

УДК 577.218:612.35.014.2

## ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *SRC*, *LCK*, *ABL*, *JAK1* В КЛІТИНАХ ЛІМФОГЕМОПОЕТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ

© А. М. Гольцев, О. Д. Луценко, К. Є. Ямпольська, М. В. Останков, М. О. Бондарович

*Застосування фетальних клітин в клінічній практиці визначає необхідність рішення питань, пов'язаних з їх безпекою. Досліджено рівень експресії генів *src*, *abl*, *lck*, *jak1* в клітинах лімфогемopoетичного комплексу мишей лінії СВА/Н та СЗН/Не до і після введення клітин фетальної печінки. Після застосування фетальних клітин суттєвих змін експресії генів у клітинах мишей обох ліній виявлено не було*

**Ключові слова:** лімфогемopoетичний комплекс, експресія протоонкогенів, клітини фетальної печінки, клітинна терапія

*The application of fetal cells in clinical practice determines the necessity of solving the tasks related to their safety. There was investigated the expression rate of genes *src*, *abl*, *lck*, *jak1* in cells of lymphohemopoietic complex of СВА/Н and СЗН/Не mice before and after application of fetal liver cells. After application of fetal cells no significant changes in gene expression in cells of both mice lines were revealed*

**Keywords:** lymphohemopoietic complex, proto-oncogene expression, fetal liver cell, cell therapy

### 1. Вступ

У загальному спектрі препаратів клітинної і тканинної терапії важливе місце займає фетальний матеріал, застосування якого визначається присутністю широкого спектру біологічно активних субстанцій, які мають значний функціонально-регуляторний потенціал [1, 2]. Застосування фетального матеріалу поширюється від лікування важких порушень стану різних систем організму до антиейджингової терапії [3]. Використання фетального матеріалу може бути зовсім не пов'язане з проблемами старіння, а стосується індивідуального прагнення «перевершити самого себе». Тобто це може стосуватися взаємодії введеного матеріалу з організмом як в умовах розбалансування різних його систем, так і в фізіологічному стані. Однак клінічне використання фетального матеріалу в більшості випадків випереджає темп проведення робіт з вивчення механізмів дії такої терапії і, тим більше, її безпеки.

### 2. Літературний огляд

Неодноразово відзначалося, що препаратам фетального походження властива висока імунomodуюча активність [1, 2]. Отже, очевидна їх тропність до субстратів імунної системи (ІС) організму і можливість зміни їхнього стану на різних рівнях. Наприклад, модифікації погодженості сигнальних каскадів регуляції функції клітин, розвитку хромосомної нестабільності, зміни стану їх генетичного апарату та безконтрольної проліферації і т. п. Не виключена ймовірність розвитку небажаних наслідків, включаючи індукцію бластомного процесу, початкові етапи якого можуть маніфестуватися, наприклад, оверекспресією різних протоонкогенів [4, 5].

Відомо, що однією з причин гіперекспресії протоонкогена є його переміщення під сильний промотор іншого гена, що спостерігається коли в хромосому клітини вбудовується слабоонкогенний ретровірус з сильним промотором. До такого типу ретровірусів відноситься вірус пухлини молочної залози

(ММТВ) у мишей лінії СЗН/Не з переддетермінованим розвитком цієї патології [6]. Експансія цього вірусу в організмі мишей лінії СЗН/Не призводить до того ж до порушення стану імунної системи (ІС) з маніфестацією визначених його ознак [7, 8]. У світлі сказаного вище, виникає питання, чи є ймовірність виникнення гіперекспресії протоонкогенів після застосування фетального матеріалу.

### 3. Мета та задачі дослідження

Метою роботи було порівняти характер експресії генів *src*, *lck*, *abl*, а також взаємодіючого з ними у процесах непластичної трансформації гену *jak1* в клітинах лімфогемopoетичного комплексу (ЛГПК) мишей лінії СВА/Н до та після застосування клітин фетальної печінки (КФП) та СЗН/Не.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

1. Визначити кількість транскриптів генів *src*, *lck*, *abl*, *jak1* в клітинах селезінки, лімфовузлів, кісткового мозку і тимусу мишей лінії СВА/Н та СЗН/Не.

2. Дослідити характер експресії протоонкогенів в клітинах лімфогемopoетичного комплексу після введення нативних і кріоконсервованих клітин фетальної печінки експериментальним тваринам.

### 4. Матеріали і методи

#### Об'єкт дослідження

Експерименти виконані на 12–13 місячних мишах ліній СВА/Н, С57В1/6J та СЗН/Не. В цей період маніфестується розвиток раку молочної залози (РМЗ) у мишей СЗН/Не [9]. Кількість мишей в кожній з груп дорівнювала трьом. Експерименти з тваринами були виконані відповідно до Міжнародних принципів Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

#### Отримання і кріоконсервування КФП

Тварин декапітували під ефірним наркозом. Фетальну печінку (ФП), виділену з ембріонів мишей

лінії C57Bl/6J на 14-й поскоїтальний день, дезінтегрували у гомогенізаторі Потера у середовищі 199 (Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів, Росія) з додаванням 10 % -ї ембріональної телячої сироватки («Біолот», Росія) і 2 % -го цитрату натрію (далі в тексті – робоче середовище) з подальшим пропущенням через голки зменшуючогося діаметра (0,9–0,4 мм) і капроновий фільтр для видалення конгломератів.

