

6. Бариляк І.Р., Шапошнікова В.М., Неумержицька Л.В. та ін. Екологічні аспекти міжрегіональних відмінностей частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області.— Збірник наукових праць “Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології”.— Вип.5.— 2009.— Ст. 22–27.

7. Materials of International Symposium on Chernobyl Health Effects, November 9–10, 2009, Minsk.

### **Резюме**

Проведено дослідження стану репродукційної функції у жінок з групи ризику щодо народження дітей із ВВР та аналогічне дослідження у сім'ях ліквідаторів аварії на ЧАЕС. Виявлено статистично значиму різницю ( $P < 0,05$ ) щодо відсотку мертворождення у матерів, які народили дитину з вродженою вадою розвитку порівняно із жінками контрольної групи, проте не зафіксовано статистично вірогідного збільшення кількості репродуктивних втраг у жінок із сімей ліквідаторів.

Проведено исследование состояния репродукционной системы у женщин из группы риска рождения детей с ВПР и аналогичное исследование в семьях ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Выявлено статистически значимое различие ( $P < 0,05$ ) по мертворождениям у матерей, родивших детей с ВПР относительно женщин контрольной группы, но не зафиксировано статистически значимого увеличения количества репродуктивных потерь у женщин из семей ликвидаторов.

The reproductive system study of women from congenital malformation risk group and from liquidators families was complete. The statistically significant increase in stillborn in congenital malformation risk group was revealed, but no increase in reproductive losses among women from liquidators families was detected.

**ГУЛЬКО Т.П.<sup>1</sup>, ДЕРЯБИНА Е.Г.<sup>2</sup>, РЫМАР С.Е.<sup>1</sup>, РУБАН Т.А.<sup>1</sup>, СУХОРАДА Е.М.<sup>1</sup>, МАСЛОВА О.А.<sup>2</sup>, ЛИХАЧЕВА Л.И.<sup>1</sup>, ДАХОВНИК А.В.<sup>1</sup>, КОРДЮМ В.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
Україна 03680, г. Київ, ул. Заболотного, 150

<sup>2</sup>Інститут генетическої та регенеративної медицини НАМН України  
Україна 04114, г. Київ, ул. Вышгородская, 67

## **ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МЫШИНЫХ БЛАСТОЦИСТ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки) представляют больший интерес как в плане фундаментальных исследований, так и возможного клинического применения. Обусловлено такое внимание прежде всего их уникальными свойствами — неограниченной пролиферацией и плюрипотентностью (способность клеток дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков и в линию половых клеток) [1]. Удобными моделями для изучения ES клеток человека являются ES-клетки, изолированные из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты млекопитающих [2].

Культивирование бластоцист является важным этапом при получении эмбриональных стволовых клеток млекопитающих, которое зависит от состояния клеток ВКМ, а именно от сохранения ими плюрипотентности и способности к размножению. Использование определенных животных связано с адекватностью при оценке того или иного процесса. Мышиные ES-клетки могут быть альтернативным модельным объектом для изучения многих вопросов в области молекулярной биологии, трансплантологии, регенеративной медицины и создания биотехнологий с использованием методов трансгеноза [3, 4, 5, 6]. Многими авторами показано сохранение эмбриональными клетками мышцы, изолированными из ВКМ бластоцисты, плюрипотентных свойств в условиях *in vitro* [4, 5].

Целью работы было изучение особенностей поведения мышинных преимплантационных зародышей на стадии бластоцисты при длительном культивировании и их характеристика.

Задачами работы было: стандартизация метода получения зародышей на стадии 3,5-дневной беременности у исследуемой линии мышей; наблюдение за изменением мышинных бластоцист в условиях длительного культивирования; выделение мышинных ES-клеток из ВКМ и идентификация их стволового состояния.

