

УДК 616-006.441

**СУББОТИНА И.А.**, канд. вет. наук

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
irin150680@mail.ru*

## **РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ В ИЗУЧЕНИИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Онкологические болезни, и, непосредственно, лимфопролиферативные заболевания регистрируются во всем мире, как среди животных, так и среди людей. Это обширная группа патологий, поражающая как взрослые организмы, так и совсем молодые организмы. Показана возможность создания биологических моделей в онкогематологии для решения проблем лечения и диагностики данных патологий. Приведены основные породы и линии лабораторных животных, клеточные линии. Дано подробное описание методов фиксации лабораторных животных и способов введения онкокультур животным. Показан ход эксперимента по воспроизведению асцитной опухоли у линейных мышей и его результаты. Доказана возможность трансплантации опухоли в организм лабораторного животного.

**Ключевые слова:** онкогематология, биологические модели, лабораторные животные, фиксация, культуры клеток.

**Постановка проблемы, анализ последних исследований и публикаций.** Лимфопролиферативные заболевания на сегодняшний день, к сожалению, получили довольно широкое распространение, особенно среди детей, хотя и среди взрослого населения это довольно частая патология из заболеваний системы крови.

Диагностика данной группы патологий базируется, в основном, на гематологических, гистологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических методах исследования. Однако даже современное развитие молекулярной генетики не дает возможности полностью отказаться от применения биологических моделей. Вот уже многие десятилетия врачи и учёные совершенствуют подходы к диагностике онкологических болезней, разрабатывают новейшие лекарства, изучают причины развития опухолей и ряд других вопросов. И в данной работе роль лабораторных животных оказалась неопределима. Создание ряда биологических моделей позволило разработать значительное количество эффективных лекарственных препаратов, раскрыло ряд вопросов онкогенеза, дало возможность разработать новейшие подходы в диагностике данных патологий. В последние годы огромное количество исследований в области онкологии, таких как изучение противоопухолевой активности ряда препаратов, изучение канцерогенеза и молекулярно-генетических аспектов проводится именно *in vivo* и *in vitro* [4, 6, 8].

Наиболее часто в качестве биологической модели используются грызуны, а в частности – мыши и крысы. Непосредственно в онкологии, а именно, в онкогематологии, наибольшее распространение получили такие линии мышей, как Balb/c, C57/Bl, Nude. Данные линии имеют ослабленный иммунитет, или практически полностью подавленную иммунную систему, что позволяет относительно легко приживлять им ряд опухолей, причём как гомогенных, так и гетерогенных (человеческих). Недавно группой ученых была выведена новая линия так называемых «гуманизированных» мышей – линия SCID/Hu. Помимо мышей созданы также сотни инбредных линий крыс [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Параллельно с лабораторными животными, огромное значение имеет использование культур клеток для проведения ряда исследований в онкогематологии.

В онкологической практике при изучении лимфопролиферативных заболеваний широко применяются как культуры клеток животных, так и человека. Наибольшее распространение получили: L1210 (мышь, асцитная жидкость (лимфобластный лейкоз), P388D1 (мышь DBA/2, лимфоидная неоплазма), E1-4 (лимфома мыши, индуцированная диметилбензантраценом), P3X63Ag8.653 (мышь BALB/c, миелома, клон линии P3X63Ag8), NFS-60 (мышь, миелоидный лейкоз), Daudi (лимфома Беркита), C8166 (человек, Т-лимфобластный лейкоз), CCRF-SB (человек, острый лимфобластный лейкоз), SEM.NKR (человек, Т-лимфобластный лейкоз), SEM-SS (человек, Т-лимфобластный лейкоз), HL-60 (человек, промиелоцитарный лейкоз), KJ-1 (человек, острый миелоидный лейкоз), Jurkat (человек, Т-лимфобластный лейкоз), Jurkat-tat (человек, Т-лимфобластный лейкоз), и ряд других [1, 2, 3].

Цель исследования – создание биологических моделей лимфопролиферативных заболеваний для дальнейшего изучения факторов, влияющих на развитие опухоли и разработки ранней диагностики данных заболеваний.

