



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93321 (13) C2  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/533  
A61K 35/48  
A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ОЦІНКИ БЕЗПЕКИ ЗАСТОСУВАННЯ ФЕТАЛЬНИХ КЛІТИН

1

(21) a201000681

(22) 25.01.2010

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл. № 2, 2011 р.

(72) ГОЛЬЦЕВ АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ГРИ-  
ЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, ЛУЦЕНКО ОЛЕ-  
НА ДМИТРІВНА, ЯМПОЛЬСЬКА КАТЕРИНА ЄВ-  
ГЕНІВНА, БОНДАРОВИЧ МИКОЛА  
ОЛЕКСАНДРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-  
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК  
УКРАЇНИ

(56) Hook LM, Agafonova Y, Ross SR, Turner SJ,  
Golovkina TV. Genetics of mouse mammary tumor  
virus-induced mammary tumors: linkage of tumor  
induction to the gag gene. J Virol. 2000  
Oct;74(19):8876-83.

Jeng-Chang Chen,ab Ming-Ling Chang,cd Hanmin  
Lee,a and Marcus O. Muench .Prevention of Graft  
Rejection by Donor Type II CD8+ T Cells (Tc2 Cells)

2

Is Not Sufficient to Improve Engraftment in Fetal  
Transplantation. Fetal Diagn Ther. 2005; 20(1): 35-43  
UA 47750 A 15.07.2002

Hebert CD, Endo S, Korach KS, Boyd J, Barrett JC,  
McLachlan JA, Newbold RR. Characterization of  
murine cell lines from diethylstilbestrol-induced  
uterine endometrial adenocarcinomas. In Vitro Cell  
Dev Biol. 1992 May;28A(5):327-36

(57) Спосіб оцінки безпеки застосування феталь-  
них клітин, що включає введення мишам дослі-  
джуваних клітин і визначення їх туморогенності,  
який **відрізняється** тим, що фетальні клітини вво-  
дять мишам інтактною ліній СВА, після чого визна-  
чають експресію протоонкогенів у клітинах лімфо-  
гемопоетичного комплексу і порівнюють з  
експресією протоонкогенів у мишей з генетично  
запрограмованим розвитком онкопатології - мишей  
лінії СЗН/He Lac, і при відсутності експресії прото-  
онкогенів, що спостерігається у мишей лінії  
СЗН/He Lac, визначають безпеку застосування  
фетальних клітин.

Винахід належить до експериментальної ме-  
дицини і може бути використаний в розробці стан-  
дартів і протоколів дослідження клітин на предмет  
онкогенетичної безпеки застосування.

Упровадження клітинних технологій у клінічну  
практику обумовлює необхідність рішення ряду  
питань, зв'язаних з безпекою застосування проду-  
ктів фетоплацентарного комплексу, зокрема фе-  
тальних клітин (ФК), у лікувальних цілях. У першу  
чергу це стосується ризику розвитку новоутворень,  
обумовленого високим змістом клітин стовбурово-  
го компартменту серед фетальних клітин, їх про-  
ліферативним потенціалом, наявністю біологічно  
активних субстанцій з регуляторною активністю,  
спільністю фенотипічних і функціональних марке-  
рів цих клітин з пухлинними структурами [1].

Відомий спосіб оцінки безпеки застосування  
культивованих мультипотентних мезенхімальних  
стромальних клітин, виділених з кісткового мозку  
або фетальної крові людини, трансформованих  
лентивирусним вектором, що несе флюоресцент-  
ний маркер (GFP). Після підсадження цих клітин

мишам на зрізах різних органів визначають частку  
клітин, що світяться, і оцінюють наявність місця  
проліферації [2].

Недоліком цього способу є можлива контамі-  
нація вірусом клітин, що вводяться, після маркіру-  
вання, що може приводити до трансформації вве-  
деного матеріалу, а також необ'єктивність, тому  
що спосіб дозволяє визначати проліферацію тіль-  
ки введених клітин, а не клітин реципієнта.

Відомий спосіб визначення безпеки введення  
мультипотентних мезенхімальних стромальних  
клітин мишам, що заснований на ідентифікації  
атипових ядер, пухлинного некрозу, малодифере-  
нційованої зони на гістологічних зрізах органів і  
візуальної ідентифікації пухлеподібних вузлів [2].

Недоліком цього способу є його неточність,  
обумовлена тим, що один із критеріїв - гістологічна  
оцінка - не корелює з клінічними проявами патоло-  
гії - загибеллю тварин.

