

NEUMERZITSKAYA L.V., KLIMENKO S.W., KOVAL G.M., WERBILENKO R.M.,  
V.N. SHKARUPA

*Si «National Scientific Center for Radiation Medicine NAM S of Ukraine»  
Ukraine, 04050, Kiev, Melnikov str., 53, e-mail: lneum@bigmir.net*

#### STUDY OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN THE SOMATIC CELLS OF PATIENTS WITH THYROID CANCER WHO SUFFERED FROM THE CHERNOBYL ACCIDENT

**Aims.** Research level and spectrum of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of patients with thyroid cancer, which were last ionizing radiation due to the Chernobyl accident. **Methods.** Cytogenetic analysis of human lymphocytes. **Results.** Cytogenetic studies of peripheral blood lymphocytes of patients with thyroid cancer. This group of patients previously exposed to radiation. The frequency of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of patients with higher levels of spontaneous and significantly higher than the control group.

**Key words:** thyroid cancer, chromosome aberrations, radiation.

РЫМАРЬ С.Е., РАЧКЕВИЧ Н.О., КУЛАЧКО А.В., РУБАН Т.А., КОРДЮМ В.А.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН  
Украины, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: s.y.rymar@imbg.org.ua  
ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН»  
Украины, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, 67*

#### ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ СНО-K1 КАК ИСТОЧНИК РЕКОМБИНАНТНОГО FGF2 ЧЕЛОВЕКА

Современная регенеративная медицина рассматривает возможность использования рекомбинантных белков (гормонов, цитокинов, факторов крови и др.) для достижения терапевтических эффектов при ряде заболеваний человека (диабет I типа, рак, гемофилия, воспалительные, нейродегенеративные заболевания). Использование рекомбинантных белков не всегда обеспечивает необходимый терапевтический эффект в силу их быстрого клиренса. Альтернативой использованию очищенных рекомбинантных терапевтических белков является трансплантация клеток, которые их продуцируют. Трансплантация алогенного клеточного материала требует интенсивной иммуносупрессии, приводящей к серьезным побочным эффектам, таким, например, как оппортунистические инфекции. Интенсивные исследования, связанные с разработкой подходов к трансплантации клеток, которые могут стать источником терапевтических белков и при этом не быть мишенью для атаки со стороны иммунной системы даже, если клетки ксеногенные, привели к появлению технологии инкапсуляции трансплантируемых клеток.

Инкапсуляция клеток в микрокапсулы из безопасных полупроницаемых материалов, ко-

торые позволяют входить питательным веществам и выходить терапевтическим белкам, защищает клетки от атаки иммунной системы и обеспечивает долговременный терапевтический эффект [1, 2]. Наиболее перспективным материалом для инкапсуляции клеток на сегодня считается альгинатный гель [3]. Источником необходимых терапевтических агентов чаще всего служат генетически модифицированные клетки. Цель данного исследования состояла в том, чтобы получить трансгенную линию СНО-K1, которая продуцирует и секретирует в среду рекомбинантный FGF2 человека, и сравнить продукцию и секрецию рекомбинантного FGF2 трансгенными клетками при культивировании их в монослое и в альгинатных микрокапсулах. Интерес к FGF2 продиктован его широкими биологическими функциями, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, их выживание, адгезию, миграцию, подвижность и апоптоз, а также ангиогенез, развитие сердечно-сосудистой системы, заживление ран, рост злокачественных опухолей [3]. Кроме того он играет важную роль в процессах, связанных с повреждением сердца, почек и кишечника. Эти свойства FGF2 открывают перспективы его использования в терапевтических целях.

## Материалы и методы

В работе использованы плазмиды pUC 28, pJET2.1-blunt, pEGFP-C1 (Clontech), штаммы *Escherichia coli*: DH10B, HB 101, XL 1, клеточная линия CHO-K1 (клетки яичника китайского хомячка).

Выделение плазмидных ДНК, обработка их эндонуклеазами рестрикции, лигирование, получение компетентных клеток *E.coli*, анализ рекомбинантных плазмид проводили, используя стандартные методики [4]. Трансфекцию эукариотических клеток рекомбинантными плазмидами проводили с помощью полиэтиленimina (ПЭИ). Клетки выдерживали с комплексами ДНК-ПЭИ в течение часа. Селекцию клеток CHO-K1, трансфицированных pC1-F (рис. 1), проводили на G418 (200 мкг/мл). РНК из клеток CHO-K1 выделяли с помощью набора для выделения РНК NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel Inc.). Экспрессию FGF2 в клетках CHO-K1 проверяли методом ОТ-ПЦР, используя набор для синтеза к-ДНК (Thermo scientific).