Розчин для кріоконсервування КФП являв собою робоче середовище з 20 % диметилсульфоксидом (ДМСО) («Arterium», Україна). До отриманої на робочому середовищі суспензії КФП по краплях додавали розчин для кріоконсервування у співвідношенні 1:1 при температурі 18 °С протягом 2 хв (кінцева концентрація ДМСО складала 10 %). КФП з концентрацією  $1 \times 10^6$ /мл і об'ємом 1,8 мл заморожували на програмному заморожувачі УОП-6 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) у пластикових пробірках («Nunc», Німеччина), розморожували на водяній бані при 40 °С, як описано раніше [7]. Кількість ядровмісних клітин у суспензіях підраховували в камері Горяєва на мікроскопі МБР-3 («ЛОМО», Росія).

Експериментальним тваринам – мишам лінії СВА/Н одноразово внутрішньовенно вводили алогенні нативні або кріоконсервовані КФП (нКФП і кКФП відповідно) мишей лінії C57Bl/6J у дозі  $5 \times 10^6$ /мишу в об'ємі 0,2 мл. У якості контролю процедури введення матеріалу використовували клітини дорослої печінки (КДП) мишей тієї ж лінії і у тій же дозі. У якості позитивного контролю розвитку онкопатології використовували мишей лінії СЗН/Не, негативного контролю – інтактних мишей лінії СВА/Н. Контрольним тваринам обох ліній вводили забуферений фізіологічний розчин (ЗФР) в об'ємі 0,2 мл.

#### *Виділення клітин з органів ЛГПК тварин*

Через 30 діб після введення КФП тварин вводили з експерименту дислокацією шийних хребців під легким ефірним наркозом. Клітини кісткового мозку (КМ) отримували зі стегових кісток шляхом вимивання шприцом з 2 мл робочого середовища. Для отримання клітин з лімфоїдних органів, попередньо очищені і фрагментовані ножицями лімфатичні вузли, тимус, селезінку гомогенізували у гомогенізаторі Потера у 2 мл ЗФР. Отримані суспензії клітин пропускали через голки зменшуючогося діаметра (0,9–0,4 мм) і капроновий фільтр. Кількість ядровмісних клітин у суспензіях підраховували в камері Горяєва на мікроскопі МБР-3 («ЛОМО», Росія).

#### *Виділення нуклеїнових кислот*

Виділення нуклеїнових кислот здійснювали з  $1 \times 10^6$  клітин органів ЛГПК за допомогою наборів фірми Diatom RNA Prep 100 (Isogene Lab, Ltd, Росія), відповідно до протоколу фірми виробника.

#### *Зворотня транскрипція (ЗТ)*

Реакцію ЗТ ставили з використанням специфічних олігонуклеотидів і ревертази (М-Мlv) (ЦНДІЕ МОЗ РФ) відповідно до інструкції виробника. Реакцію проводили при температурі 37 °С протягом 30 хв із наступною інактивацією зворотної транскриптази при 95 °С протягом 5 хв.

#### *Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)*

Праймери для протоонкогенів були сконструйовані на основі бази даних, яка розміщена на сайті «GenBank» Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI BLAST, USA): *abl* – АК 037887.1, *src* – АК 146056.1, *lck* – АК 088001.1, *jak1* – АК 134143.1, і синтезовані в АТЗТ «Медбіосервіс» (м. Київ, Україна). Ампліфікацію фрагментів ДНК виконували в термостаті «Терцик» ЗАТ «НВФ ДНК-технологія» (Росія). Денатурацію проводили при 94 °С протягом 30 с, гібридизацію матриці з праймерами при 60 °С – 30 с, елонгацію – при 72 °С – 60 с. Кількість циклів – 40.

#### *Порівняння кількості транскриптів*

Порівняння кількості транскриптів досліджуваних мішеней проводили на основі відносної напівкількісної оцінки продуктів ампліфікації з використанням методичних підходів, описаних раніше [10] і нашою модифікацією. З вихідного розчину нуклеїнових кислот із кожного дослідженого зразка ми готували послідовні десятикратні розведення. До кожного розведення додавали реакційну суміш і проводили реакцію ЗТ та ампліфікацію. При цьому, чим менше у вихідному препараті було послідовностей-мішеней, тим раніш (тобто при менших розведеннях) припинялася ампліфікація. Транскрипти визначали у нерозведеному зразку нуклеїнових кислот, розведеному у співвідношенні 1:10, 1:100.

Рівень експресії виражали як титр розведення вихідного розчину нуклеїнових кислот, переведений в логарифм (lg).