#### **Материалы и методы**

В опытах использовались половозрелые мыши линии ICR, которые являются потомством аутбредной популяции, полученной в Институте изучения рака, США (Institute Cancer Research) и длительно поддерживаемой путем инбредного размножения в виварии ИМБиГ НАН Украины. Животные этой линии характеризуются высокой плодовитостью, большой степенью жизнеспособности и выживаемости потомства. Для суперовуляции яйцеклеток у самок использовали гормоны фолликулостимулирующий — Фоллигон и хориональный гонадотропин — Хорулон. Отбор преимплантационных зародышей осуществляли под лупой МБС-10. Манипуляции с бластоцистами проводили с помощью микроманипулятора. Культивировали бластоцисты в среде DMEM с 15% фетальной телячьей сыворотки на слое первичных мышинных фибробластов, инактивированных митомицином С (MIF). Для поддержания плюрипотентного статуса ES-клеток в культуральную среду добавляли LIF (leukemia inhibitor factor), 1000 ЕД/мл. Гистохимическим окрашиванием по Гомори (рис. 10) выявляли экспрессию щелочной фосфатазы, маркера стволовости ES-клеток как на уровне клеток ВКМ бластоцисты, так и при их длительном культивировании.

#### **Результаты и обсуждение**

В качестве объектов исследования были использованы мышинные преимплантационные зародыши, полученные на стадии 3,5 суток гестации. Разные линии мышей отличаются как генетическими, так и физиологическими параметрами. Необходимость получения определенных стадий зародышей требует четких знаний временных параметров развития мышевидных грызунов [2, 3]. В связи с этим была проведена оптимизация условий получения

преимплантационных зародышей на стадии бластоцисты для использованной в данной работе линии мышей ICR. Животных тщательно подбирали по возрасту (1,5–2,0 мес.) и весу (18–20 г). Использование метода суперовуляции яйцеклеток с помощью гормонов Фолигона и Хориона давало возможность получать до 35 зародышей, по сравнению с 15 при естественном покрытии самок [3]. Дозу гормонов для самок исследуемой линии подбирали экспериментально, оптимальным оказалось введение 6–7 МЕ препарата на мышь.

Культивирование бластоцист является важным этапом дальнейшего развития преимплантационных зародышей вне организма матери, при котором идет увеличение числа клеток ВКМ с сохранением их плюрипотентности [4]. Отобранные визуально по морфологическим признакам, соответствующим этой стадии развития, зародыши вводили в культуру. Жизнеспособность бластоцист оценивали по наличию блестящей *Z. Pellucida*, способности продолжать дальнейшее развитие *in vitro* и по появлению полноценного и жизнеспособного потомства в результате пересадки культивируемых зародышей реципиентам (данный метод является наиболее надежным) [2].

В процессе культивирования наблюдали за особенностями развития бластоцист, введенных в культуру как с *Z. Pellucida*, так и без нее. Бластоцисты от *Z. Pellucida* освобождали либо ферментативным методом с помощью проназы, либо с помощью микроманипулятора (рис. 1–3).

При культивировании бластоцист были отмечены особенности их поведения, которое зависело, прежде всего, от состояния внутренней клеточной массы. На первых этапах зародыши вели себя идентично, независимо от способа снятия оболочки. Постепенно возникающие субпопуляции, представляющие собой потомство недифференцированных клеток ВКМ, были