**Материал и методика исследования.** В эксперименте были использованы: беспородные мыши, линейные мышей BALB/c и C57/Black. Мыши закупались в питомнике Рапполово (Санкт-Петербург, Россия) Из онкокультур клеток для трансплантации (прививания) опухоли применяли: L1210 (лимфобластный лейкоз мыши), P388D1 (лимфоидная неоплазма). Линии клеток получены в РНПЦ Эпидемиологии и микробиологии Республики Беларусь (<http://www.belriem.by/>). Подопытных линейных животных содержали в специальных условиях в связи с высокой чувствительностью к различным инфекциям. Помещения для работы с животными оборудовались специальными стерилизующими устройствами (ультрафиолетовое излучение), работы проводились в специализированных боксах с ламинарным потоком стерилизуемого воздуха. Экспериментальные работы проводились в хирургических масках в условиях максимальной асептики. Все работы проводились согласно методических указаний «Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе УО «Витебский государственный медицинский университет» и мерах по реализации требований биомедицинской этики»-2010 (приказы ректора ВГМУ №55-н от 09.09.2004 г., №65-нир от 10.06.2009 г., №13-Л от 04.03.2010 г., №31-нир от 24.02.2011 г., №67-нир от 27.04.2011 г., №12-нир от 14.01.2015 г.). Постановка экспериментального исследования с использованием лабораторных животных соответствует рекомендациям Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes: Strasbourg, Council of Europe, 51 pp; 18.03.1986), Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 (Council Directive on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animal Used for Experimental and Other Scientific Purposes) и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994-1996), ТКП 125- 2008.

Способы введения культур клеток животным: использовали внутримышечное, подкожное, внутрибрюшинное введение. В опыте использовалось всего 200 линейных животных (по 100 животных каждой линии) и 100 беспородных животных.

Внутримышечное введение: животное фиксировали в брюшном положении, либо в вертикальном положении и производили инъекцию инсулиновым шприцем. Инъекция производилась в бедренную мышцу, с внутренней поверхности бедра. Доза введения: мышам – не более 0,5 мл культуры клеток.

Внутрибрюшинный способ введения: животное фиксировали в вертикальном положении, инъекцию производили вблизи белой линии (с правой либо с левой стороны), в нижней трети брюшной стенки. Иглу направляли снизу вверх. Доза введения – 0,5 мл взвеси клеток.

Подкожный способ введения: животное фиксировали в брюшном положении, инъекцию проводили в области лопатки инсулиновым шприцем. Первоначально аккуратно оттягивали кожу животного, затем вкалывали иглу у основания образовавшейся кожной складки. Аккуратно перемещали иглу вправо-влево, чтобы убедиться, что она находится под кожей, а не в толще мышц. Затем вводили клеточную культуру в дозе 0,5 мл.

Доза введения культур клеток: в эксперименте использовали дозировки: 6 млн клеток, 8 млн клеток и 10 млн клеток на введение одному животному.

Основные результаты исследований. При использовании линейных животных нами была воспроизведена асцитная опухоль только у мышей линии BALB/c при использовании культуры клеток L1210 (лимфобластный лейкоз мыши) в дозе 10 млн клеток на животное при внутрибрюшинном введении. Остальные дозировки – 6 млн и 8 млн клеток, и другие пути введения (внутримышечное и подкожное) оказались неэффективными в нашем эксперименте. Срок эксперимента – 26 дней. Достоверность полученных результатов подтверждалась гистологическими и цитологическими исследованиями.

В эксперименте не удалось воспроизвести опухоль в организме беспородных животных, ни при одной из всех используемых дозровок и линий клеточных культур. Так же в данном эксперименте не удалось воспроизвести опухоль с использованием культуры P388D1 (лимфоидная неоплазма).

**Выводы:** 1. Создание биологической модели лимфопрولیферативных заболеваний возможно при использовании линейных животных с ослабленным иммунитетом (мыши линии BALB/c) и соответствующих линий клеток (L1210 (лимфобластный лейкоз мыши)) в довольно высокой дозировке (10 млн клеток на введение).