Теоретично після етапу ЗТ кількість отриманої кДНК повинна дорівнювати кількості початкової мРНК. Таке положення висловлюють також інші автори [11]. В попередніх експериментах ми вибрали умови проведення ПЛР з різною кількістю клітин, щоб запобігти гальмуванню реакції, а також отримати лінійну залежність кількості ампліконів від концентрації матриці.

#### *Детекція продуктів ПЛР*

Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом капілярного електрофорезу в чіп-аналізаторі («Agilent 2100», США). Підготовка чіпів здійснювалася відповідно до інструкції набору ДНК500 або ДНК1000 («Fermentas», Литва). Фрагменти нуклеїнових кислот автоматично реєструвалися в сформованих мікроканалах чіпа і представлялися у вигляді смужок гелю або електрофореграм. Маркер молекулярної маси, внесений в окрему лунку, був контролем для визначення розміру фрагментів ПЛР. За наявності специфічного фрагмента ампліфікації розміром 200–350 пар нуклеотидів (розмір ампліфікованого фрагмента визначався сумою розміру праймерів і відстані між їх 3'-кінцями) судили про присутність продукту в аналізованому матеріалі.

#### *Статистична обробка результатів*

Для статистичної обробки даних використовували непараметричні методи. Рівень експресії виражали як медіана (*Me*) зворотнього значення логарифму розведення розчину мРНК. Довірчий інтервал не перевищував одного логарифму. Різницю в експресії між дослідними групами оцінювали за критерієм

Мана-Уїтні (*U*). Достовірними вважали результати при  $p < 0,05$ .

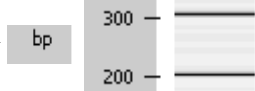
**5. Результати дослідження та їх обговорення**

Транскрипти кожного з обраних генів конститутивно експресувалися в різній мірі в органах інтактних мишей СВА/Н (таблиця). Так, транскрипти гена *jak1*

були експресовані у всіх досліджених органах ЛГПК. Мінімальна експресія була відзначена в КМ і тимусі, максимальна – у селезінці і лімфовузлах, що свідчить про активований стан цього гена і підтверджує важливість тирозинової Januse кінрази, яка кодується *jak1* геном, в реалізації каскадних сигнальних шляхів у тканинах ЛГПК мишей у фізіологічних умовах [12].

Таблиця

Зображення ампліконів генів *src*, *lck*, *jak1*, *abl* на смужках гелю в капілярному електрофорезі після проведення ЗТ-ПЛР

Група тварин	Орган	Наявність експресії генів при послідовному розведенні кДНК											
		Маркер довжини фрагменту 											
		<i>src</i>			<i>lck</i>			<i>jak1</i>			<i>abl</i>		
		Розведення НК			Розведення НК			Розведення НК			Розведення НК		
	Початковий	1:10	1:100	Початковий	1:10	1:100	Початковий	1:10	1:100	Початковий	1:10	1:100	
СВА	Селезінка	0	0	–	0	0	–						
	Лімфовузли	0	0	–		0	–				0	0	–
	ККМ			0	0	0	–		0	0	0	0	–
	Тимус	0	0	–	0	0	–		0	0			
СЗН/He	Селезінка		0	–	0	0	–	0	–	–	0	–	–
	Лімфовузли	0	0	–	0	0	–	0	–	–			0
	ККМ	0	0	–	0	0	–				0	–	–
	Тимус	0	0	–		0	–		0	0			0
СВА+нКФП	Селезінка	0	0	–	0	0	–		0	0			0
	Лімфовузли			0	0	0	–			0	0	0	–
	ККМ	0	0	–	0	0	–			0	0	0	–
	Тимус	0	0	–	0	0	–	0	0	–			0
СВА+кКФП	Селезінка	0	–	–	0	–	–		0	–			0
	Лімфовузли			–	0	–	–			0	0	–	–
	ККМ	0	–	–	0	–	–		0	–		0	–
	Тимус	0	–	–	0	–	–	0	–	–			–
СВА+клітини дорослої печінки	Селезінка	0	–	–			–	0	–	–		0	–
	Лімфовузли	0	0	–	0	0	–		0	–	–	–	–
	ККМ	0	–	–			–		0	–	–	–	–
	Тимус	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0	–

Примітки: ККМ – клітини кісткового мозку; «0» – експресія відсутня; «–» – експресію не визначали

Тільки в селезінці і тимусі цих мишей визначався максимальний рівень експресії транскриптів протоонкогена *abl*. Менш експресувалися протоонкогени *src* і *lck* у кістковому мозку і лімфовузлах (рис. 1)

Отримані нами результати свідчать, що у мишей лінії СЗН/Не має місце як інша топографія, так і різного рівня збільшення експресії *src*, *abl*, *lck*, *jak1* генів практично у всіх досліджених органах ЛГПК (рис. 1).

