

Науковий журнал Президії
АМН України

**Том 16, додаток,
2010**

Заснований у липні 1995 р.

**ЖУРНАЛ
АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК
УКРАЇНИ**

Виходить 4 рази на рік

Київ

Національна академія медичних наук України
Міністерство охорони здоров'я України
Державна установа
"Інститут генетичої та регенеративної медицини НАМН України"

Науково-практична конференція з міжнародною участю

**ГЕНЕТИЧНА
І РЕГЕНЕРАТИВНА МЕДИЦИНА:
ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ**

ТЕЗИ

Київ, 14-15 жовтня 2010 р.

ОРГАНІЗАЦІЙНИЙ КОМІТЕТ

Співголови Акад. О. Ф. Возіанов
Акад. НАМН України Г. М. Бутенко

Секретар Д.м.н. С. М. Новікова

Члени оргкомітету

Акад. В. І. Грищенко, акад. А. М. Гольцев, акад. НАМН України В. М. Запорожан, акад. НАМН України В. А. Кордюм, чл.-кор. НАМН України Ю. В. Вороненко, чл.-кор. НАМН України Н. Г. Горовенко, чл.-кор. НАМН України О. Я. Гречанина, чл.-кор. НАМН України В. К. Гринь, чл.-кор. НАМН України Є. Г. Педаченко, чл.-кор. НАМН України В. І. Цимбалюк, проф. Н. М. Білько, проф. В. М. Ільїн, проф. В. О. Кашуба, проф. Г. В. Коробейніков, проф. Г. Г. Скибо, д.б.н. Ж. М. Мінченко, д.м.н. І. С. Нікольський, д.м.н. А. Г. Попандопуло, к.б.н. С. В. Подольська, к.м.н. Р. В. Салютін, к.м.н. М. Д. Чеботарьов

СПІВОРГАНІЗАТОРИ

Національний університет фізичного виховання та спорту України
Міжнародний центр наукової культури "Всесвітня лабораторія"

ОРГАНІЗАЦІЙНИЙ КОМІТЕТ КОНФЕРЕНЦІЇ ВИСЛОВЛЮЄ ПОДЯКУ ЗА СПОНСОРСЬКУ ДОПОМОГУ ТАКИМ ФІРМАМ:

Представництво Vecton Dickinson Biosciences,
ТОВ "ALSI"
ТОВ "Біолайн-Україна"
ТОВ "Неоген"
ТОВ "ÖKO-MED GmbH
ТОВ "Медична клініка "ІННОВАЦІЯ"



ЗМІСТ

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ НОВОЇ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ 4VL6 ПРИ ТРИВАЛОМУ КУЛЬТИВУВАННІ У СТАНДАРТНИХ УМОВАХ <i>IN VITRO</i> Акопян Г. Р., Гулеюк Н. Л., Вавіліна І. В., Яцишина А. П., Підпала О. В., Рубан Т. П., Лукаш Л. Л.	11
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА С РАННИМ ОЖИРЕНИЕМ Аксенова Е. А., Наумович Н. И., Солнцева А. В., Сукало А. В., Даниленко Н. Г.	13
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТ ВЫЯВЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ Аксенова Е. А., Сильванович А., Михайловская А., Солнцева А. В., Забаровская З. В., Забаровская О., Дударева Н. И., Вязова Л. В., Лагун М., Даниленко Н. Г.	14
ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В СПОРТЕ Ахметов И. И.	16
РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ БИОПСИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БЛАСТОМЕРОВ У ДООИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ <i>IN VITRO</i> Бараши А. А.	18
ПРЕДИКТИВНАЯ МЕДИЦИНА В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ Бебешко В. Г., Кучер Е. В., Минченко Ж. Н., Дмитренко Е. А., Дмитренко И. В.	19
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ <i>ASP299GLY TOLL-LIKE</i> -РЕЦЕПТОРОВ 4 ТИПА И СОСТОЯНИЕ МУКОЗАЛЬНОГО АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА ФОНЕ ГАСТРОЭНТЕРОПАТИИ Белоглазова К.В.	21
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ МУТАЦІЙ C282Y ТА H63D ГЕНА СПАДКОВОГО ГЕМОХРОМАТОЗУ (<i>HFE</i>) Білевич О. Б., Макух Г. В., Кенс О. В., Акопян Г. Р.	22
ЕМБРІОНАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ЇХ ПОТЕНЦІАЛ ДО ПРОЛІФЕРАЦІЇ І ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i> Білько Н. М., Білько Д. І., Бараши О. О.	24
ЗДАТНОСТІ ДО ПРОЛІФЕРАЦІЇ І ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ АС 133 ⁺ -КЛІТИН, ВИЛУЧЕНИХ ІЗ КОРДОВОЇ КРОВІ, У ДОВГОТРИВАЛІЙ КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i> Білько Д. І., Василовська С. В., Білько Н. М., Борбуляк І. З.	26
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ВОССТАНОВ- ЛЕНИЯ МЕЖКОРНЕВЫХ ПЕРЕГОРОДОК ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ Боброва Н. А, Богашова Л. Я, Ярынич-Бучинская Н. П., Куценко Н. Л., Скрипников П. Н., Кайдашев И. П.	27
ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХВОРИХ З РІЗНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ Болтіна І. В., Джоган М. Ю., Грідіна Н. Я., Хиль В. Ю.	29
”ЭФФЕКТЫ СВИДЕТЕЛЯ” В РАДИОБИОЛОГИИ: ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВЕРСИЯ Вайсерман А. М.	31
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ НА КОЛЛАГЕНОВОМ СУБСТРАТЕ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И СЕЛЕКЦИИ РЕДКИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Васильев Р. Г., Кирик В. М., Кучук О. В.	32
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ В ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЕ ВРАЧА-ГЕНЕТИКА Васильева И. Ю., Романенко О. П., Готов О. С.	34

РАСЧЕТНОЕ КОЛИЧЕСТВО ПУЛА КЛЕТОК СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ХОРИОГОНИЧЕСКИЙ ГОНАДОТРОПИН, В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ЭМБРИОГЕНЕЗА <i>Веропотвелян Н. П., Кодунов Л. А.</i>	36
СТВОРЕННЯ БІОАФІННОГО СОРБЕНТУ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ <i>Горбатюк О. Б., Цапенко М. В.</i>	37
ВІКОВІ ЗМІНИ КЛІТИННОГО СКЛАДУ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ <i>Горностаї К. П., Кучук О. В., Лабунець І. Ф.</i>	38
АНАЛІЗ ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ, ЗАДІЯНИХ У МЕТАБОЛІЗМІ ЛІКІВ, ЩО ПРИЗНАЧАЮТЬ ХВОРИМ НА ГІПЕРТОНІЧНУ ХВОРОБУ <i>Горовенко Н. Г., Подольська С. В., Россоха З. І., Левкович Н. М., Долженко М. М.</i>	40
ИЗУЧЕНИЕ ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННЫХ СВЯЗЕЙ РАЗВИТИЯ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА В ХАРЬКОВСКОМ РЕГИОНЕ <i>Гречанина Ю. Б., Снарская М. В., Алиева Т. Д.</i>	41
ЛЕЧЕНИЕ РЕФРАКТЕРНОЙ СТЕНОКАРДИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВИХ КЛЕТОК <i>Гринь В. К., Эстрин С. И., Попандопуло А. Г., Кравченко Т. В., Денисова Е. М., Сергиенко Н. В.</i>	43
ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ СУМІШІ НА ЖИТТЄВІ ПАРАМЕТРИ МИШЕЙ ВИСОКО РАКОВОЇ ЛІНІЇ <i>Гулько Т. П., Лихачова Л. І.</i>	45
ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МЫШИНЫХ БЛАСТОЦИСТ НА РАННИХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>Гулько Т. П., Дерябина Е. Г., Рубан Т. А., Сухорада Е. М., Андриенко В. И., Маслова О. А., Рымарь С. Е., Лихачева Л. И.</i>	46
МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У МЫШЕЙ <i>Гулько Т. П., Топорова Е. К., Шпилева С. П., Бойченко Ю. В., Кордюм В. А.</i>	48
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ У ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ: АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ <i>Даниленко Н. Г., Синявская М. Г., Левая-Смоляк А. М., Олейник О. А., Меркулова Е. П., Давыденко О. Г.</i>	50
МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ПУПОВИНИ: ВИДЛЕННЯ ТА МУЛЬТИПЛІКАЦІЯ EX VIVO <i>Дерябіна О. Г., Сухорада О. М., Маслова О. О., Шпильова С. П., Рубан Т. О., Шувалова Н. С., Андрієнко В. І., Жукова С. М., Кордюм В. А.</i>	52
ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ИМАТИНИБОМ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОБЛАСТНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ <i>Дмитренко И. В., Минченко Ж. Н., Дягиль И. С., Федоренко В. Г.</i>	53
ВПЛИВ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА TP53 І ГЕНА ХЕМОКІНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR5 НА РИЗИК ВИНИКНЕННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У ЖІНОК З УКРАЇНИ <i>Довженко С. П., Подольська С. В., Горовенко Н. Г.</i>	55
ЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВАКЦИНАЦІЇ <i>Задорожна В. І., Фролов А. Ф., Мойсєєва Г. В.</i>	57
МОЖЛИВОСТІ СПРЯМОВАНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ МЕТОДАМИ КЛІТИННИХ ТА ЦИТОКІНОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ <i>Запорожан В. М., Холодкова О. Л.</i>	59
КЛІТИННА ТЕРАПІЯ КІСТКОВИХ ПЕРЕЛОМІВ З ПОРУШЕНИМИ ПРОЦЕСАМИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ <i>Зубов Д. О., Мовчан О. С.</i>	60

АНТИГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ТЕРБИНАФИНА В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНОК <i>CANDIDA ALBICANS</i> <i>Иванова Н. Н.</i>	62
УЛУЧШЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК В КАРДИОМИОЦИТЫ <i>Иванюк Д. И., Сарич Т., Попандопуло А. Г., Хешелер Ю., Гринь В. К.</i>	63
ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В СПОРТЕ <i>Ильин В. Н., Дроздовская С. Б.</i>	65
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЗАНЯТИЯМ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ СПОРТА <i>Ильин В. Н., Досенко В. Е., Дроздовская С. Б.</i>	68
СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АКФ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ КОНЬКОБЕЖЦЕВ <i>Ильюттик А. В., Гилеп И. Л., Рубченя И. Н.</i>	70
ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ <i>TLR2 ARG753GLN</i> ТА <i>TLR4 ASP299GLY, TNR399ILE</i> ПРИ УРОГЕНІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЯХ <i>Ізмайлова О. В., Шликова О.А., Кайдашев І. П.</i>	72
СВЯЗЬ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА ППАР γ 2 И НАРУШЕНИЯМИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА <i>Кайдашев И. П., Куценко Л. А., Шлыкова О. А., Беркало Л. В., Солохина И. Л., Веснина Л. Э., Смирнова И. П., Горбась И. М.</i>	74
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА <i>Квитко О. В., Конева И. И., Шейко Я. И., Балащенко Н. А., Сапун А. С., Дромашко С. Е.</i>	75
ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ФРАКЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН АБО <i>LIN⁻SCA-1⁺C-KIT⁺</i> -ГЕМАТОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ІЗ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ <i>Кирик В. М., Родніченко А. Є., Кучук О. В.</i>	77
ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ <i>G308A</i> ГЕНА <i>TNF-α</i> НА РОЗВИТОК ТЯЖКОЇ ПЕРІНАТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ У НОВОНАРОДЖЕНИХ <i>Кир'яченко С. П., Россоха З. І., Горovenко Н. Г.</i>	79
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОКОРРЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕОНЕКРОЗОМ <i>Климова Е. М., Вотякова И. Л., Шакина Л. А.</i>	81
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ <i>Ковальчук М. В., Гулько Т. П.</i>	83
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ТКАНЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ <i>Козлов В. А., Петровский Я. Л., Шевела Е. Я., Черных Е. Р., Останин А. А.</i>	84
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ЯК МОДЕЛЬНИЙ ОБ'ЄКТ ПРИ ВИВЧЕННІ ЗАЛЕЖНИХ ВІД ВІКУ ПАТОЛОГІЙ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ <i>Коляда О. К., Куценко К. Ю., Хилобок І. Ю., Вайсерман О. М.</i>	86
БИОТЕХНОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА <i>Кордюм В. А.</i>	87
ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>ACE</i> НА ФИЗИЧЕСКУЮ ПОДГОТОВЛЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНА <i>Коробейников Г. В., Тронь Р. А.</i>	89

ОСОБЛИВОСТІ ОСТЕОГЕННОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЗА УМОВИ ПОШКОДЖЕННЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ТА КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ <i>Кучук О. В., Лабунець І. Ф.</i>	90
ФАКТОРИ ЕПІФІЗА ТА ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ: МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ВПЛИВУ <i>Лабунець І. Ф.</i>	92
ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ІНТАКТНИХ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ ТА ЗА УМОВ СТРЕСОВОГО ВПЛИВУ <i>Лабунець І. Ф., Родніченко А. Є., Кучук О. В.</i>	94
КЛІТИННИЙ СКЛАД КІСТКОВОГО МОЗКУ У ТИМЕКТОМОВАНИХ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ <i>Лабунець І. Ф., Родніченко А. Є., Кучук О. В., Кирик В. М.</i>	96
ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ НА ІШЕМІЧНЕ ПОШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ <i>Лабунець І. Ф., Родніченко А. Є., Кирик В. М., Кучук О. В., Под'яченко О. В., Цуриков О. М., Васильєв Р. Г., Літошенко З. Л., Горностаї К. П., Резнік О. Ю., Стратійчук Т. Р., Побережний П. А.</i>	98
ВПЛИВ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ЕПІФІЗА ТА ТИМУСА ПРИ ІШЕМІЧНОМУ ПОШКОДЖЕННІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ <i>Лабунець І. Ф., Цуриков О. М., Кирик В. М., Кучук О. В., Півнева Т. А., Скибо Г. Г., Бутенко Г. М.</i>	100
ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫС <i>Лебединский А. С., Сукач А. Н., Оченашко О. А., Петренко А. Ю.</i>	102
МОЖЕТ ЛИ МАТЕРИНСКИЙ ГЕНОТИП ОКАЗЫВАТЬ ВЛИЯНИЕ НА ВЕРОЯТНОСТЬ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ У ДЕТЕЙ? <i>Левданский О. Д., Голоенко И. М., Синявская М. Г., Даниленко Н. Г., Обьедков В. Г.</i>	104
ЧАСТОТА РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНОТИПІВ ЗА АЛЕЛЬНИМ ВАРІАНТОМ *4 ГЕНА СУР2D6 У НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ <i>Левкович Н. М., Россоха З. І., Горovenko Н. Г.</i>	105
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ <i>Лисяний Н. И.</i>	106
КЛІТИННИЙ ТЕСТ ЗА ЗМІНАМИ МСК ПРИ ЇХ ПАСАЖУВАННІ <i>Лихачова Л. І., Рубан Т. А., Сухорада О. М., Дерябіна О. Г. Кордюм В. А.</i>	107
ВЛИЯНИЕ ЛЕЙКЕМИЯИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА СИНТЕЗ ГЕМА В СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ <i>Лобанок Е. С., Василевич И. Б.</i>	108
ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ КЛІТИННОЇ КАРДІОМОПЛАСТИКИ <i>Лукаш Л. Л.</i>	110
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ СУР1A1, GSTM1 У БОЛЬНЫХ ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ И С ПАРАЗИТАРНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ <i>Лукманова Л. И., Кочетова О. В., Викторова Т. В.</i>	112
ПЕРСПЕКТИВЫ КОРРЕКЦИИ СХЕМ ХИМИОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЭНЗИМА O6-АЛКИЛГУАНИН-ДНК-АЛКИЛТРАНСФЕРАЗЫ <i>Лыло В. В., Шапошник Л. А., Лукаш Л. Л.</i>	114
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУСПЕНЗИИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МОЗГА ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС <i>Ляшенко Т. Д., Шевченко М. В., Сукач А. Н.</i>	115
РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ ПОТЕНЦИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА <i>Мальшикина С. В., Костицкая О. М., Вишнякова И. В., Никольченко О. А.</i>	117