Існує спосіб оцінки безпеки використання клі-  
тин фетальної печінки в складі імплантатів, при  
якому клітини фетальної печінки на штучній підк-

(13) C2

(11) 93321

(19) UA

ладці імплантують мишам лінії AKR/JY. На основі оцінки кровотворної системи (периферичної крові, кісткового мозку, тимуса, селезінки) визначають кількість тварин з розвиненими лімфомами [3].

Недоліком цього способу є його необ'єктивність, тому що в 33 % випадків спостерігається загибель тварин у результаті імунного конфлікту (реакції «трансплантат проти хазяїна»), або від невідомих причин (у 22 % випадків).

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб оцінки безпеки застосування хондробластів у мишей лінії SCID. Спосіб полягає в наступному. Експериментальним мишам цієї лінії вводять суспензію культивованих аутологічних хондробластів (107 клітин). Тваринам з групи позитивного контролю вводять суспензію пухлинної лінії ембріональної саркоми людини, що викликає 100 % розвиток пухлин. Далі протягом 12 тижнів визначають туморогенність уведених клітин по наявності пухлин, їх кількості, розмірам, наявності регіонарних і віддалених метастазів після введення клітин [4].

Основним недоліком способу є його необ'єктивність, що обумовлена тим, що клітини вводять мишам з порушеним станом імунної системи, а саме комбінованим імунodefіцитом у вигляді генетичного дефекту окремих елементів генів імунoglobulinів і Т-клітинного рецептора, що приводить до порушення диференціювання попередників Т- і В-клітин. Хоча ці тварини мають лимфовузли і тимус, але ці органи зменшені в розмірах. Тому об'єктивна оцінка імовірності онкологічних змін в цих органах після введення клітин неможлива.

В основу винаходу поставлена задача створення такого способу оцінки безпеки застосування ФК, який би завдяки використанню молекулярно-генетичного критерію, забезпечив об'єктивну оцінку безпеки застосування фетальних клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки безпеки застосування фетальних клітин, який включає введення мишам досліджуваних клітин і визначення їх туморогенності, відповідно до винаходу, фетальні клітини вводять мишам інтактної лінії СВА, після чого визначають експресію протоонкогенів у клітинах лімфомієлоїдного комплексу і порівнюють з експресією протоонкогенів у мишей з генетично запрограмованим розвитком онкопатології - мишей лінії С3Н/Не Лас, і при відсутності експресії протоонкогенів, що спостерігається у С3Н/Не Лас мишей, визначають безпеку застосування фетальних клітин.

Визначення експресії протоонкогенів забезпечує об'єктивність оцінки безпеки введення фетальних клітин, оскільки використаний критерій відбиває на молекулярно-генетичному рівні стан імункомпетентних клітин і дозволяє виявити механізм дії фетальних клітин, що вводяться, на елементи лімфомієлоїдної системи. Здійснення способу можливе при використанні інтактних мишей СВА, що мають імунологічно нескомпроментовані органи лімфогемопоетичної системи, у той час як на мишах лінії SCID, через генетичний дефект стану імунної системи, об'єктивно оцінити імовірність онкологічних змін у цих органах неможливо.

Спосіб здійснюють таким чином.

Мишам лінії СВА вводять фетальні клітини. Групу позитивного контролю складають миші лінії С3Н/Не Лас, групу негативного контролю складають миші СВА. В усіх трьох групах тварин беруть одного віку - 12-13 місяців. Через 30 днів у тварин експериментальної групи й у мишей контрольних груп одержують кістковий мозок, селезінку, тимус, лимфовузли.

З клітин цих органів виділяють нуклеїнові кислоти. Використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію і праймери до протоонкогенів src, abl, lck і jak-1 ідентифікують їхню експресію за допомогою спеціальної апаратури (чип-аналізатор Agilent 2100), оснащеною системою детекції й оцінки кількісного змісту продуктів полімеразної ланцюгової реакції. Порівнюють туморогенність - топографію (нове місце) та підвищення експресії протоонкогенів у досліджених органах експериментальної групи і групи позитивного контролю. При відсутності експресії протоонкогенів у мишей СВА, що спостерігається у С3Н/Не Лас мишей, визначають безпеку застосування фетальних клітин.

Протоонкогени src, abl, lck і jak-1 мають безпосереднє відношення до керування станом проліферації, диференціювання та інших характеристик імункомпетентних клітин [5, 6]. Вони кодуєть синтез кіназ, продукція яких у фізіологічних умовах активується факторами росту, цитокінами, гормонами і т.д. У той же час, ці кінази можуть бути причетні до пухлинної трансформації лімфоїдних і нелімфоїдних клітин при різних ситуаціях [7, 8, 9]. Хоча jak1-ген не відноситься до класичних протоонкогенів, однак і він часто залучає в пухлинну трансформацію В- і Т-лімфоцити через активуємі ним STAT3 і ERK-сигнали [10]. Тобто цілком закономірно, що така маніфестація відбувається в період початку клінічного розвитку генетично детермінованої патології у вигляді раку молочної залози у тварин лінії С3Н/Не Лас [11].