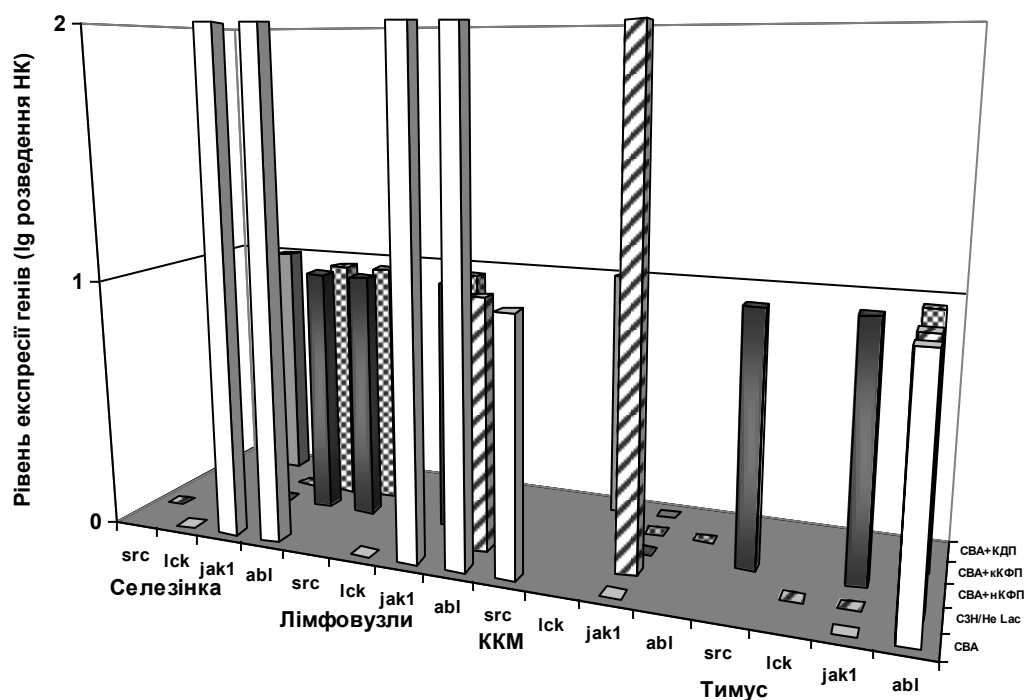


Рис. 1. Рівень експресії генів *src*, *lck*, *jak1*, *abl* в клітинах лімфогемопоетичного комплексу мишей лінії СВА до і після введення КФП, КДП та у мишей лінії СЗН/Не.

Наприклад, транскрипти *src*-гена, на відміну від контрольних мишей, визначалися в селезінці мишей СЗН/Не, що підтверджується даними [13] відносно підвищення експресії Src-кінази при РМЗ не тільки в епітеліальних клітинах, але й поза нею. Відомо, що експресія багатьох Src-кіназ у фізіологічних умовах відзначена, насамперед, в гемопоетичних клітинах [12, 13]. Цей факт підтверджується й отриманими нами даними про досить високий рівень експресії *src*-гена в кістковому мозку контрольних мишей СВА/Н. Але у мишей СЗН/Не експресія цього гена була визначена у селезінці. З цього виходить, що саме цей орган може бути об'єктом розповсюдження вірусу ММТВ, у якому він може індукувати збільшення експресії *src* у різних клітинах, що погоджується з вищезгаданими даними про розвиток спленомегалії у цих мишей [15].

Інша топографія експресії *lck*-гена була відзначена нами в тимусі мишей СЗН/Не, у той час як у здорових тварин цей ген експресувався тільки в лімфовузлах (Рисунок). Експресія Lck тирозин кінази в лімфовузлах, що на 70–80 % представлені зрілими Т-лімфоцитами, цілком закономірна, враховуючи роль цього ферменту в передачі внутрішньоклітинних сигналів саме Т-лімфоцитів [16]. У такому випадку визначена активність *lck*-протоонкогена в тимусі мишей СЗН/Не, більшість клітин якого представлена незрілими Т-клітинами, може свідчити про підвищення його експресії.

Нами встановлена інша топографія і збільшення рівня експресії транскриптів протоонкогена *abl* у

лімфовузлах мишей СЗН/Не. Це може бути обумовлено як високою експансією ММТВ у регіональних до молочної залози лімфоїдних структурах і активацією вірусом цих генів в ІКК, так і розвитком пухлинного процесу в організмі тварин, та імунологічною відповіддю на розвиток пухлин.

Суттєве зростання у мишей СЗН/Не експресії *jak1*-гена відмічено у клітинах КМ. За даними [17] кількісний склад КМ мишей лінії СЗН/Не не відрізняється від здорових тварин, хоча їх якісний склад був другим. Наводяться дані про збільшення у КМ мишей СЗН/Не клітин із фенотипом CD44<sup>+</sup>, за рахунок яких можуть «зароджуватися» злоякісні процеси [18]. Відзначене підвищення колонієутворюючої активності клітин КМ мишей СЗН/Не на певних етапах їхнього життя, що може бути обумовлено не тільки гіперпродукцією колонієстимулюючих факторів пухлинними клітинами молочної залози [17], але й тими що формуються *in situ*. Така стимуляція приводить до підвищення проліферативного потенціалу кровотворних клітин-попередників, процесу, в якому важливу роль відводять Jak1-кіназі [18]. Таким чином, факт збільшення кількості транскриптів *jak1* гена в клітинах КМ мишей СЗН/Не є цілком логічним.