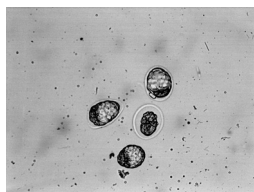


Рис.1

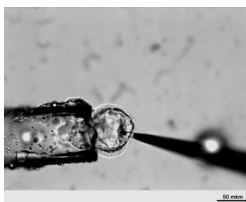


Рис.2

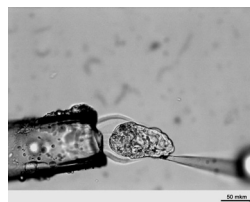


Рис.3

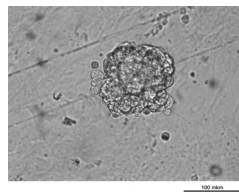


Рис. 4

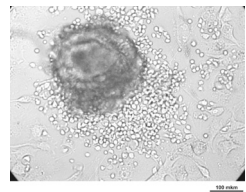


Рис. 5

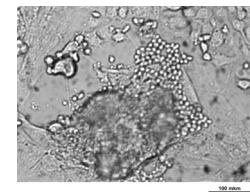


Рис. 6

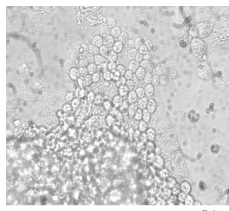


Рис. 7

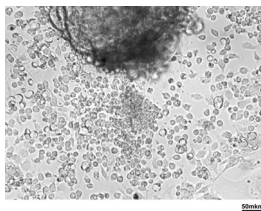


Рис. 8

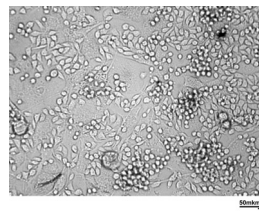
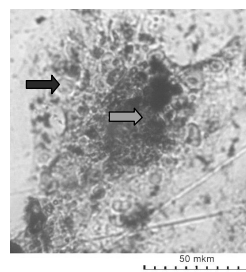
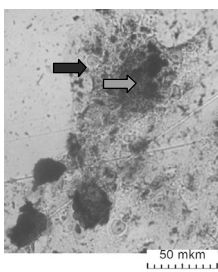
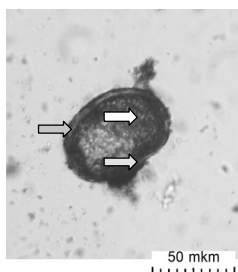


Рис. 9



Клетки ВКМ:

⇨ Клетки трофобласта.

⇨ Блестящая оболочка.

⇨ Клетки ВКМ обладают высокой активностью щелочной фосфатазы.

⇨ Краевые дифференцированные клетки имеют пониженную активность щелочной фосфатазы.

### Рис. 10. Развитие бластоцисты в культуре (окрашивание по Гомори)

окружены клетками трофобласта (рис. 4). В процессе своего дальнейшего развития в культуре (5–6 сутки) бластоцисты видоизменялись. Одни представляли собой скопления клеток с четкой внешней границей, окруженные выселяющимися клетками энтодермы (рис. 5).

Через две недели у бластоцист центральное скопление не имело четко выраженных границ с интенсивным выселением энтодермальных клеток (рис. 6–7). На 17 сутки культивирования в центральном скоплении помимо плотных кластеров мелких клеток ВКМ хорошо идентифицировались группы клеток, имеющих строение, сходное с эпителиальными клетками различного типа (рис. 8).

Полученные клоны ES-клеток были перенесены с фидера в бессывороточную среду, дополненную LIF, который позволяет поддерживать культивируемые клетки в недифференцированном состоянии. Культуральную среду обновляли регулярно. Рост ES-клеток в культуре наблюдался в виде клонов (рис. 9). В каждом клоне присутствовали две популяции незрелых клеток с разным механизмом пролиферации. В центре клона пролиферировали самообновляющиеся клетки с однородным фенотипом и, вероятно,

максимальной плюрипотентностью. На периферии клона некоммитированные прогениторные слои вступали в цикл созревания, который сопровождался уменьшением потенциальности клеток. Одиночные клетки, покидая клон, неизбежно дифференцировались.

По-видимому, только в клоне сохраняется микроокружение, позволяющее стволовым клеткам удерживать необычно высокую генетическую потенциальность. Полученные нами результаты и высказанные предложения согласуются с описанными в литературе [8, 9].

Высокая активность щелочной фосфатазы ранних эмбриональных клеток, по мнению многих авторов может рассматриваться как биохимический маркер плюрипотентности стволовых клеток [7, 10]. В связи с этим, для изучения состояния полученных клеток, было проведено гистохимическое окрашивание на выявление щелочной фосфатазы. Методом гистохимического окрашивания по Гомори выявили равномерное окрашивание ВКМ как в бластоцисте, так и при ее длительном культивировании, что указывает на сохранение стволовости клеток.