Анализ секреции FGF2 в культуральную среду проводили, используя Вестерн-блот анализ. Клетки выращивали в среде F 10, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки

(Sigma), трижды отмывали средой F10 без сыворотки, после чего помещали в такую же среду. Через 1,5–2 суток культуральную среду собирали, белки осаждали 10 % ТХУ в присутствии 0,015 % дезоксихолата натрия. После разделения белков в 10 % денатурирующем полиакриламидном геле [5] проводили Вестерн-блот анализ согласно online протоколу фирмы Millipore ([millipore.com/immunodetection/id3/westernblotting](http://millipore.com/immunodetection/id3/westernblotting)), используя козы поликлональные антитела против рекомбинантного FGF2 человека и конъюгат антител к IgG козы, полученных в кролике, с пероксидазой хрена (Sigma, США). Микроинкапсуляцию клеток в альгинатном геле проводили следующим образом [6]: отмытые фосфатным буфером (pH 7,4) клетки CHO-K1 ( $10^7$ ) смешивали с 1,5 % альгинатом натрия, растворенным в физиологическом растворе (0,9 % NaCl). Используя шприц с иглой 29 g, капельно вносили в 102 mM раствор CaCl<sub>2</sub>. Через 30 мин раствор CaCl<sub>2</sub> удаляли, трижды отмывали фосфатным буфером, один раз средой F10. Для изучения секреции FGF2 микрокапсулы культивировали в среде F10 без эмбриональной сыворотки.

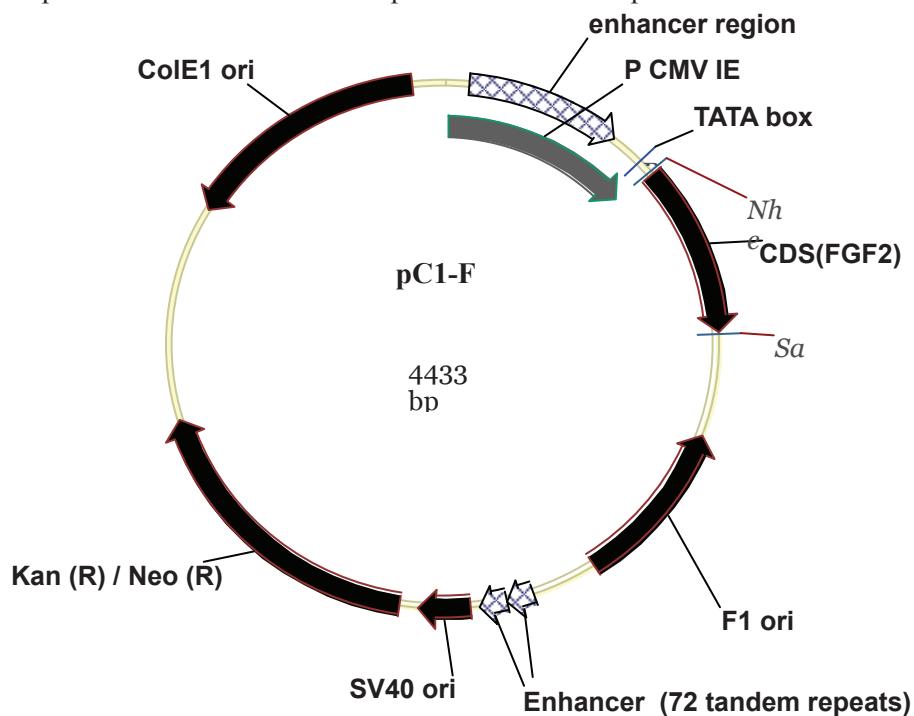


Рис.1 Физическая карта pC1-F

## Результаты и обсуждение

Первым этапом исследования было конструирование вектора, с помощью которого планировалось генетически модифицировать клетки CHO-K1, обеспечив экспрессию рекомбинант-

ного FGF2 человека. Для обеспечения эффективной экспрессии к-ДНК гена FGF2 была помещена код контроль сильного конститутивного промотора, которым является промотор цитоме-