Обговорюючи можливу зміну експресії генів в організмі після застосування КФП, можна відзначити роботу [19], в якій показана здатність екстрактів з КФП стимулювати диференціювання еритроїдних попередників з ембріональних тілець клітин людини за рахунок активації експресії деяких транскрипцій-

них факторів (*Gata1*, *Gata3*, *C-myb*). У роботі інших авторів [20] також відзначено посилення експресії гемопоетичних регуляторних генів (*Bmi-1*, *beta-Catenin*, *Nox B4*, *GATA-1*) при культивуванні ембріональних тілець або гемопоетичних колонієутворюючих одиниць у присутності фетальних клітин. Навіть ці дані свідчать про високий потенціал КФП «втручати» у метаболічні процеси в різних структурах організму реципієнта. Наскільки КФП, що вводяться в організм, змінюють його генетичний профіль, принаймні, експресію зазначених вище генів.

З представлених даних можна виділити деякі особливості зміни експресії протоонкогенів після введення КФП інтактним тваринам. Насамперед, топографічно нКФП і кКФП не індукували експресію жодного з вивчених генів, що підвищено експресувалися у мишей лінії СЗН/Не (табл. 1). Хоча слід зазначити, що експресія деяких з них була встановлена в тих тканинах, в яких її не було у контрольних мишей лінії СВА/Н або навпаки. Наприклад, транскрипти *src*-гена з'являлися в лімфовузлах тварин з нКФП і не були ідентифіковані в клітинах КМ. Поряд з цим, визначені і деякі зміни ступеня експресії протоонкогенів після введення нКФП порівняно з контролем. Зокрема, експресія *jak1*-гена у цих мишей майже повторювала топографію експресії у мишей лінії СВА, але її ступінь був меншим у селезінці і лімфовузлах. Подібна ситуація відзначена і для протоонкогена *abl* у селезінці і тимусі. Найбільш ймовірним поясненням таких змін може бути маніфестація відгуку організму на маніпуляцію введення клітин. Підтвердженням цього є зміна профілю експресії генів у мишей лінії СВА/Н після введення КДП. У цій групі тварин не було відзначено високого ступеня експресії протоонкогенів подібно мишам СЗН/Не. Однак відмінності, в порівнянні з мишами СВА/Н, були очевидні.

Після введення кріоконсервованих клітин нами також було відмічено зміну як в топографії, так і в ступені експресії досліджуваних генів порівняно з групою мишей позитивного контролю лінії СЗН/Не (табл. 1). У групах тварин з введенням кКФП спостерігалася нова топографія експресії *abl* онкогену. На відміну від контрольних тварин підвищена кількість його транскриптів була ідентифікована в клітинах КМ. Аналогічно була встановлена підвищена експресія протоонкогена *src* в клітинах лімфовузлів. Треба зазначити, що таку зміну ступеня експресії *src* гена ми спостерігали в клітинах лімфовузлів після введення нКФП, що доводить схожий механізм впливу нативних і кріоконсервованих клітин. Таким чином, очевидно, що глибоке охолодження як потужний стрес-індукуючий фактор приводить до змін ряду структурних і функціональних характеристик клітин, що вводяться, наприклад, шедінгу мембранних рецепторів і зміни імунотипу профілю [21], інгібіції синтезу одних білків чи зростанням напрацювання інших, а саме, білків теплового шока – БТШ [22]. Крім того, подібні зміни функціональної активності КФП можуть бути наслідком активуючого впливу кріоконсервування на генетичний апарат клітин. Підтвердженням цьому є дані, які свідчать про активацію експресії генів плюріпотентності в КФП: *nanog*,

*sox-2*, *oct-4*, підвищення рівня експресії гена *gata-2*, контролюючого самопідтримку стовбурових кровотворчих клітин [23]. Проте, треба зазначити, що після введення як нКФП, так і кКФП не було відзначено збільшення експресії протоонкогенів подібної експресії у мишей СЗН/Не.

## 6. Висновки

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити наступні висновки:

1. Транскрипти генів *src*, *abl*, *lck*, *jak1* конститутивно в різній мірі експресувалися в органах ЛГПК інтактних мишей лінії СВА/Н.

2. У мишей лінії СЗН/Не з переддетермінованим розвитком РМЗ експресія зазначених генів відзначалася в інших, у порівнянні з мишами лінії СВА/Н, органах ЛГПК і в іншій мірі.