Активность фермента щелочной фосфатазы падала по мере дифференцировки краевых ES-клеток, о чем можно было судить по снижению интенсивности окрашивания. Длительное культивирование ES-клеток требует соблюдения подбора условий для поддержания их недифференцированного состояния. Представленные результаты гистохимического окрашивания ES-клеток дают основание утверждать, что данный метод может служить одним из доступных наглядным тестом стволовости ES-клеток *in vitro*.

#### Литература

1. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы // Цитология.— 2007.— Т.49, №7.— С. 529–537.
2. Hogan B., Constantini F. Manipulation the mouse embryo // N.Y. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor.— 1986.— P. 279.
3. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих // Л.: Наука.— 1988.— 234 с.
4. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature.— 1981.—292.— P. 154–156.
5. Brook F.A., Gardner R.L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1997.— Vol.94.— P.5709–5712.
6. Robertson E., Bradley A. Production of permanent cell lines from early embryos and their use in studying developmental problems // Experimental approaches to mammalian embryonic development // Cambridge: Cambridge University Press.— 1986.— P. 108–112.
7. Лонда З., Госсрай П., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы // М.: Мир.— 1982.— 278 с.
8. Wobus A.M., Holshausen H. Characterization of pluripotent stem cell line derived from mouse embryo // Exp. Cell.— 1984.— Vol.152.— P. 212–219.
9. Nagy A., Rossant J. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // PNAS —1993.— Vol.9.— P. 8424–8428.
10. Stojkovic M., Loko M., Stojkovich P., Stevart R., Evans J. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recaptured after three step *in vitro* culture // Stem Cells.— 2004.— 22.— P. 790–797.

## Резюме

В работе представлены результаты изучения поведения мышиных бластоцист при длительном культивировании в определенных условиях на слое митомицин С инактивированных мышиных фибробластов (MIF). Для поддержания плюрипотентного состояния ES-клеток в культуре в среду, добавляли LIF (лейкемия ингибирующий фактор). Цитохимическим окрашиванием по Гомори выявлена высокая активность щелочной фосфатазы в мышиных ES-клетках.

В роботі представлені результати вивчення поведінки бластоцисти миші при довготривалому культивуванні у визначених умовах на шарі інактивованих митомицином С фібробластів миші (MIF). Для підтримання плюрипотентного стану ES-клітин в середовище додавали LIF (лейкемія інгубуючий фактор). Цитохімічним забарвленням за Гоморі виявлена висока активність лужної фосфативи у ES-клітинах миші.

Results of the mouse blastocyst behaviour study during their long-time cultivation under definite conditions on the layer of mytomicin C — inactivated mouse fibroblasts (MIF) are presented in the article. To support pluripotent state of ES cells in culture, LIF (leukemia ingibitor factor) has been added to the medium. High alkaline phosphatase activity has been revealed in mouse ES cells by cytochemical Homori staining.

**ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
вул. акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна  
e-mail: m.v.dybkov@imb.org.ua*

## **ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЇ V617F В ГЕНІ *jak2* ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗМИ ЗА ДОПОМОГОЮ T-ARMS ПЛР**

Однією з головних відмінностей нової, четвертої ревізії класифікації та діагностичних критеріїв ВОЗ є використання при постановці діагнозів генетичних маркерів. Зокрема, згідно цього документу генетичні маркери мають використовуватись і при діагностиці мієлопроліферативних неоплазм [1] — гетерогенної групи неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. Згідно останньої ревізії до мієлопроліферативних неоплазм відносять: хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофільну лейкемію, справжню поліцитемію, ідіопатичний мієлофіброз, есенціальну тромбо-цитемію, хронічну еозинофільну лейкемію, мастоцитоз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, некласифіковані. Введенню генетичних маркерів у діагностичну практику при мієлопроліферативних неоплазмах передували кілька відкриттів. Відомо, що донедавна лише для ХМЛ було описано чіткий цитологічний маркер — філадельфійську хромосому, та відповідний молекулярний маркер — злитий ген *bcr/abl*. Але в 2005 році одночасно кілька груп