ВПЛИВ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ВАРТОНІВСЬКОГО ГЕЛЮ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ У ПАСАЖАХ <i>Маслова О. О., Дерябіна О. Г., Жукова С. М., Кордюм В. А.</i>	119
ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ СХИЛЬНОСТІ ДО РОЗВИТКУ АКУШЕРСЬКОЇ ПАТОЛОГІЇ ТА ВРОДЖЕНИХ ВАД ПЛОДА <i>Микитенко Д. О., Тимченко О. І.</i>	121
ІМУНОГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ ЯК ЧИННИКИ ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ ТА ЕФЕКТИВНОСТІ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СЛОВ'ЯНСЬКИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН У ХВОРИХ З ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ <i>Мінченко Ж. М., Дмитренко О. О., Шляхтиченко Т. Ю., Дягіль І. С., Хоменко В. І.</i>	123
НОВА СТРАТЕГІЯ ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ ПРОТИ ПОВЕРХНЕВИХ КЛІТИННИХ АНТИГЕНІВ НА ПРИКЛАДІ БІОМАРКЕРА CD34 ЛЮДИНИ <i>Ніколаєв Ю. С., Горбатюк О. Б.</i>	125
ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СИНГЕННИХ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ, СТИМУЛЬОВАНИХ КОНТАКТОМ ІЗ МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ТИМУСА, НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ОПРОМІНЕНИХ ТВАРИН <i>Нікольський І. С., Нікольська В. В., Зубов Д. О., Тарануха Л. І., Галицька С. М., Лисиця Н. А., Семенова Я.-М. О., Федорчук О. Г., Толерова О. Ю.</i>	126
ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА АПОЛІПОПРОТЕЇНУ Eε4 З КОГНІТИВНИМИ ПОРУШЕННЯМИ У БОКСЕРІВ З ЧЕРЕПНО- МОЗКОВИМИ ТРАВМАМИ <i>Новикова С. М., Муравський А. В., Пишель І. М.</i>	127
КЛОНУВАННЯ ФАКТОРА СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН SDF-1A ЛЮДИНИ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЙОГО СИНТЕЗ У КЛІТИНАХ E. COLI <i>Окунев О. В., Константинова Г. О., Похолоенко Я. О., Іродов Д. М., Кордюм В. А.</i>	129
СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ В УКРАЇНІ <i>Ольхович Н. В., Пічкур Н. О., Недобой А. М., Грищенко О. М., Іванова Т. П., Горovenко Н. Г.</i>	131
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ КРИТЕРІЇ ПОРУШЕННЯ ФОЛАТНОГО ОБМІНУ У ДІТЕЙ З КОГНІТИВНИМИ РОЗЛАДАМИ <i>Ольхович Н. В., Россоха З. І., Кир'яченко С. П., Пічкур Н. О., Подольська С. В., Горovenко Н. Г.</i>	133
СИНТЕЗ ІНТЕРФЕРОНУ ЛІМФОЦИТАМИ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПРОБІОТИКІВ ТА ІНГІБІТОРА ПРОТОНОВОЇ ПОМПИ <i>Остапченко Л. І., Нікольська В. В., Короткий О. Г., Пилипенко С. В., Нікольський І. С.</i>	135
ВПЛИВ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ЗАГОСННЯ СТРЕСОВИХ ВИРАЗОК <i>Остапченко Л. І., Нікольський І. С., Галицька С. М., Зубов Д. О., Тарануха Л. І., Нікольська В. В., Семенова Я.-М. О., Лисиця Н. А.</i>	136
КОРРЕКЦІЯ ПЕЧЕНОЧНОЇ НЕДОСТАТОЧНОСТІ РІЗЛИЧНОЇ ЕТІОЛОГІЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ КРИОКОНСЕРВІРОВАННИХ АЛЛОГЕННИХ КЛІТОК ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧЕНИ <i>Оченашко О. В., Лебединский А. С., Сукач А. С., Петренко А. Ю.</i>	137
ІМУНОРЕАГЕНТИ, СТВОРЕНІ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНИХ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ <i>Павлова М. В.</i>	139

МУЛЬТИЛИНЕЙНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ МОНОСЛОЙНОМ И ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Волкова Н. А., Скоробогатова Н. Г., Правдюк А. И., Иванов Р. В., Лозинский В. И.</i>	141
ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ <i>Петренко Ю. А., Петренко А. Ю., Мазур С. П., Блох К., Варди П.</i>	143
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА <i>Петренко Ю. А., Петренко А. Ю., Ревенко Е. Б., Скоробогатова Н. Н., Волкова Н. А.</i>	145
ДОСВІД ВИКОРИСТАННЯ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ ЗМІН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ <i>Піскун І. І.</i>	146
МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ <i>Піскун Р. П., Мрих Н. М., Білошицька А. В.</i>	148
ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ПРОГЕНІТОРНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ В ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ІШЕМІЮ КІНЦІВОК (результати першого року клінічного дослідження) <i>Поляченко Ю. В., Салютін Р. В., Паляниця С. С.</i>	150
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСТЕОРЕПАРАТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПУЛОВ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ <i>Попандопуло А. Г., Буше В. В., Оксимец В. М., Оберемко А. В.</i>	152
ІНЖЕНЕРІНГ ТРИВИМІРНОЇ ПРЕОСТЕОГЕННОЇ ТКАНИНИ <i>Попандопуло А. Г., Оберемко А. В., Оксимец В. М., Буше В. В.</i>	153
ДЕВИТАЛИЗАЦИЯ ТКАНЕЙ КСЕНОГЕННЫХ СЕРДЕЧНЫХ КЛАПАНОВ <i>Попандопуло А. Г., Петрова М. В., Мокрик И. Ю., Салахова А. М.</i>	154
РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДО СТВОРЕННЯ БІОДЕГРАДАБЕЛЬНИХ МАТРИКСІВ ІЗ КОЛАГЕНУ І І ТИПУ КУРЧАТИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ОДЕРЖАНИХ ІЗ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ <i>Похоленко Я. О., Рачкова Л. Т., Рубан Т. О., Сухорада О. М., Величко С. П., Штильова С. П.</i>	155
ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ПРОЦЕССА ПОДГОТОВКИ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ НА ОСНОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА (НА ПРИМЕРЕ ГЕНА АКФ) <i>Рыбина И. Л., Михеев А. А., Гилеп А. А.</i>	157
КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА LIF ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ <i>Рымарь С. Е., Рубан Т. А., Сухорада Е. М., Базалий А. В., Иродов Д. М., Кордюм В. А.</i>	159
ВПРОВАДЖЕННЯ ЕТАЛОННИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ ТА СТРЕПТОКОКІВ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ <i>Сахнюк О. М., Настояща Н. І.</i>	161
ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИММУННОГО СТАТУСА ЛЮДЕЙ С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ <i>Серебровская Т. В., Никольский И. С., Ищук В. А., Никольская В. В., Тарануха Л. И., Кирик В. М., Галицкая С. Н.</i>	163
РЕАКЦІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ НА ГОСТРУ ГІПОКСІЮ <i>Серебровська Т. В., Нікольський І. С., Іщук В. А., Нікольська В. В., Тарануха Л. І., Кирик В. М., Галицька С. М.</i>	164

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО РОЗРОБКИ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ОСНОВІ КСЕНОГЕННИХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ БІЛКІВ <i>Симчич Т. В., Караман О. М., Дідківська Л. П., Діденко Г. В., Воєйкова І. М., Потебня Г. П.</i>	166
КРАТКОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПУТЬ СТАНДАРТИЗАЦИИ И УНИФИКАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК <i>Сукач А. Н.</i>	168
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА <i>Топорова Е. К., Гулько Т. П., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Шпилевая С. П., Иродов Д. М., Моргунов П. В., Кордюм В. А.</i>	170
ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ СПОНТАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ <i>Турчин В. В., Хешелер Ю., Попандопуло А. Г., Гринь В. К., Спитковский Д.</i>	172
НЕКОТОРЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭМБРИОЛОГИИ И ПЕРИНАТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ <i>Харченко Т. В., Мурзакматов М. А.</i>	174
ІМУНОКОН'ЮГАТИ НА ОСНОВІ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ ТА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ <i>Цапенко М. В., Горбатюк О. Б., Николаев Ю. С., Павлова М. В.</i>	176
ЗАСТОСУВАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ВІКОВИХ ЗМІН ШКІРИ ОБЛИЧЧЯ <i>Цепколенко В. О., Холодкова О. Л., Нескоромна Н. В., Єрофеева О. В.</i>	177
ИЗУЧЕНИЕ <i>IN VITRO</i> ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ПИЛОЦИТАРНОЙ АСТРОЦИТОМЫ И МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ И ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ <i>Чернов А. Н., Талабаев М. В., Григорьев Д. Г., Калюнов В. Н., Кульчицкий В. А.</i>	179
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ <i>Черных Е. Р., Шевела Е. Я., Сахно Л. В., Тихонова М. А., Старостина Н. М., Останин А. А.</i>	181
АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ФОЛАТНОГО ОБМІНУ ТА ГЕМОСТАЗУ ПРИ МУЛЬТИФАКТОРНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ЛЮДИНИ <i>Чорна Л. Б., Акопян Г. Р., Макух Г. В., Могиляк О. І., Пацкун Е. Й., Заверуха О. Я., Федорик І. М., Заставна Д. В.</i>	183
ФОРМУВАННЯ СЕРЕД ВАГІТНИХ ГРУПИ РИЗИКУ НАРОДЖЕННЯ ДИТИНИ З ВРОДЖЕНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ <i>Шапошнікова В. М.</i>	185
ОРГАНІЗАЦІЯ БЕЗПЕРЕРВНОГО ПРОФЕСІЙНОГО НАВЧАННЯ ФАХІВЦІВ ІЗ ЛАБОРАТОРНОЇ ГЕНЕТИКИ <i>Шейко Л. П., Подольська С. В., Бришевац Л. І., Євсєєнкова О. Г., Горovenko Н. Г.</i>	186
ВИВЧЕННЯ РОЗПОВСЮДЖЕНОСТІ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ОБМІНУ ХОЛЕСТЕРИНУ В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ <i>Шликова О. А., Ізмайлова О. В., Кайдашев І. П.</i>	188
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК <i>Шпилевая С. П., Андриенко В. И., Рубан Т. А., Сухорада Е. М., Дерябина Е. Г.</i>	189
КУЛЬТИВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОГО КАНАТИКА ЛЮДИНИ ПРИ ЗНИЖЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ КИСНЮ <i>Шувалова Н. С., Дерябіна О. Г., Жукова С. М., Сорока М. П.</i>	191
ТРАНСПЛАНТАЦІЯ АМНІОТИЧНОЇ ОБОЛОНКИ ЯК МЕТОД СТИМУЛЯЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ЗВИРАЗКУВАНЬ РОГІВКИ ПІСЛЯ ТЯЖКИХ ОПІКІВ ОЧЕЙ <i>Якименко С. А., Бузник О. І.</i>	192