галовируса, в векторе pEGFP-C1 (Clontech). Генетически модифицированная линия CHO-K1 была получена путем трансфекции клеток полученной плазмидой (pC1-F) с помощью полиэтиленэмина (25 кДа) с последующим отбором стабильных трансформантов на антибиотике G418. Наличие экспрессии FGF2 на уровне транскрипции внесенной в генетическую конструкцию последовательности было проверено с помощью ОТ-ПЦР в клетках полученной трансгенной линии. Как видно, обратнo-транскриптазная реакция на матрице, выделенной из генетически модифицированных клеток CHO-K1 мРНК, с последующей ПЦР приводит к появлению полно-размерной к-ДНК FGF2 в отличие от клеток исходной линии CHO-K1 (рис. 2, а). Этот факт свидетельствует о наличии экспрессии трансгена в полученных клетках. Известно, что ген FGF2 не имеет последовательности, которая кодирует сигнальный пептид, и белок секретируется неканоническим путем – не через аппарат Гольджи [7], поэтому можно было ожидать, что экспрессируемый белок будет секретироваться в культуральную среду.

Вестерн блот-анализ культуральной среды, в которой культивировались генетически модифицированные клетки, выявил несколько позитивных сигналов, основные из которых со-

ответствуют молекулярной массе немного выше 55 кДа и около 35 кДа. Молекулярная масса изоформы FGF2, которая использована в данном исследовании, составляет 18 кДа и совпадает с молекулярной массой рекомбинантного белка, полученного в *E. coli*, поскольку, как известно FGF2 человека негликозилированный. Возможно, исходя из известных данных о связывании FGF2 со специфическими белками-партнерами [8–10] он секретируется в виде комплексов. В модельных экспериментах нами показано, что он взаимодействует с компонентами эмбриональной телячьей сыворотки, которая несмотря на отмывание клеток, присутствует в среде. Известна склонность FGF2 к олигомеризации [11].

Эффективность инкапсуляции клеток CHO-K1 в альгинатный гель и их жизнеспособность в микрокапсулах была проверена на клетках, трансфецированных pC1EGFP, в которых наблюдается экспрессия флуоресцирующего зеленого белка (рис. 3, б). Методом микрокопирования было показано, что, по крайней мере, в течение недели клетки сохраняют способность к экспрессии GFP. Известно, что долговечность и прочность альгинатных микрокапсул увеличивается при покрытии их поликатионами, в частности, поли-L-орнитином [12].

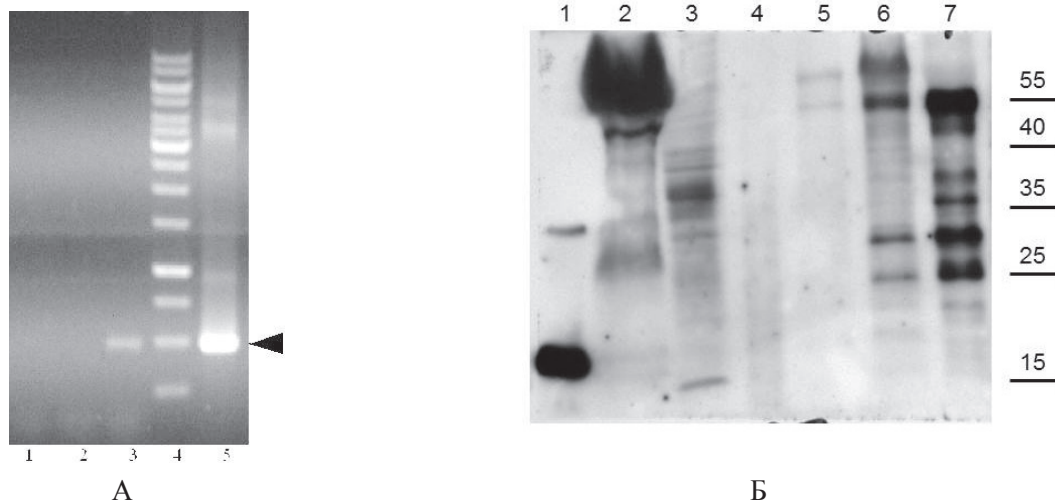


Рис 2. Экспрессия FGF2 в генетически модифицированных клетках CHO-K1: А – Электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР (стрелкой отмечен продукт амплификации последовательности FGF2): 1 – исходные клетки CHO-K1, 2 – клетки CHO-K1, трансфецированные «пустым» вектором pC1EGFP, 3 – клетки, трансфецированные pC1-F, 4 – 1kb DNA ladder (Fermentas), 5 – положительный контроль (ДНК pC1-F); Б – Вестерн блот анализ лизатов клеток CHO-K1, трансфецированных pC1FGF2, и сред, в которых они культивировались: 1 – рекомбинантный FGF2 (20нг), 2 – среда, в которой культивировались инкапсулированные в альгинатные микрокапсулы клетки CHO-K1, трансфецированные pC1-F, 3 – лизат клеток CHO-K1, трансфецированных pC1-F, 4 – среда, в которой культивировались клетки CHO-K1, трансфецированные pC1EGFP, 6, 7 – среды, в которых культивировались клетки, трансфецированные pC1-F.