3. Введення як нКФП так і кКФП не індукувало експресію визначених генів у мишей СВА/Н, подібну тієї, яка визначалася у мишей СЗН/Не.

## Література

1. Грищенко, В. И. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения [Текст] / В. И. Грищенко, А. Н. Гольцев // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 2. – С. 54–84.

2. Гольцев, А. М. Молекулярні механізми імунорегуляторної дії препаратів фетоплацентарного комплексу при розвитку аутоімунних захворювань [Текст] / А. М. Гольцев, Т. Г. Дубрава, О. Д. Луценко, Є. О. Порожан, Н. М. Бабенко, Ю. О. Гаєвська, О. Д. Дімітров // Одесский мед. журнал. – 2013. – Т. 138, № 4. – С. 13–18.

3. Gorczyński, R. An alteration in the levels of populations of CD4<sup>+</sup> Treg is in part responsible for altered cytokine production by cells of aged mice which follows injection with a fetal liver extract [Text] / R. M. Gorczyński, C. Alexander, W. Bessler, K. Brandenburg, K. Fournier, J. P. Mach et. al. // Immunology Letters. – 2007. – Vol. 109, Issue 2. – P. 101–112. doi: 10.1016/j.imlet.2007.01.009

4. Gordeeva, O. F. Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and immunocompetent mice [Text] / O. F. Gordeeva, T. M. Nikonova // Cell Transplantation. – 2013. – Vol. 22, Issue 10. – P. 1901–1914. doi: 10.3727/096368912x657837

5. Croce, M. C. Oncogenes and Cancer [Text] / M. C. Croce // New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 358, Issue 5. – P. 502–511. doi: 10.1056/nejmra072367

6. Bruno, R. D. Late developing mammary tumors and hyperplasia induced by a low-oncogenic variant of mouse mammary tumor virus (MMTV) express genes identical to those induced by canonical MMTV [Text] / R. D. Bruno, S. M. Rosenfield, G. H. Smith // Molecular Cancer. – 2013. – Vol. 12, Issue 1. – P. 79. doi: 10.1186/1476-4598-12-79

7. Гольцев, А. М. Визначення стану Т-клітинної ланки імунітету і вмісту стовбурових ракових клітин як критерій оцінки ефективності превентивної терапії раку молочної залози кріоконсервованими клітинами детальної печінки [Текст] / А. М. Гольцев, М. О. Бондарович, А. В. Кузяков, М. В. Останков, Л. В. Останкова, О. В. Челомбітько // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, № 3. – С. 238–248.

8. Holt, M. P. Endogenous mouse mammary tumor viruses (mtv): new roles for an old virus in cancer, infection, and immunity [Text] / M. P. Holt, E. M. Shevach, G. A. Punkos-

dy // *Frontiers in Oncology*. – 2013. – Vol. 3. doi: 10.3389/fonc.2013.00287

9. Бландова, З. К. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований [Текст]: учеб. пос. / З. К. Бландова, В. А. Душкин, А. М. Малашенко, Е. Ф. Шмидт. – М.: Наука, 1983. – 192 с.

10. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы [Текст] / С. Херрингтон, Дж. Макги; под ред. С. Херрингтона. – М.: Мир, 1999. – С. 307–309.

11. Трофимов, Д. Ю. Разработка тест систем для определения уровня экспрессии мРНК FOXP3 на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени [Текст] / Д. Ю. Трофимов, О. В. Бурменская, А. Д. Донецкова и др. // *Иммунология*. – 2008. – Т. 29, № 3. – С. 182–187.

12. Chaudhari, S. JAK/STAT as a novel target for treatment of leukemia [Text] / S. Chaudhari, J. S. Desai, A. Adam, P. Mishra // *Int. J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – Vol. 6, Issue 1. – P. 1–7.

13. Summy, J. M. Src family kinases in tumor progression and metastasis [Text] / J. M. Summy, G. E. Gallick // *Cancer Metastasis Rev.* – 2003. – Vol. 22, Issue 4. – P. 337–358.

14. Neron, S. B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase [Text] / S. Neron // *International Immunology*. – 2005. – Vol. 18, Issue 2. – P. 375–387. doi: 10.1093/intimm/dxh377

15. Lopez, P. F. Antigenic determinants in a virus-induced mouse mammary tumor recognized by cell-mediated immune assays [Text] / P. F. Lopez, W. P. Parks, D. M. Lopez // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1984. – Vol. 72, Issue 3. – P. 725–732.

16. Filipp, D. Regulation of Fyn Through Translocation of Activated Lck into Lipid Rafts [Text] / D. Filipp, J. Zhang, B. L. Leung, A. Shaw, S. D. Levin, A. Veillette, M. Julius // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2003. – Vol. 197, Issue 9. – P. 1221–1227. doi: 10.1084/jem.20022112

17. Ariyoshi, K. Age dependence of hematopoietic progenitor survival and chemokine family gene induction after gamma irradiation in bone marrow tissue in C3H/He mice [Text] / K. Ariyoshi, T. Takabatake, M. Shinagawa, K. Kadono, K. Daino, T. Imaoka, S. Kakinuma et. al. // *Radiation Research*. – 2014. – Vol. 181, Issue 3. – P. 302–313. doi: 10.1667/rr13466

18. Khaldoyanidi, S. Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells [Text] / S. Khaldoyanidi, A. Denzel, M. Zoller // *Journal of Leukocyte Biology*. – 1996. – Vol. 60, Issue 5. – P. 579–592.

