; E-mail: dontsovvi@mail.ru

Received May 22, 2016

Revision received July 22, 2016

Alpha-fetoprotein (AFP) is one of the best-known embryospecific proteins. It is used to diagnose fetal abnormalities and tumors of the gastrointestinal tract and liver, has a pronounced immunotropic and detoxifying effect, and a direct apoptotic effect on tumor cells. The administration of AFP to old mice in our experiments dramatically increased the survival of the animals and markedly increased the relative weight immunotropic organs, apparently due a general effect of AFP improving the functions of tissues and detoxifying actions, as well as improved appearance and relative weight of internal organs, with reduced age of autoaggression.

Key words: age, alpha-fetoprotein, life extension