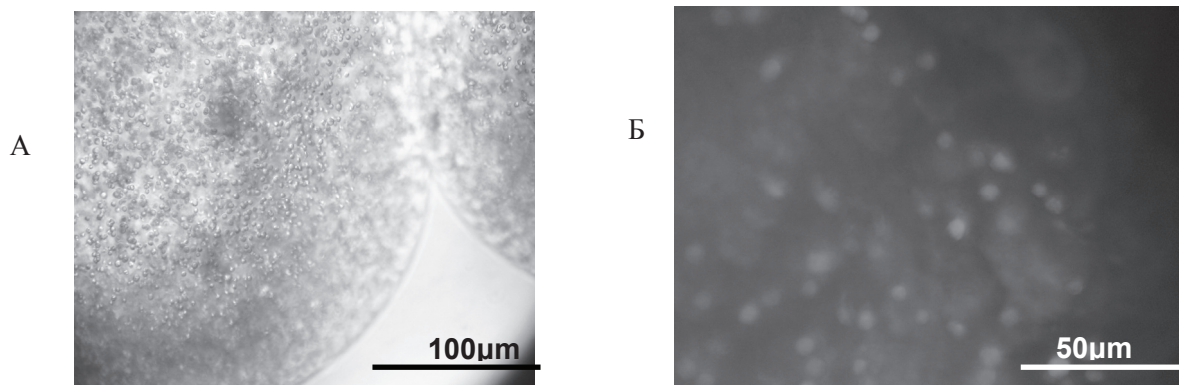


Рис. 3. Клетки CHO-K1, трансфицированные pC1EGFP, инкапсулированные в альгинатные микрокапсулы (А – световая микроскопия, Б – флуоресцентная микроскопия)

Вестерн блот-анализ среды, в которой культивировались микрокапсулы с генетически модифицированными клетками CHO-K1, показал, что все сигналы, свидетельствующие об экспрессии FGF2, которые наблюдаются при культивировании трансгенных клеток в монослойной культуре, наблюдаются при культивировании альгинатных микрокапсул с заключенными в них клетками (рис. 2, б, дор. 2).

Таким образом, клетки полученной генетически модифицированной линии CHO-K1 являются источником рекомбинантного FGF2 человека, который секретируется в среду при инкапсуляции таких клеток в альгинатные микрокапсулы. Полученные результаты являются основой для исследований влияния рекомбинантных цитокинов, которые синтезируются живыми инкапсулированными клетками *in vivo*.

### Литература

1. Krishnamurthy N.V., Gimi B. Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction // *Crit Rev. Biomed. Eng.* – 2011. – Vol. 39, №6. – P. 473–491.
2. Hernández R.M., Orive G., Murua A., Pedraz J.L. Microcapsules and microcarriers for *in situ* cell delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2010. – Vol. 62. – P. 711–730.
3. Yun Y.R., Won J.E., Jeon E., Lee S., Kang W., Jo H., Jang J.H., Shin U.S., Kim H.W. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration // *J. Tissue Eng.* – 2010. – P. 1–18.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning* // Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1989. – Vol. 1. – P. 568.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5229. – P. 680–685.
6. Cohen J., Zaleski K.L., Nourissat G., Yaremchuk M.J. Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered method // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2010. – 96 A. – P. 93–99.
7. Zehe C, Engling A, Wegehingel S, Schäfer T, Nickel W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 15479–15484.
8. Soulet F., Bailly K., Roga S., Bouche G. Exogenously added FGF2 to NIH3T3 cells interacts with nuclear ribosomal S6 kinase in cell cycle-dependent manner // *JBC.* – 2005. – Vol. 280. – P. 25604–25610.
9. Bonnet H., Filhol O., Truchet I., Bouche G. FGF2 binds to the regulatory  $\beta$  subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin // *JBC.* – 1996. – Vol. 271. – P. 24781–24787.
10. Van den Berghe L., Laurell H., Bugler B. FIF, a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF2 // *Mol. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 14. – P. 1709–1724.
11. Herr B., Ornitz D.M., Sasisekharan R., Venkataraman G., Waksman G. Heparin-induced Self-association of Fibroblast Growth Factor-2 // *JBC.* – 1997. – Vol. 272. – P. 16382–16389.
12. Darrabie M.D., Kendall W.F.Jr., Opara E.C. Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26, №34. – P. 6846–6852.