2. Работа с другими клеточными культурами должна проводиться и дальше с более тщательным подбором как самих культур, так и дозировок, и линий животных.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коллекция культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии: нынешнее состояние и перспективы развития / С. В. Корень и др. // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. ст. Минск : ГУ РНМБ, 2015. Вып. 8. С. 162–168.
2. Дуж Е. В., Гончаров А. Е. (2015). Профиль экспрессии поверхностных маркеров линий клеток миелоидного происхождения. Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. ст. – Минск : ГУ РНМБ, Вып. 8. С. 169–173.
3. Hancharou A.Y., Duzh E.V., DuBuske L.M. (2016). Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations. *Allergy*. Vol. 71. Suppl. 102. P.187
4. Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription. Maicas M. et al. *Oncogene*, 2012 Jun 11. doi: 10.1038/ onc.2012.222.
5. Cespedes V.M., Casanova I., Parreno M., Mangues R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin. Transl. Oncol.* 2006; Vol. 8 (5): P. 318-29.
6. Ozaslan M., Karagoz I.D., Kilic I.H., Guldur M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr. J. Biotech.* 2011; Vol. 10 (13): P. 2375-8.
7. Sharpless N.E., DePinho R.A. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; Vol 5: P. 741-54.
8. Son Y.O., Wang L., Poyil P., Budhraj A., Hitron J.A., Zhang Z. et al. Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ /p-catenin signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264 (2): 153-60.
9. Ross S.R. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *viruses*. 2010; 2 (9): 2000-12.
10. Mason R.S., Reichrath J. Sunlight vitamin D and skin cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012; Oct 12.

#### REFERENCES

1. Koren, S. (2015) 'Kollekciya kul'tur kletok cheloveka i zhyvotny'x RNPCh e'pidemiologii i mikrobiologii: ny'eshnee sostoyanie i perspektivy` razvitiya'. *Sovremenny'e problemy` infekcionnoj patologii cheloveka* 8, 162-168
2. Duzh, E. and Goncharov, A. (2015) 'Profil` e'kspressii poverkhnostny'x markerov linij kletok mieloidnogo proisxozhdeniya'. *Sovremenny'e problemy` infekcionnoj patologii cheloveka* 8, 169-173
3. Hancharou, A. (2016). Comparative profile of surface and intracellular molecule expression in 10 immortalized human T cell lines to be considered for immunomodulatory drug evaluations . *Allergy*, 71, 187-187.
4. Maicas, M. (2012). . Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription.. *oncogene*, 10, 222-222.
5. Cespedes, V. (2006). Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin. Transl. Oncol*, 8, 29-318.
6. Ozaslan, M. (2011). Ehrlich ascites carcinoma.. *Afr. J. Biotech.*, 10, 8-2375.
7. Sharpless, N. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. . *Nat. Rev. Drug Discov*, 5, 54-741.
8. Son , Y. (2012). Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ /p-catenin signaling.. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2, 60-153.
9. Ross, S. (2010). Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses*, 9, 12-2000.
10. Mason, R. (2012). Sunlight vitamin D and skin cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2, 12-125.

#### Роль біологічних моделей у вивченні лімфопрولیферативних захворювань

##### I.A. Суботіна

Онкологічні хвороби, і, безпосередньо, лімфопрولیферативні захворювання реєструються у всьому світі, як серед тварин, так і серед людей. Це велика група патологій, що вражає як дорослі організми, так і зовсім молоді організми. У даній статті показана роль біологічних моделей в онкогематології, в рішенні проблем лікування та діагностики даних патологій. Наведено основні породи та лінії лабораторних тварин, клітинні лінії. Дано докладний опис методів фіксації лабораторних тварин і способів введення онкокультур тваринам. Показаний хід експерименту з відтворення асцитної пухлини у лінійних мишей і його результати. Доведено можливість трансплантації пухлини в організм лабораторних тварин.

**Ключові слова:** онкогематологія, біологічні моделі, лабораторні тварини, фіксація, культури клітин.

#### Role of the biological models in the study of lymphoproliferative diseases.

##### Subottina I.

Lymphoproliferative diseases to date, unfortunately, have become quite widespread, they are especially common among children, although among the adult population it is quite frequent pathology from diseases of the blood system. In recent

years, a large number of oncology research, such as the study of the antitumor activity of a number of drugs, the study of carcinogenesis and molecular genetic aspects, have been conducted in vivo and in vitro. Most often as a biological model, rodents are used, and in particular – mice and rats. Directly in oncology, and in particular in oncohematology, the most widespread are the lines of mice such as Balb/c, C57/Bl, Nude. These lines have weakened immunity, or almost completely suppressed nominal system, which makes it relatively easy to implant a number of tumors, both homogeneous and heterogeneous (human).