19. Liu, Y. Production of erythroid cells from human embryonic stem cells by fetal liver cell extract treatment [Text] / Y. Liu, W. Yue, L. Ji, X. Nan, X. Pei // *BMC Developmental Biology*. – 2010. – Vol. 10, Issue 1. – P. 85. doi: 10.1186/1471-213x-10-85

20. Lee, K. Y. Fetal stromal niches enhance human embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation and globin switch [Text] / K. Y. Lee, B. S. P. Fong, K. S. Tsang, T. K. Lau, P. C. Ng, A. C. Lam et. al. // *Stem Cells and Development*. – 2011. – Vol. 20, Issue 1. – P. 31–38. doi: 10.1089/scd.2010.0196

21. Takahashi, T. Osmotic stress and the freeze-thaw cycle cause shedding of Fc and C3b receptors by human polymorphonuclear leukocytes [Text] / T. Takahashi, S. Inada, C. G. Pommier, J. J. O'Shea, E. J. Brown // *J. Immunol.* – 1985. – Vol. 134, Issue 6. – P. 4062–4068.

22. Коржов, В. И. Белки теплового шока [Текст] / В. И. Коржов, М. В. Коржов, Е. А. Пунщикова, А. С. Сахненко // *Журн. АМН Украины*. – 2008. – Т. 14, № 1. – С. 26–42.

23. Borysov, P. The Effect of Cryopreservation on the Expression of Stemness-Genes in Mouse Fetal Liver Cells [Text] / P. Borysov, A. Dimitrov, M. Ostantkov, N. Babenko //

*Refrigeration Science and Technology*. – 2014. – Issue 1. – P. 207–211.

## References

1. Grishchenko, V. I., Goltsev, A. N. (2002). Transplantacija produktiv embriofetoplacentarnogo kompleksa. Ot ponimanija mehanizma deystvija k povisheniu effektivnosti primenenija [Transplantation of products of embriofetoplacental complex. From understanding of action mechanism to the effectiveness of application]. *Problems of Cryobiology*, 2, 54–84.

2. Goltsev, A. M., Dubrava, T. G., Lutsenko, O. D., Porozhan, E. O., Babenko, N. M., Gayevska, Y. O., Dimitrov, O. Y. (2013). Molekuljarni mehanizmi imunokoregual'noi dii preparativ fetoplacentarnogo kompleksy pri rozvitku autoimunih zahvorjuvan' [Molecular mechanisms of immunocorrective action of drugs of fetoplacental development of autoimmune diseases]. *Odessa med. Magazine*, 138 (4), 13–18.

3. Gorczynski, R. M., Alexander, C., Bessler, W., Brandenburg, K., Fournier, K., Mach, J. P. et. al. (2007). An alteration in the levels of populations of CD4+ Treg is in part responsible for altered cytokine production by cells of aged mice which follows injection with a fetal liver extract. *Immunology Letters*, 109 (2), 101–112. doi: 10.1016/j.imlet.2007.01.009

4. Gordeeva, O. F., Nikonova, T. M. (2013). Development of Experimental Tumors Formed by Mouse and Human Embryonic Stem and Teratocarcinoma Cells After Subcutaneous and Intraperitoneal Transplantations Into Immunodeficient and Immunocompetent Mice. *Cell Transplant*, 22 (10), 1901–1914. doi: 10.3727/096368912x657837

5. Croce, C. M. (2008). *Oncogenes and Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 358 (5), 502–511. doi: 10.1056/nejmra072367

6. Bruno, R. D., Rosenfield, S. M., Smith, G. H. (2013). Late developing mammary tumors and hyperplasia induced by a low-oncogenic variant of mouse mammary tumor virus (MMTV) express genes identical to those induced by canonical MMTV. *Molecular Cancer*, 12 (1), 79. doi: 10.1186/1476-4598-12-79

7. Goltsev, A. M., Bondarovich, M. O., Kuznyakov, A. V., Ostantkova, M. V., Ostantkova, L. V., Chelombitko, O. V. (2014). Viznachennja stanu T-klitinnoi lanki imunitetu i vmistu stovburovih rakovih klitin jak kriterij ocinki effektivnosti preventivnoji terapiiraku molochnoi gelezi kriokonservovanimi klitinami fetal'noi pechinki [Defining the T-cell immunity and content of stem cancer cells as a criterion for evaluating the effectiveness of preventive treatment of breast cancer cells cryopreserved fetal liver]. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 24 (3), 238–248.