**RYMAR S.E., RACHKEVICH N.O., KULACHKO A.V., RUBAN T.A., KORDIUM V.A.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotny str., 150, e-mail: s.y.rymar@imbg.org.ua*

*SI «Institute of Genetic and Regenerative Medicine» NASMU*

*Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67*

## **ENCAPSULATED GENETICALLY MODIFIED CELLS OF CHO-K1 AS SOURCE OF HUMAN RECOMBINANT FGF2**

**The aim** of the investigation was to obtain the transgenic mammalian cell line CHO-K1 that expresses recombinant human FGF2 and secretes it into cultural medium and to compare the abilities of a monolayer cell culture and the cells encapsulated in alginate microcapsules to produce and to secrete this protein.

**Methods.** The non-viral gene transfer method, RT-PCR, Western blot analysis were used for the investigation. **Results.** The expression vector pC1-F contained the recombinant human FGF2 had been constructed. This vector was used for the CHO-K1 cells transfection. As a result, a stable transgenic cell line expressing FGF2 was obtained. A few positive signals were detected via Western blot analysis of the conditioned cultural media. The same protein products were revealed in a case of the conditioned cultural media where alginate microcapsules with the transgenic cells had been cultivated. **Conclusion.** Thus the obtained genetically modified CHO-K1 cells remain a source of the recombinant human FGF2 after their encapsulation in alginate microcapsules.

**Key words:** recombinant human FGF2, transfection, encapsulation, alginate microcapsule.

## **СОСНІНА К.О.**

*ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»*

*Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка 31-а, e-mail:katja.sosnina@gmail.com*

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ІНСЕРЦІЯ/ДЕЛЕЦІЯ 14 П.Н. ГЕНА НЕКЛАСИЧНОГО АНТИГЕНА HLA-G ПРИ НАВИКОВОМУ НЕВИНОШУВАННІ ВАГІТНОСТІ НЕЗ'ЯСОВАНОГО ГЕНЕЗУ**

Однією із центральних проблем імунології репродукції є дослідження імунних процесів, що забезпечують нормальний перебіг вагітності та народження дитини, а також з'ясування патологічних механізмів, що призводять до втрати вагітності [15]. Чисельні дослідження показують, що успішна імплантація та розвиток плода відбуваються завдяки еволюційно виробленим імунним механізмам, котрі захищають плід, в тому числі, і від згубної дії материнської імунної системи. Один із таких механізмів полягає у включенні на самих ранніх етапах онтогенезу людини унікальних генів HLA-системи, так званих неklasичних генів Ib класу HLA-G, HLA-E, HLA-F [4, 10, 15].

Відомо, що на ембріональних клітинах класичні антигени HLA I-го та II-го класу не експресуються і це запобігає конфлікту між HLA-напівчужерідними клітинами плода та імунною системою матері [8, 9, 17, 11]. Тим не менше, існує інша небезпека – клітини, позбавлені HLA-антигенів на поверхні, можуть зазнавати НК-опосередкованого лізису. Але цьому запобігають неklasичні HLA-антигени:

сильна експресія молекул HLA-G на клітинах цитотрофобласту разом з експресією HLA-E та HLA-F в плаценті перешкоджає НК-опосередкованого лізису ембріональних клітин [3, 5, 15].

Найбільш вивченими неklasичними HLA-антигенами є антигени класу G. Зокрема, першою вивченою та найбільш дослідженою функцією HLA-G молекул є інгібування НК і T-опосередкованого лізису клітин за рахунок прямої взаємодії з рецепторами ILT2 і ILT4 та KIR2DL4. Експресія HLA-G на трофобласті може протистояти імунному нагляду клітин НК, а також інгібувати їх трансдотеліальну міграцію. HLA-G, взаємодіючи з ILT-2 та/або іншими гальмівними рецепторами НК-клітин, впливає на експресію адгезивних молекул на НК клітинах. Ці дані вказують на те, що антигени HLA-G на материнсько-плодовому бар'єрі можуть запобігати трансплацентарній міграції маткових НК клітин, а також нейтралізувати накопичені НК клітини через взаємодію з їхніми кілерінгібіторними рецепторами [1,11]. Іншою функцією HLA-G є регулювання цитотоксичної