The most successful transplantation of human tumors is performed in mice and rats with a mutation of nu. The nu mutation has multiple effects. Its main manifestations are absence of thymus and wool cover. Therefore, such animals are called nude – naked. Because of the absence of thymus, mice and rats nude develop immunodeficiency, as a result of which heterologous tumors have been successfully implanted in them.

In parallel with laboratory animals, it is of great importance to use cell cultures for a number of studies in oncohematology. In oncological practice, when studying lymphoproliferative diseases, both animal and human cell cultures are widely used. The most widespread of the animals oncocultures were L1210 (mouse, ascites fluid (lymphoblastic leukemia), P388D1 (DBA/2 mouse, lymphoid neoplasm), El-4 (dimethyl benzanthracene induced mouse lymphoma), P3X63Ag8.653 (BALB/c mouse, myeloma, clone of the line P3X63Ag8), NFS-60 (mouse, myeloid leukemia) and a number of other cultures.

Human cell cultures work intensively with: Daudi (lymphoma of Berkit), C8166 (human, T-lymphoblastic leukemia), CCRF-SB (human, acute lymphoblastic leukemia), CEM.NKR (human, T-lymphoblastic leukemia), CEM-SS (human, T-lymphoblastic leukemia), HL-60 (human, promyelocytic leukemia), IM-9 (human, myeloma), KJ-1 (human, acute myeloid leukemia), Jurkat (human, T-lymphoblastic leukemia), Jurkat -tat (human, T-lymphoblastic leukemia) and a number of other.

The aim of our work was the creation of biological models of lymphoproliferative diseases for further study of the factors affecting the development of the tumor and the development of early diagnosis of these diseases.

Materials and methods. In the experiment, non-native mice, linear mice BALB/c and C57/Black were used. Of oncoculture cells for transplantation (inoculation) of the tumor were used: L1210 (mouse lymphoblastic leukemia), P388D1 (lymphoid neoplasm).

Methods for introducing cell cultures to animals: intramuscular, subcutaneous, intraperitoneal administration was used. Intravenous and intracerebral introduction to small animals – rats and mice – is a rather laborious process, on the basis of this, we have chosen the methods described above. Their technique is quite simple, and it is relatively low-invasive methods of administration. The death of animals due to errors with the introduction of drugs is minimal, which makes it possible to widely use these methods in an experiment

Intramuscular injection: the animal was fixed in the abdominal position, or in an upright position and injected with an insulin syringe. The injection was made in the femoral muscle, from the inner surface of the thigh. Dose of administration: mice – no more than 0.5 ml of cell culture. Intraperitoneal route of administration: the animal was fixed in an upright position, the injection was performed near the white line (on the right or on the left side), in the lower third of the abdominal wall. The needle was pointed upwards. The dose of administration is 0.5 ml of cell suspension

Subcutaneous mode of administration: the animal was fixed in the abdominal position, the injection was performed in the area of the scapula using an insulin syringe. Initially, carefully pulled the skin of the animal, then injected the needle at the base of the formed skin fold. Carefully move the needle to the right and left to make sure that it is under the skin, and not in the thickness of the muscles. Then, the cell culture was administered in a dose of 0.5 ml. Dose of introduction of cell cultures: in the experiment, dosages from 6 million cells to 10 million cells were used for administration to one animal.

Results of the research. Using linear animals, we reproduced an ascites tumor in BALB / c mice using a cell culture of L1210 (mouse lymphoblastic leukemia) at a dose of 10 million cells per animal with intraperitoneal injection. The experiment is 26 days long. The reliability of the results was confirmed by histological and cytological studies.

In the experiment it was not possible to reproduce the tumor in the body of nonbreeding animals, with none of all the dosages and lines of cell cultures used.

Conclusions: the creation of a biological model of lymphoproliferative diseases is possible with the use of linear animals with weakened immunity (BALB / c mice) and corresponding cell lines (L1210 (mouse lymphoblastic leukemia)) at a rather high dosage (10 million cells per administration).

**Keywords:** oncohematology, biological models, laboratory animals, fixation, cell cultures.

*Надійшло 20.04.2018 р.*