Приклад

Для оцінки безпеки введення ФК мишам лінії СВА вводили внутрішньовенно  $5 \times 10^6$  клітин фетальної печінки (КФП). Через 30 днів після введення КФП тварин забивали дислокацією шийних хребців. Клітини кісткового мозку вимивали зі стегнової кістки забуференим фізіологічним розчином. Суспензію клітин одержували шляхом багаторазового пропущення через голки зменшеного діаметра. Клітини тимуса, селезінки, лимфовузлів, що містять ядра, одержували шляхом гомогенізації в гомогенізаторі Потера в 2 мл забуференого фізіологічного розчину, фільтрували через нейлоновий фільтр. Кількість клітин у суспензіях враховували в камері Горяєва в світловому мікроскопі «ЛОМО» при збільшенні в  $15 \times 40$  разів. Для виділення нуклеїнових кислот в експериментах використовували  $1 \times 10^6$  клітин з кожної суспензії.

Для виділення нуклеїнових кислот використовували метод фенольної екстракції [13]. Реакцію зворотної транскрипції ставили з використанням специфічних олігонуклеотидів і ревертази (M-Miv)(ЦНІЕ МЗ РФ).

Праймери для полімеразної ланцюгової реакції були підібрані на основі бази даних, опубліко-

ваних на сайті «GenBank» (NCBI, USA) : abl -AK 037887.1 src - AK 146056.1 lck - AK 088001.1, jak1 - AK 134143.1, синтезованими в АТЗТ «Медбіосервіс» м. Києва. Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили в термостаті «Терцик» ЗАТ «НВФ ДНК-технологія» (Росія). Кількісну детекцію продуктів ампліфікації проводили методом капілярного електрофорезу в чип-аналізаторі «Agilent 2100» (США).

Представлені в таблиці дані свідчать про те, що транскрипти кожного з обраних протоонкогенів конститутивно експресувались у різному ступені в якомусь або якихось з досліджуваних органів інтактних мишей СВА. Наприклад, транскрипти гена jak1 були виявлені у всіх досліджених органах лімфогемopoетичного комплексу. Мінімальна експресія була виявлена в кістковому мозку і тимусі, максимальна - у селезінці і лімфовузлах. Даний факт підтверджує важливість і значення кодуємої геном jak1 тирозинової кінази Januse kinase у реалізації каскадних сигнальних шляхів у тканинах лімфогемopoетичного комплексу ссавців у фізіологічних умовах. Тільки в селезінці і тимусі цих же

мишей визначалася експресія транскриптів протоонкогена abl. У меншому ступені експресувались протоонкогени src і lck у кістковому мозку і лімфовузлах.

З представлених у таблиці даних також видно, що в мишей СЗН/Не Лас картина експресії протоонкогенів зовсім інша.

Так, src і lck-гени, транскрипти яких не визначалися в селезінці і тимусі мишей СВА, експресувались у цих органах у мишей СЗН/Не Лас.


Експресія гена jak у мишей СЗН/Не Лас топографічно повторювала таку в кістковому мозку і тимусі інтактних тварин. Однак, якщо в тимусі ступінь її була ідентичною, то в кістковому мозку мишей СЗН/Не Лас перевищувала майже в 25 разів. Нова топографія експресії в мишей СЗН/Не Лас була встановлена і для протоонкогена abl. Транскрипти цього гена експресувались у лімфовузлах мишей СЗН/Не Лас, де вони не визначалися в мишей СВА. Крім того, у клітинах тимуса було встановлене підвищення експресії цього гена в порівнянні з інтактними мишами в 5,8 рази.

Таблиця

Експресія протоонкогенів у клітинах лімфогемopoетичного комплексу мишей СЗН/Не Лас і СВА після введення КФП

Група Тварин	Орган	Кількість фрагментів src (нг)	Кількість фрагментів lck (нг)	Кількість фрагментів jak1 (нг)	Кількість фрагментів abl (нг)
СВА	Селезінка			29,0±13,12	5,0±2,21
	Лімфовузли		3,05±1,16	30,0±13,18	
	Кістковий мозок	20,37±10,22		13,33±5,72	
	Тимус			1,95±0,56	10,2±5,43
СЗН/Не Лас	Селезінка	1,54±0,83			
	Лімфовузли				110,18±43,21
	Кістковий мозок			340,55±110,40*	
	Тимус		1,8±0,94	1,31±0,28	58,4±22,04*
СВА+КФП	Селезінка			13,32±5,41	39,1±16,11
	Лімфовузли	22,90±9,91		5,95±1,91	
	Кістковий мозок			20,0±8,44 <sup>#</sup>	88,0±31,55
	Тимус			0,99±0,41	