8. Holt, M. P., Shevach, E. M., Punkosdy, G. A. (2013). Endogenous Mouse Mammary Tumor Viruses (Mtv): New Roles for an Old Virus in Cancer, Infection, and Immunity. *Frontiers in Oncology*, 3. doi: 10.3389/fonc.2013.00287

9. Blandova, Z. K., Dushkin, V. A., Malashenko, A. M., Schmidt, E. F. (1983). *Linii laboratornih zivotnih dlja medicobiologicheskikh issledovaniy* [Lines of laboratory animals for medical and biological research]. Moscow: Science, 192.

10. Herrington, S., Makgi, Dzh.; Herrington, S. (Ed.) (1999). *Molekularnaja klinicheskaja diagnostika. Metodi* [Molecular clinical diagnostics. Methods]. Moscow: Mir, 307–309.

11. Trofimov, D. Y., Burmenskaya, O. V., Donetskova, A. D. et. al. (2008). Razrabotka test system dlja opredelenija urovnja expressii mRNKFOXP3 na osnove OT-PCR v regime real'nogo vremeni [Development of test systems for the determination of mRNA FOXP3 expression levels through RT-PCR in real time]. *Immunology*, 29 (3), 182–187.



12. Chaudhari, S., Desai, J. S., Adam, A., Mishra, P. (2014). JAK/STAT as a novel target for treatment of leukemia. *Int. J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (1), 1–7.
13. Summy, J. M., Gallick, G. E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 22 (4), 337–358.
14. Neron, S. (2005). B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase. *International Immunology*, 18 (2), 375–387. doi: 10.1093/intimm/dxh377
15. Lopez, P. F., Parks, W. P., Lopez, D. M. (1984). Antigenic determinants in a virus-induced mouse mammary tumor recognized by cell-mediated immune assays. *J. Natl. Cancer. Inst*, 72 (3), 725–732
16. Filipp, D., Zhang, J., Leung, B. L., Shaw, A., Levin, S. D., Veillette, A., Julius, M. (2003). Regulation of Fyn Through Translocation of Activated Lck into Lipid Rafts. *The Journal of Experimental Medicine*, 197 (9), 1221–1227. doi: 10.1084/jem.20022112
17. Ariyoshi, K., Takabatake, T., Shinagawa, M., Kadono, K., Daino, K., Imaoka, T. et. al. (2014). Age Dependence of Hematopoietic Progenitor Survival and Chemokine Family Gene Induction after Gamma Irradiation in Bone Marrow Tissue in C3H/He Mice. *Radiation Research*, 181 (3), 302–313. doi: 10.1667/rr13466
18. Khaldoyanidi, S., Denzel, A., Zoller, M. (1996). Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 60 (5), 579–592.
19. Liu, Y., Yue, W., Ji, L., Nan, X., Pei, X. (2010). Production of erythroid cells from human embryonic stem cells by fetal liver cell extract treatment. *BMC Developmental Biology*, 10 (1), 85. doi: 10.1186/1471-213x-10-85
20. Lee, K. Y., Fong, B. S. P., Tsang, K. S., Lau, T. K., Ng, P. C., Lam, A. C. et. al. (2011). Fetal Stromal Niches Enhance Human Embryonic Stem Cell-Derived Hematopoietic Differentiation and Globin Switch. *Stem Cells and Development*, 20 (1), 31–38. doi: 10.1089/scd.2010.0196
21. Takahashi, T., Inada, S., Pommier, C. G., O’Shea, J. J., Brown, E. J. (1985). Osmotic stress and the freeze-thaw cycle cause shedding of Fc and C3b receptors by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol*, 134 (6), 4062–4068.
22. Korzhov, V. I., Korzhov, M. V., Punschikova, E. A., Sakhnenko, A. S. (2008). Belki teplovogo shoka [ Heat shock proteins]. *J. of AMS of Ukraine*, 14 (1), 26–42.
23. Borysov, P., Dimitrov, A., Ostankov, M., Babenko, N. (2014). The Effect of Cryopreservation on the Expression of Stemness-Genes in Mouse Fetal Liver Cells. *Refrigeration Science and Technology*, 1, 207–211.

*Дата надходження рукопису 17.05.2016*

**Гольцев Анатолій Миколайович**, Академік НАН України, директор ІПКіК НАН України, доктор медичних наук, професор, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016  
E-mail: cryopato@gmail.com

**Ямпольська Катерина Євгенівна**, кандидат біологічних наук, Відділ кріопатофізіології і імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016  
E-mail: yampi@ukr.net

**Останков Максим Вадимович**, кандидат біологічних наук, відділ кріопатофізіології і імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016  
E-mail: cryopato@gmail.com

**Луценко Олена Дмитрівна**, кандидат біологічних наук, відділ кріопатофізіології і імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016  
E-mail: cryopato@gmail.com

**Бондарович Миколай Олександрович**, кандидат біологічних наук, відділ кріопатофізіології і імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна, 61016  
E-mail: cryopato@gmail.com