ИНТЕРЛЕЙКИН-18 И ИНТЕРЛЕЙКИН-18-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ТЕСТАХ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> (перспективы клинического применения) <i>Якушенко Е. В., Лопатникова Ю. А., Сенников С. В., Козлов В. А.</i>	193
STEM CELL THERAPY FOR EVERYONE: VISION OR ILLUSION? <i>Bader A.</i>	194
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS <i>Copray S.</i>	195
PROLIFERATIVE ACTIVITY OF BONE MARROW CELLS IN MICE AFTER TRANSPLANTATION OF MONONUCLEAR CELLS FRACTION OR <i>LIN(-)SCA-1(+)</i> <i>C-KIT(+)</i> HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM BONE MARROW AND FETAL LIVER <i>Кырк V., Rodnichenko A., Kuchuk O.</i>	196
POLYMORPHISM OF METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE AND THIOL STATUS IN HUMAN PLACENTA AFTER PREGNANCY WITH PREECLAMPSIA <i>Martseniuk O.P., Mislánová C., Obolenskaia M. Yu.</i>	198
<i>IN SILICO</i> SEARCH OF POTENTIAL FUNCTIONAL SITES WITHIN THE <i>MUS</i> <i>MUSCULUS O⁶-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE</i> GENE PROMOTERS <i>Samoilenko I. O., Yatsyshyna A. P., Pidpala O. V., Lukash L. L.</i>	199
GENETIC ALTERATIONS IN CULTURED POPULATIONS OF MOUSE EMBRYONIC GERM CELLS <i>Yatsyshyna A. P., Kushniruk V. O., Grypych O. A., Pidpala O. V., Lukash L. L.</i>	201
АВТОРСЬКИЙ ПОКАЖЧИК	202

Електронну версію журналу розміщено на сайті www.amnu.gov.ua

Редактор *В. В. Панюков*

Адреса редакції
04114, Київ 114, вул. Вишгородська, 67,
Інститут геронтології АМН України.
Тел.: (044) 431 0568, факс: (044) 432 9956
E-mail: jamnua@geront.kiev.ua

Здано до набору 09.09.2010. Підп. до друку 14.09.2010. Формат 70 × 100/16.
Офсетний друк. Друк. арк. 18,1. Обл.-вид. арк. 17,9. Зам. 30/1.
ТОВ "Велес", 03057 Київ, вул. Е. Потье, 14

© АМН України, 2010

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ НОВОЇ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ 4BL6 ПРИ ТРИВАЛОМУ КУЛЬТИВУВАННІ У СТАНДАРТНИХ УМОВАХ *IN VITRO*

Г. Р. Акопян*, Н. Л. Гулеюк, І. В. Вавіліна, А. П. Яцишина,
О. В. Підпала, Т. П. Рубан, Л. Л. Лукаш

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ,

*ДУ “Інститут спадкової патології НАМН України”, Львів

Проведено порівняльний аналіз ступеня плоїдності і спектру хромосомних аномалій в популяціях клітин людини лінії 4BL6 на 160 і 205 пасажах *in vitro*. Клітини 4BL6 одержані з периферійної крові донору і переведені в умови стандартної моношарової культури. Клітини культивувались у живільному середовищі ДМЕМ із доданням 10 % ембріональної сироватки теляти. Протягом усього часу спостереження (219 пасажів) клітини зберігали фібробластоподібну морфологію, чутливість до дії колхіцину та проліферативний потенціал. Застосовано стандартний аналіз каріотипу на основі диференційного забарвлення GTG та акридиновим помаранчевим. Від 160 до 205 пасажу у 6 разів зростає питома вага поліплоїдних клітин із вмістом 80–85 хромосом (5 % і 30 %, відповідно), удвічі — біядиплоїдних клітин із вмістом 42–44 хромосом (62,3 % і 33 %). Усе це відбулося на фоні істотного обмеження відтворення клітин із вмістом 14–37 хромосом (21,7 % і 8,8 %), явища пульверизації хромосомного набору (2,8 % і 1 %), а також повного передчасного розділення сестринських хроматид метафазних хромосом (5 % і 3 %, відповідно). Загалом, розподіл за ступенем плоїдності клітин 4BL6 на 205 пасажі становив 6,6 : 3,7 : 1 між клітинами з біядиплоїдним (38–45 хромосом у 93,3 % метафаз), поліплоїдним (80–85 хромосом) і біягаплоїдним (14–29 хромосом) набором хромосом.

Визначено типові анеуплоїдії та структурні хромосомні перебудови на 205 пасажі. Серед хромосом групи А регулярно реєструвалися 3 хромосоми 1 пари (1 — нормальна, 1 — $t(1;11)(q12;p15)$, 1 — $del 1q21$), а також моносомія за 2 хромосомами і нормальний комплект 3 пари. У групі В мала місце регулярна моносомія за 4 хромосомами і часте залучення 5 хромосоми у специфічну транслокацію $t(5;15)(q10;q10)$. У групі С відносно стабільністю числа і конституції відзначаються хромосоми 6, 7, 8, 9 пар. Регулярну моносомію демонструють X, 10, 11 хромосоми, причому часто відсутні обидва гомологи 10 пари. Одна із хромосом 11 пари завжди залучена у транслокацію з 1 хромосомами — $t(1;11)q12;p15$. Відносно часто зустрічається транслокація 12 і 15 хромосом — $t(12;15)(p10;q10)$. Найбільш стабільними ознаками групи D виявились редукція хромосом 13 пари до повної відсутності в каріотипі, збереження двох нормальних гомологів 14 пари, моносомія за 15 хромосомами та її регулярне залучення у транслокацію із 12 хромосомами. У групі E одна із хромосом 16 пари знаходиться у транслокації з 21 хромосомами — $t(16;21)$

($q13;p11$), поряд з чим спостерігалася регулярна моносомія за 17 хромосоною і нормальний комплект 18 пари. Група F була представлена обома гомологами 19 і 20 хромосомних пар, що не виключає можливості моносомії за 19 хромосоною у зв'язку з регулярною реєстрацією подібного до неї маркера ("типу F з гетерохроматином"). Типовими рисами групи G виявились регулярна моносомія за 21 хромосоною із залученням другого гомолога у транслокацію з 16 хромосоною в усіх досліджених клітинах: $t(16;21)(q13;p11)$. На 205 пасажі зареєстровано часту появу 4 маркерних хромосом: 1) довгої акроцентричної хромосоми типу $Dq+$ у 20 % метафаз, 2) субметацентричної хромосоми "типу C ", 3) метацентричної хромосоми "типу F з гетерохроматином", яка маскується під 19 хромосому, 4) метацентричної хромосоми "типу F без гетерохроматину". Згадані маркерні хромосоми вірогідно є результатом складних перебудов із залученням декількох хромосом, і їх ідентифікація потребує застосування багатоколірного *FISH*-аналізу.

Виявлені нами істотні відмінності хромосомного набору клітин на 160 і 205 пасажах можна розцінювати як ознаки прогресуючої трансформації при становленні нової клітинної лінії 4BL6 у культурі. У той же час, зменшення частки білягаплоїдних клітин та відсотка пульверизації (фрагментації) хромосомного набору від 160 до 205 пасажу свідчить про певну стабілізацію клітинної лінії при стандартному культивуванні *in vitro*.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА С РАННИМ ОЖИРЕНИЕМ

Е. А. Аксенова, Н. И. Наумович, А. В. Солнцева*, А. В. Сукало*,
Н. Г. Даниленко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск,

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск

В настоящее время детское ожирение рассматривается как серьезная социально-экономическая и медицинская проблема, значение которой определяется эндокринными и метаболическими осложнениями, ведущими к повышению заболеваемости и смертности у взрослых. Два последних десятилетия характеризуются значительным увеличением распространенности избыточной массы тела среди детей и подростков в индустриально развитых странах. Многие аспекты патогенеза ожирения у детей остаются дискуссионными. В общей популяции ожирение является заболеванием с полигенным типом наследования. В 1994 г. была впервые опубликована генетическая карта ожирения “*Human Obesity Gene Map*”. Она постоянно пополняется и включает в себя в настоящее время 189 генов, 25 из которых наиболее доказательно связаны с ожирением (Rankinen et al., 2006).

Целью исследования является оценка вклада генотипа человека и выделение наиболее значимых полиморфных аллелей, участвующих в формировании массы тела и развитии ожирения у детей. Проведено генотипирование 50 детей с ранним ожирением (до 7 лет) по пяти полиморфным локусам генов: Q223R-локусу (rs1137101) в экзоне 6 гена рецептора лептина (*LEPR*); G-174C-полиморфному локусу (rs1800795) в промоторе гена интерлейкина 6 (*IL-6*); A-23HphI (*rs689*)-полиморфизму в 3'-последовательности интрона 1 гена инсулина (*INS*); G-308A-полиморфизму (rs1800629) в промоторной области гена фактора некроза опухоли (*TNF- α*); G-11391A- полиморфизму (rs17300539) в промоторной области гена адипонектина (*ADIPOQ*).