Примітка -

 - наявність експресії протоонкогена в клітинах різних органів, \* - відмінності достовірні при порівнянні показника у мишей СЗН/Не Лас і СВА, <sup>#</sup> - відмінності достовірні при порівнянні показника у мишей СЗН/Не Лас і СВА+КФП, p < 0,05

Для всіх обраних протоонкогенів характерне нове місце експресії (топографія) у лімфогемopoетичному комплексі мишей СЗН/Не Лас у порівнянні з інтактними здоровими мишами СВА. Іншими словами, нову топографію експресії можна сприймати як факт overекспресії цих генів (включаючи і jak у кістковому мозку) у мишей СЗН/Не Лас. Таким чином, нові топографічні точки або overекспресія протоонкогенів у порівнянні з мишами СВА служать маркерами туморогенності.

Тому, як позитивний контроль розвитку онкопатології були узяті миші лінії СЗН/Не Лас 13-місячного віку з генетично запрограмованим розвитком раку молочної залози. У якості ідентифікуючих маркерів туморогенності були узяті транскрипти протоонкогенів c-src, lck, jak-1 і abl у клітинах кісткового мозку, селезінки, тимуса, лімфовузлів.

Характер зміни експресії зазначених протоонкогенів у мишей СВА після введення КФП свідчить про те, що після введення КФП експресія src, lck,

abl протоонкогенів не збігалася топографічно в жодному з органів лімфомієлоїдного комплексу з такою у мишей C3H/He Lac. Хоча топографічна картина експресії генів jak1 після застосування КФП у кістковому мозку була аналогічною позитивному контролю, однак рівень експресії істотно відрізнявся від рівня в мишей C3H/He Lac.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що запропонований спосіб оцінки безпеки застосування фетальних клітин відбиває стан генетичного апарату клітин лімфогемопоетичного комплексу організму і може служити важливим об'єктивним критерієм атестації бластогенного потенціалу уведених фетальних клітин.

Джерела інформації:

1. Tassone P., Tuccillo F., Bonelli P., D'Armiento F.P., Bond H. M., Palmieri C., Tagliaferri P., Venuta S. Fetal ontogeny and tumor expression of the early thymic antigen UN1 // *Int. J. Oncol.* -2002. - Vol. 20, № 4. - P. 707-711.

2. Aguilar S., Nye E., Chan J. Loebinger M. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung// *Stem cells.* - 2007. - V.25. - P. 1586-1594.

3. Итин В.И., Прибытков Г.А., Хлустов И.А. Имплант - носитель клеточного материала из пористого проницаемого титана. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* - 2006. - № 3. - С. 59-63.

4. Ржанинова А.А., Ермакова Н.П., Меркулова И.Б. Исследование безопасности трансплантации культивированных аутологических хондробластов человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* - 2009. - № 3. – С. 143-148.

5. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ. М.: БИНОМ-Пресс, 2003. - с. 234-236.

6. Shi M., Cooper J.C., Yu C. L.A constitutively active Lck kinase promotes cell proliferation and resistance to apoptosis through signal transducer and activator of transcription 5b activation // *Mol. Cancer Res.* - 2006. - № 1. - P. 39-45.

7. Majolini M B; D'Elios M M; Galieni P; Boncristiano M Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells. // *Blood* 1998. - Vol. 91, № 9. - P. 3390-3396.

8. Jallal H., Valentino M.-L., Chen G.A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo // *Cancer Research.* - 2007. - Vol. 67. - P. 1580-1588.

9. Srinivasan D., Planner R. Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells // *Cancer Research.* - 2006. - Vol. 66. - P. 5648-5655.

10. Neilson L.M, Zhu J., Xie J. Coactivation of Janus Tyrosine Kinase (Jak)1 Positively Modulates Prolactin-Jak2 Signaling in Breast Cancer: Recruitment of ERK and Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)3 and Enhancement of Akt and Stat5a/b Pathways // *Molecular Endocrinology.* - 2007 - Vol. 21. - № 9. - P. 2218-2232.

11. Callahan R., Smith G. H. MMTV-induced mammary tumorigenesis gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. - *Oncogene.* - 2000. - V. 19, N 8. - P. 992-1001.

12. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. /под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. - М.: Мир, 1999. - С. 307-309.