Вызывает интерес частота регистрации генотипов по *ADIPOQ*: редкий генотип — 11391AA — встречался у девочек (4,8 %) и не обнаружен ни у одного из мальчиков, однако из-за низкой частоты (менее 5 %) не удалось посчитать статистическую значимость данных различий. 93,9 % детей имеют 11391GG *ADIPOQ*-генотип. AA-23HphI-генотип гена инсулина, связанный с инсулинорезистентностью, встречается у 65,2 % обследованных детей. По нашим данным, популяционная частота этого генотипа в белорусской популяции составляет 51,2 %. Не обнаружено детей с генотипом -308AA гена *TNF- α* , а гетерозиготных носителей аллеля A было более чем в два раза больше ($P < 0,05$) среди мальчиков (52,4 %), чем среди девочек (24 %). Мы обнаружили более высокую частоту встречаемости AA223(QQ)-генотипа гена *LEPR* у девочек (32,0 %), чем у мальчиков (5 %) ($P < 0,05$). Генотипы GG и GC -174 гена *IL-6*, связанного с повышенной секрецией *IL-6* адипоцитами, обнаружены у 35,3 % и 54,9 % детей, соответственно.

Результаты являются предварительными. ДНК-банк детей с ожирением пополняется, и в ближайшее время полученные частоты выявления по исследуемым генам будут сопоставлены с результатами генотипирования контрольной выборки детей с нормальной массой тела.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТ ВЫЯВЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ

Е. А. Аксенова, А. Сильванович, А. Михайловская, А. В. Солнцева*,
З. В. Забаровская*, О. Забаровская***, Н. И. Дударева**, Л. В. Вязова*,
М. Лагун*, Н. Г. Даниленко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск

**10-я городская клиническая больница, Минск

***Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск

Витамин D играет центральную роль в гомеостазе кальция в организме, регулируя его поглощение, костную резорбцию, дифференцировку костных клеток и секрецию паратиреоидного гормона. В связывании активной формы витамина D участвует внутриклеточный рецептор, кодируемый геном *VDR*. Анализ полиморфных аллелей гена рецептора витамина D проводился во многих странах на разных этнических группах, вклад данного генетического полиморфизма в формирование минеральной плотности костей оценивался от весьма высокого (до 75 %) до статистически незначимого. Помимо этого полиморфизм гена *VDR* изучается при ряде заболеваний, затрагивающих нарушения метаболизма.

У 697 чел, проживающих в разных регионах Беларуси, 82 больных диабетом 1 типа (СД1) и аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), у 46 больных бронхиальной астмой (БА), 28 больных псориазом (ПС) и 34 пациентов с остеопенией и остеопорозом (ОС) нами изучены четыре полиморфных локуса в *VDR*-гене, соответствующие сайтам узнавания эндонуклеаз: *BsmI* (*rs1544410*), *ApaI* (*rs11168271*), *TaqI* (*rs731236*), *FokI* (*rs2228570*).

В популяции белорусов обнаружено 54 гаплотипа, различающихся аллельными вариантами четырех полиморфных сайтов гена *VDR*. Наиболее частый гаплотип в популяции (*TtAaBbFf*) обнаружен у 8,9 % белорусов. Отметим, что этот гаплотип в группе больных СД1 и АИТ (25,6 %) встречался в три раза чаще ($P < 0,01$). У больных с остеопенией и ОС гаплотип *TtAaBbFf* также был самым частым (14,7 % — отличия от популяции не достоверны), у двух больных из этой группы (5,9 %) обнаружен уникальный гаплотип *ttAaBbFf*, не выявленный ни в популяции, ни в других обследованных группах пациентов.

Распределение частот гаплотипов у больных БА и ПС достоверно ($P < 0,01$) отличалось от популяционных. В небольшой группе пациентов с ПС (28 чел.) обнаружено шесть уникальных гаплотипов: у троих — *ttaaBbff*, по одному пациенту с сочетанием аллелей *ttAaBbff*, *ttAAbbff*, *ttAaBBff*, *TtaaBbff*, *TtAabbff*. Обращает на себя внимание тот факт, что все эти уникальные гаплотипы

являются рецессивными гомозиготами по *FokI VDR*-сайту. Чаще всего у больных ПС встречается гаплотип *TtAaBbff* — у 21,4 %. В целом, частота регистрации гомозигот *ff* у больных ПС составляет 26,7 %, что выше популяционной (20,7 %), хотя малая выборка пациентов не позволяет достичь требуемого уровня значимости. У пациентов с БА самым распространенным оказался гаплотип *TtAaBbFF* (у 17,4 %). Показано, что у больных с БА в отличие от пациентов с ПС частота выявления гомозигот *ff* ниже популяционной (14,9 %). Хотя это снижение в силу малой выборки недостоверно, очевидна различная роль полиморфных аллелей гена *VDR* в генетическом контроле таких многофакторных заболеваний, как ПС и БА.

Таким образом, обнаружены уникальные гаплотипы по гену *VDR* в группах больных с ОС и ПС, частоты выявления ряда других гаплотипов у пациентов разных групп также отличались от популяционных, что указывает на дифференциальный механизм контроля геном *VDR* данных заболеваний.

ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В СПОРТЕ

И. И. Ахметов

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

В спортивной генетике выделяют как минимум три практических направления, которые опираются на результаты гено- и фенотипирования: а) определение предрасположенности детей и подростков к определенному виду двигательной деятельности; б) повышение значений спортивных показателей за счет оптимизации и коррекции тренировочного процесса; в) профилактика различных заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью спортсменов (Ахметов, 2009).

Проведение генетической диагностики в спорте подразделяется на четыре последовательных этапа: 1) анкетирование; 2) фенотипирование; 3) генотипирование нужных участков ДНК; 4) интерпретация данных гено- и фенотипирования, составление заключения специалиста и выдача рекомендаций.

Важно подчеркнуть, что при решении вопросов спортивной специализации и отбора, оптимизации и коррекции тренировочного процесса, профилактики профессиональных заболеваний спортсменов молекулярно-генетическое тестирование не может заменить фенотипическую диагностику, а может лишь дополнить и конкретизировать отдельные ее моменты. К наиболее распространенным в спорте видам фенотипической диагностики, которая проводится по показаниям, относятся следующие: 1) антропометрия, 2) биохимическое обследование, 3) тестирование физической подготовленности, 4) функциональная диагностика, 5) биомеханическое обследование, 6) психологические и психофизиологические тесты, 7) гистологические методы.

Интерпретация должна проводиться на основе суммарного вклада генотипов и аллелей генов в определение наследственной предрасположенности к двигательной деятельности и к развитию профессиональных патологий спортсменов. Для специалиста важно иметь собственную базу данных, содержащую сведения об уникальных генотипах элитных спортсменов.

В зависимости от носительства в количественном и качественном соотношении аллелей (генотипов), благоприятствующих какой-либо двигательной деятельности, у испытуемых можно определить несколько типов предрасположенности к развитию и проявлению физических качеств: очень низкая, низкая, ниже среднего, средняя, выше среднего, высокая, очень высокая. На основании этих данных для испытуемого подбирается набор групп видов спорта, к которым он предрасположен (с учетом знаний о том, какие маркеры являются наиболее значимыми для конкретного вида спорта). В зависимости от приоритета и генетического потенциала индивида этот набор должен включать в себя группы видов спорта 1-го (предпочитаемые виды спорта) и 2-го (альтернативные виды спорта) выбора.

В текст индивидуального заключения должны входить: а) рекомендации по двигательной деятельности (для испытуемого подбираются группы видов спорта, в которых он может достичь выдающихся результатов без вреда для здоровья, а также описываются сильные и слабые стороны систем организма с точки зрения потенциала развития физических качеств); б) диетические рекомендации (составляются на основе определенной индивидуальной чувствительности испытуемого к пищевым веществам); в) профилактический раздел — определяются меры по профилактике мультифакторных заболеваний и патологических состояний, связанных как со спортивной деятельностью, так и образом жизни.

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ БИОПСИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БЛАСТОМЕРОВ У ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ *IN VITRO*

А. А. Бараш

Национальный университет “Киево-Могилянская академия”, Киев

Создание линий стволовых клеток, содержащих геном предполагаемого реципиента, является актуальной задачей современной регенеративной медицины (Irion S., Nostro M., 2008). Имеющиеся на сегодня методы (такие, как перенос ядра соматической клетки реципиента или использование ретровирусных векторов) не дают на сегодня желаемого результата (Kiskinis E., 2010). Одним из наиболее перспективных методов получения индивидуальных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) на сегодня является биопсия одного бластомера у доимплантационных эмбрионов *in vitro*. Данный метод позволяет получить эмбриональные стволовые линии с абсолютной специфичностью к реципиенту (Johnson M., 2008). Создание таким образом линий ЭСК не предполагает какого-либо воздействия химическими или биологическими факторами для активации или сохранения недифференцированного состояния ЭСК.

Целью нашей работы была разработка оптимальных параметров для биопсии и культивирования бластомеров у доимплантационных эмбрионов *in vitro*.

Биопсию бластомеров проводили через 72 ч после оплодотворения 40 донорских ооцитов, полученных с согласия этического комитета клиники “Надия” (Киев). Всего было пробиопсировано 38 эмбрионов. Для проведения биопсии использовали микроманипулятор Eppendorf и лазер MTG Octax, установленные на Olympus 71X. После биопсии бластомеры переносили в подготовленные блестящие оболочки и культивировали 48 ч. Эффективность биопсии оценивали по частоте формирования бластоцист, оценивали также качество бластоцист и количество в них клеток на 5-е сут развития.

Анализ результатов показал, что 84,2 % полученных в ходе биопсии бластомеров продолжили пролиферацию. В 27 % случаев были получены бластоцисты и морулы разных стадий развития. Все полученные бластоцисты были меньшими по размеру по сравнению с контрольной группой. Количество клеток в них составляло от 48 % до 65 % по сравнению с контролем. Частота формирования бластоцист у пробиопсированных эмбрионов составила 46,9% (49,2 % в контрольной группе), из которых 63,1 % эмбрионов были хорошего и отличного качества (67,2 % в контроле).

Полученные нами результаты свидетельствуют об эффективности данного метода для получения индивидуальных линий ЭСК. Представленный метод весьма перспективен для лиц, рожденных благодаря применению методов вспомогательных репродуктивных технологий, а также при наличии криоконсервированных эмбрионов. Данный метод может стать основой для разработки фундаментальной терапии специфичными ЭСК в будущем.

ПРЕДИКТИВНАЯ МЕДИЦИНА В ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

**В. Г. Бебешко, Е. В. Кучер, Ж. Н. Минченко, Е. А. Дмитренко,
И. В. Дмитренко**

ГУ “Научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, Киев

В Научном центре радиационной медицины изучаются не только особенности гено- и фенотипа у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, но и разрабатываются подходы к выявлению наследственной предрасположенности и определению степени риска ее реализации еще в доклиническом периоде. Проводятся исследования по изучению генетических маркеров и корреляции между ними по оценке их парциального вклада в развитие злокачественного процесса, их информативности в диагностике и прогнозировании течения онкогематологических заболеваний.

На основании результатов дискриминантного анализа разрабатываются оптимальные комплексы диагностических и прогностических критериев для проведения поэтапного генетического скрининга по выявлению наследственной предрасположенности с целью формирования групп риска по онкогематологической патологии и прогнозированию течения лейкомиического процесса.

Первый этап скрининга позволяет выявлять предрасположенность с использованием простых и общедоступных методов, включающих в себя дерматоглифическое исследование, качественный и количественный анализ стигм дизэмбриогенеза, изучение родословных и анамнеза жизни. Второй этап с включением в анализ результатов *HLA*-типирования позволяет с большей точностью выявлять предрасположенность к онкогематологической патологии и формировать группы повышенного риска с учетом морфологического варианта заболевания. Результаты анализа с учетом инициальных клинико-лабораторных показателей позволяют прогнозировать течение лейкомиического процесса и исход заболевания.

Следует отметить, что за появление каждого дерматоглифа отвечает определенная хромосома, а наличие патологического рисунка косвенно свидетельствует о возможных в ней изменениях. Кроме того, у лиц с характерной экспрессией для каждого варианта лейкемии химерных генов выявлены патологические дерматоглифические признаки, за появление которых отвечает соответствующая хромосома.

Величина информативности генетических маркеров и степень достоверности их различий у лиц с онкогематологическими заболеваниями и практически здоровых легли в основу создания бальной шкалы. Использование бальной оценки генетических характеристик позволило разработать диагностический индекс: чем больше его величина, тем выше риск развития заболевания.

На пути детерминации онкологического риска интересным и своевременным представляется идентификация генов предрасположенности, составление

генной сети для онкогематологических заболеваний, являющихся мультифакторными, а также идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов. Важным является анализ ассоциаций генетического полиморфизма с конкретным заболеванием и формирование тематических панелей наиболее информативных генетических полиморфизмов. Это является концептуальной основой предиктивной медицины.

Генетическое тестирование в досимптоматический период позволяет выявлять существующие пока только в геноме наследственные тенденции к развитию будущих болезней, формировать группы онкологического риска и на основе изученных диагностических и прогностических маркеров новообразований разрабатывать патогенетически обоснованные подходы к химиопрофилактике и химиотерапии заболеваний.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ *ASP299GLY TOLL-LIKE*-РЕЦЕПТОРОВ 4 ТИПА И СОСТОЯНИЕ МУКОЗАЛЬНОГО АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА ФОНЕ ГАСТРОЭНТЕРОПАТИИ

К. В. Белоглазова

Крымский государственный медицинский университет им С. И. Георгиевского
МЗ Украины, Симферополь

Длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) при ревматоидном артрите (РА) способно приводить к гастроэнтеропатии, что формирует фон для чрезмерной транслокации эндотоксина (ЭТ) грамотрицательной флоры кишечника в портальную кровь за счет снижения барьерных функций слизистых оболочек пищеварительного тракта.

Цель исследования — изучение у больных РА с НПВП-гастроэнтеропатией полиморфизма *Asp299Gly Toll-like*-рецепторов 4 типа и состояния мукозального и системного гуморального антиэндотоксिनотического иммунитета.

Обследуемые и методы. Обследовано 90 пациентов с РА (10 мужчин, 80 женщин) в возрасте от 19 до 68 лет и длительностью заболевания от 1 года и свыше 10 лет. Все пациенты находились на стационарном лечении в ревматологическом отделении КРУ “КБ им. Н. А. Семашко” г. Симферополя и были подразделены на две группы: 1 — больные РА без гастроэнтеропатии, 2 — больные РА с гастроэнтеропатией. Материалом исследования служили периферическая кровь и слюна. Для изучения аллелей полиморфного участка *Asp299Gly* гена *Toll*-подобного рецептора 4 использовали метод полимеразной цепной реакции. Содержание *sIgA*, анти-ЭТ-*sIgA* в слюне и анти-ЭТ-*IgA* в крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Контрольная группа состояла из 32 практически здоровых людей. Частота полиморфизма *Asp299Gly* генотипами GG выявлена у 2,7 %, AG — у 10,81 %, AA — у 86,5 % больных РА.

Результаты. При сравнении полученных данных с результатами исследования в контрольной группе было показано, что процент больных, имеющих генотип AG, GG, G, значительно выше ($P < 0,05$) у больных РА. Выявлено, что больные РА с сопутствующей гастроэнтеропатией имеют гомозиготный (AA) вариант гена *Asp299Gly Toll-like*-рецепторов 4 типа, что, как известно, является гиперреспондерным на ЭТ. У больных РА с сопутствующей гастроэнтеропатией отмечается выраженное снижение секреторной и плазменной формы анти-ЭТ *IgA* в 2 раза по сравнению с донорами ($P < 0,01$) и с группой РА сравнения, что связано с дисфункцией мукозального антиэндотоксिनотического иммунитета, на фоне длительного применения НПВП.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ МУТАЦІЙ C282Y та H63D ГЕНА СПАДКОВОГО ГЕМОХРОМАТОЗУ (HFE)

О. Б. Білевич, Г. В. Макух, О. В. Кенс, Г. Р. Акопян

ДУ “Інститут спадкової патології НАМН України”, Львів

Ген СГХ (спадковий гемохроматоз — *HFE*, локалізований на короткому плечі 6 хромосоми) кодує протеїн, який взаємодіє з рецептором трансферину і регулює всмоктування заліза у петлях тонкого кишечника. У 90 % випадків причиною СГХ є спадкові мутації в гені *HFE* — C282Y та H63D. Мутація C282Y — це міссенс-мутація, яка призводить до заміни цистеїну на тирозин, і при її наявності *HFE*-протеїн втрачає здатність до зв'язування з *beta2*-мікроглобуліном, що призводить до деградації цього білка. Мінорна мутація H63D викликає незначне зниження інгібуючого впливу на трансферинний рецептор.

При СГХ залізо нагромаджується в тканинах, що може призвести до печінкової недостатності, панкреопатії, діабету, порушення серцевого ритму, імпотенції, ранньої менопаузи, недостатності щитоподібної залози. Молекулярно-генетична детекція даних мутацій дозволяє верифікувати діагноз СГХ та виявляти його на досимптоматичній стадії. Періодична флеботомія у хворих на гемохроматоз запобігає розвитку ускладнень і значно здовжує тривалість та якість життя таких пацієнтів. Мутації C282Y і H63D були визначені як можливі фактори ризику для розвитку цирозу печінки у пацієнтів із хронічним гепатитом С. Існують дані про те, що гетерозиготність за мутацією C282Y є вірогідним фактором ризику розвитку раку печінки, молочної та підшлункової залози. Мета роботи: налагодити молекулярно-генетичний аналіз та вивчити частоти мутацій C282Y і H63D гена *HFE* у пацієнтів із Західної України.

Проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом висолювання. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції. Дослідження мутацій C282Y і H63D гена *HFE* проводили за допомогою рестрикційного аналізу та електрофорезу в агарозному гелі.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз мутацій C282Y та H63D гена *HFE* у 156 осіб, які проживають на території Західної України: 42 дітей з гепатобіліарними порушеннями, 34 хворих на муковісцидоз з ідентифікованими мутаціями гена ТРБМ, 50 осіб з онкологічними захворюваннями та 30 осіб контрольної групи. Проведені молекулярно-генетичні дослідження показали, що частота носійства мутації C282Y серед пацієнтів, гомозиготних за мажорною мутацією F508del (14,7 %), а також серед пацієнтів з гепатобіліарною та панкреатичною патологією (11,9 %) була вірогідно вищою, ніж в осіб контрольної групи (3,3 %). Відмінності щодо розповсюдження мутації H63D серед

досліджуваних груп пацієнтів не були вірогідними. Висока частота гетерозиготного носійства мутацій *C282Y* (3,3 %) та *H63D* (24 %) гена *HFE* у загальній вибірці вказує на необхідність підвищення настороженості лікарів щодо діагностики спадкового гемохроматозу.

Молекулярно-генетичний аналіз мутацій гена *HFE* дозволяє виявити захворювання на доклінічній стадії, що при відповідній малозатратній терапії значно здовжує тривалість та якість життя таких пацієнтів, запобігає розвитку ускладнень, найсерйознішим з яких є первинна гепатоцелюлярна карцинома.

ЕМБРІОНАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ЇХ ПОТЕНЦІАЛ ДО ПРОЛІФЕРАЦІЇ І ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Н. М. Білько, Д. І. Білько, О. О. Бараш

Національний університет “Кієво-Могилянська академія”, Київ

В останні роки концепція існування гемопоетичних стовбурових клітин зазнала суттєвих змін. Усталене уявлення про єдину гемопоетичну стовбурову клітину та її нащадків ускладнилося накопиченими даними про існування тотипотентної стовбурової клітини та широку гетерогенність відділу клітин-попередників.

Нещодавно у культурі ембріональних клітин у присутності комплексу ростових факторів було отримано цистоподібні утворення, названі “ембріоїдними тільцями” (Hole, Smith, 1994; Keller, 1995). Вони є аналогами жовткового мішка на ранніх етапах розвитку ембріона і утворюються плюрипотентними стовбуровими клітинами. Дані щодо розвитку гемопоетичних клітин з ембріоїдних тілець суперечливі. Невідомо, коли саме виникають перші кровотворні клітини, який шлях диференціювання вони обирають, яка їхня функціональна активність, як впливають ті чи інші комплекси цитокінів на напрям диференціювання та їх інтенсивність.

З метою відповіді на ці запитання було проведено експериментальні дослідження, в яких використовували лінію ембріональних стовбурових клітин мишей *D3* для отримання ембріоїдних тілець. Клітини у краплях поміщали на внутрішню поверхню кришки чашки Петрі у концентрації 3×10^4 клітин/мл повного живильного середовища (30–40 крапель на чашку) і культивували у висячому стані протягом 2 діб у присутності *LIF* (100 Од/мл). Отримані ембріоїдні тільця для нарощування маси переносили у мікробіологічні чашки Петрі на 5–7 діб, потім кожне із них поміщали в окрему лунку 96-комірковий планшета і культивували 4–5 тижнів у присутності комбінацій ростових факторів. Клітини, отримані із супернатанту, оцінювали у напіврідкому агарі *in vitro* (Metcalfe, Moore, 1973).

На 1 добу культивування без *LIF* виявляли спонтанне диференціювання у нейрони та кардіоміоцити. Це узгоджується із даними, отриманими у лабораторії А. Wobus (1997, 2004). У наших дослідженнях увагу було зосереджено на моменті появи перших кровотворних клітин, оцінці їх функціональної активності і впливу комплексу цитокінів на напрямок диференціювання клітин. Показано, що у процесі культивування клітин ембріоїдного тільця гемопоетичні клітини з’являються спонтанно, на 3–4 добу після видалення *LIF*. Гемопоез підтримується впродовж культивування (5 тижнів). Додавання до середовища ростових факторів призводило до стимуляції кровотворної функції у напрямку гранулоцито- і еритропоезу. Найкращий ефект отримано при використанні *SCF* у поєднанні з ІЛ-6.

Результати проведених досліджень свідчили про те, що культури ембріонічних тілець є адекватною моделлю для вивчення механізмів експансії прогеніторних популяцій кровотворних клітин-попередників. Подальші дослідження регуляції процесів проліферації та диференціювання на початкових етапах формування гемопоетичної системи можуть стати підґрунтям для розробки способів отримання нащадків заданого напрямку диференціювання.

ЗДАТНОСТІ ДО ПРОЛІФЕРАЦІЇ І ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ АС 133⁺-КЛІТИН, ВИЛУЧЕНИХ ІЗ КОРДОВОЇ КРОВІ, У ДОВГОТРИВАЛІЙ КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Д. І. Білько, С. В. Василовська, Н. М. Білько, І. З. Борбуляк

Національний університет “Кієво-Могилянська академія”, Київ

Культуральні системи, що забезпечують довготривалу підтримку кровотворення, є адекватною моделлю для вивчення клітинних взаємодій. У цій системі стромальні клітини (фібробласти, адипоцити, ендотеліальні клітини), гемопоетичні клітини (макрофаги) і продукти їх життєдіяльності (адгезивні молекули, цитокіни, екстрацелюлярний матрикс) беруть участь в утворенні гемопоетичного мікрооточення, яке сприяє проліферації, диференціюванню і дозріванню гемопоетичних стовбурових клітин та їх нащадків.

У даному дослідженні було використано оригінальний спосіб культивування клітин у гелевій дифузійній камері. Виділені із кордової крові людини АС133⁺-клітини вводили у внутрішню порожнину дифузійних камер. Після цього їх занурювали у 6-лункові планшети із фідерним шаром та інкубували у живильному середовищі *DMEM* із 15 % фетальної телячої сироватки в умовах абсолютної вологості при 37 °С та 5 % CO₂ протягом 5 тижнів зі зміною середовища кожні 48 год. Фідерні шари готували шляхом культивування суспензії клітин з різних органів ембріона миші. Для визначення характеру взаємодії гемопоетичних клітин з стромальними клітинами, які формували фідерний шар, досліджували вплив на клітини у камері продуктів життєдіяльності клітин фідера та вивчали ефект спільного культивування гемопоетичних і фідерних клітин у камері, зануреній у живильне середовище. Оцінювали здатність культивованих клітин до проліферації, диференціювання і формування клонів.

Функціональну здатність культивованих АС133⁺-клітин оцінювали у субкультурі із напіврідким агаром. Клоногенну активність клітин визначали на 14 добу культивування шляхом прямого і непрямого аналізу та кількісного підрахунку колонієутворюючих одиниць. Визначали КУО-ГМ, БУО-Е та КУО-Е; їх аналіз здійснювали за допомогою морфологічних і цитохімічних методів дослідження. У процесі культивування АС133⁺-клітин, як у випадку впливу середовища, кондиціонованого продуктами життєдіяльності клітин, що формували фідерний шар, так і при прямому міжклітинному контакті, коли фідерні клітини культивувалися разом із гемопоетичними, була досягнута їх *ex vivo* експансія і диференціювання. Підтримка у культурі протягом тривалого часу примітивних гемопоетичних клітин (проліферуючих клітин, таких, як бластні клітини, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити), їхня клоногенна здатність і функціональні характеристики свідчать про здатність фідерного шару формувати відповідне мікрооточення. Виявилось, що регуляція гемопоетичної активності зі сторони стромального матриксу в культурі *in vitro* носить дистантний характер і здійснюється гуморальними факторами, продукованими клітинами фідерного шару за відсутності безпосереднього контакту з кровотворними клітинами-попередниками. Отже, прямий клітинний контакт є необов'язковим для тривалої підтримки кровотворення *in vitro*.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕЖКОРНЕВЫХ ПЕРЕГОРОДОК ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ

Н. А. Боброва, Л. Я. Богашова, Н. П. Ярынич-Бучинская, Н. Л.
Куценко, П. Н. Скрипников, И. П. Кайдашев

НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики
ВГУЗ “Украинская медицинская стоматологическая академия”, Полтава

Перспективу реконструктивной пародонтологии составляет тканевая инженерия, представляющая собой живой заместительный материал в виде выращенных *in vitro* конструкций на основе биоматрикса и мезенхимальных стволовых клеток. Накоплен позитивный опыт применения терапии мезенхимальными стволовыми клетками для замещения костной ткани, в частности тканей челюстно-лицевой области.

Хронические формы пародонтита являются серьезной проблемой в стоматологии и, независимо от первопричины возникновения, характеризуются прогрессирующей резорбцией межкорневых перегородок, что ведет к утрате зубов. Несмотря на разнообразие и многочисленность предложенных средств и методов лечения пародонтита, восстановление межальвеолярных перегородок является труднодостижимой задачей.

Нами был разработан способ создания биоинженерных трансплантатов в виде клеточных культур мезенхимальных стволовых клеток человека на коллагеноматрице. Трансплантаты выращивали 10 сут в специальной питательной среде. Использовали аутологичные мезенхимальные стволовые клетки из периферической крови пациентов.

Иммунофенотипирование на проточном цитофлуориметре продемонстрировало рост и накопление гемопоэтических и мезенхимальных клеток-предшественниц в культуре — фенотип $CD34^+$ и $CD56^{low}CD54^{low}CD105^+CD34^-CD45^-$, соответственно.

Хирургическое лечение хронического генерализованного пародонтита II–III степени проводили у 35 пациентов в возрасте от 22 до 56 лет с использованием клеточной трансплантации при хирургическом вмешательстве — открытом кюретаже. Результаты оценивали через месяц, 3 и 6 мес, а также в отдаленные сроки (через год). Клинические исследования выявили эффективность предложенного метода у всех 35 пациентов: ликвидация пародонтальных карманов, кровоточивости, подвижности зубов.

Рентгенологически подтверждено восстановление костной ткани (в среднем на 30–35 %) через 6 мес и стабильность через год. Восстановление костной ткани зависело от уровня резорбции, выявленной до операции: при резорбции до 1/3 величины корня восстановление костной ткани было полным у 48 % пациентов, при резорбции 1/2 костная ткань восстановилась до

1/3 у 34,3 % пациентов и при резорбции на 2/3 величины корня восстановление произошло до 1/2 у 17,1 % пациентов. Денситометрия участка альвеолы после операции показала уплотнение костной ткани в среднем на 11,63 %.

Таким образом, применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток крови для хирургического лечения хронического генерализованного пародонтита на современном этапе является наиболее оптимальным, эффективным методом лечения, который стимулирует репаративные и регенеративные процессы в тканях пародонта.

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХВОРИХ З РІЗНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

І. В. Болтіна, М. Ю. Джоган*, Н. Я. Гридін** , В. Ю. Хиль***

Інститут екогієни та токсикології ім. Л. І. Медведя, МОЗ України, Київ
*ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського
НАМН України”, Київ

** ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України”, Київ

*** Головний військовий медичний клінічний центр “ГВКГ”, Київ

Цитогенетичні тести *in vitro*, що спрямовані на демонстрацію індукції хромосомних порушень в культивованих клітинах, — це один із найбільш відпрацьованих, стандартизованих і поширених методів, який дає можливість досить об’єктивно порівнювати отримані результати інших авторів.

Обстежувані та методи. Обстежено 92 хворих із вперше встановленим діагнозом “глиома головного мозку”, які поступили на лікування до Інституту нейрохірургії. Серед них було 67 хворих до лікування, 10 хворих — після лікування, та 15 хворих із метастазами в головний мозок. За контроль взято результати обстеження 20 мешканців м. Києва, які заперечували свідомий професійний чи побутовий контакт із мутагенними факторами і були практично здорові. Умовним контролем були 30 хворих із патологією шлунково-кишкового тракту (за винятком онкопатології) до лікування. Обстежено також 200 мешканців Києва віком від 20 до 70 років: 128 — контрольна група (особи без впливу професійних шкідливих чинників), 72 — основна група (особи під впливом шкідливих професійних чинників). Крім професійних шкідливих чинників звертали увагу на наявність хронічних захворювань (виключаючи онкологічні) та наявність/відсутність онкопатології в родині. Обстежено також хворі із термінальною хронічною нирковою недостатністю (тХНН), які знаходяться на гемодіалізі (21 особа, з них 10 осіб із тХНН, які знаходяться на гемодіалізі та мають супутню патологію-хронічний гепатит С), та 52 хворих на хронічний гепатит С.

Цитогенетичні показники (частота аберацій, кількість анеуплоїдних та мультиаберантних клітин, надспонтанні рівні при дії мітоміцину С) визначали в лімфоцитах периферичної крові. Лімфоцити культивували відповідно до загальноприйнятого методу Хангерфорда впродовж 52 год із модифікаціями. Відбір метафазних платівок для цитогенетичного аналізу, класифікація та метод обліку аберацій хромосом були загальноприйнятими. Мультиаберантними клітинами вважали такі, які мали 3 і більше аберацій. Анеуплоїдні клітини розподіляли на гіпоплоїдні (менше 42), та гіперплоїдні (більше 49). Для отримання показників надспонтанних рівней було проведено модифікацію мітоміцином С (в концентрації 10 мкг/мл) культури лімфоцитів периферичної крові за 24 год до фіксації. Надспонтанним рівнем вважали різницю між частотою реєстрації аберантних метафаз при дії мутагену (мітоміцину С) та спонтанною частотою (без мутагенного впливу). Надспонтанні рівні відобра-

жують адаптаційні можливості організму: чим вищі значення цього показника, тим більші адаптаційні можливості організму.

Результати. Треба зазначити, що під час досліджень на "перший план" по значущості вийшов цитогенетичний показник (кількість анеуплоїдних клітин), який відкриває більш широкі можливості щодо цитогенетичного аналізу, особливо для формування груп ризику щодо негативного впливу на генетичний апарат людини при популяційних дослідженнях.

Висновки. Отримані результати вказують на зміни значень цитогенетичних показників у всіх групах обстежених пацієнтів та дають можливість характеризувати патологічні процеси як при онкологічних захворюваннях, так і при хронічному вірусному гепатитові С у різних групах (категоріях) хворих. Отримані дані зумовлюють доцільність проведення подальших досліджень.

”ЭФФЕКТЫ СВИДЕТЕЛЯ” В РАДИОБИОЛОГИИ: ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВЕРСИЯ

А. М. Вайсерман

ГУ ”Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины”, Киев

«Эффектами свидетеля» (*bystander effects*) в радиобиологии называют эффекты облучения, проявляющиеся в клетках, непосредственно не подвергшихся облучению, но контактирующих каким бы то ни было образом с облученными клетками. Они могут возникать как в клетках, имеющих контакты между собой, так и в случае отсутствия прямых контактов (например, проявляться в цитотоксическом действии биологических жидкостей, в которых происходило облучение клеток, на интактные объекты). В зависимости от дозы и мощности облучения эффекты свидетеля могут быть как негативными (апоптоз, хромосомные аберрации, индуцированная нестабильность генома), так и позитивными (адаптивный ответ, компенсаторная пролиферация). В последние годы активно обсуждается вопрос о том, могут ли эффекты свидетеля проявляться *in vivo*. Во многих исследованиях показано, что облучение локальных участков организма может приводить к индукции изменений в других, необлученных его частях. Эти эффекты, родственные «эффектам свидетеля», называют в современной литературе абскопальными эффектами. Наиболее изучены антираковые абскопальные эффекты, когда парциальное облучение отдельных частей тела приводит к подавлению опухолевого роста в органах, непосредственно не подвергшихся облучению. В ряде работ, осуществленных в последние годы, обнаружены доказательства того, что при парциальном облучении отдельных частей тела экспериментальных животных возможна индукция широкомасштабных эпигенетических изменений в органах, не подвергшихся облучению. Высказывается предположение, что индукция таких изменений может быть проявлением генерализованной мобилизации адаптивных механизмов организма, которая возникает в ответ на радиационное воздействие и приводит к «эффектам свидетеля» *in vivo*, в том числе к подавлению роста новообразований.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ НА КОЛЛАГЕНОВОМ СУБСТРАТЕ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И СЕЛЕКЦИИ РЕДКИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

Р. Г. Васильев, В. М. Кирик, О. В. Кучук

ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

Костный мозг представляет собой гетерогенную популяцию клеток, в состав которой входят стволовые клетки, клетки-предшественники и их потомки различной степени дифференциации. Наибольший интерес представляют гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мультипотентные стромальные клетки (МСК) и эндотелиальные клетки-предшественники. В связи с этим перспективным направлением представляется разработка культуральных систем, позволяющих исследовать взаимодействие различных типов клеток костного мозга.

Цель работы — оценить перспективы использования коллагенового субстрата для получения культур костного мозга мыши, состоящих из клеток различных субпопуляций.

Материал и методы. Суспензию клеток костного мозга выделяли из бедренных костей взрослых мышей линии *FVB*. Клетки засеивали в стандартные пластиковые культуральные флаконы площадью 25 см² (“Sarstedt”), предварительно обработанные раствором коллагена I типа для формирования коллагеновой пленки. Концентрация клеток составляла 1·10⁷ на культуральный флакон. Клетки культивировали в среде *DMEM:F12* (“Sigma”) с добавлением 15 % эмбриональной телячьей сыворотки (“Sigma”). Ограниченное открепление клеток достигалось 3-минутной обработкой культур смесью трипсин-ЭДТА (“Sigma”) с последующим их засеиванием в стандартные необработанные культуральные флаконы. Иммунофенотипический анализ полученной популяции проводили на лазерном проточном цитофлуориметре-сортере *FACS Aria* (*Becton Dickinson*) с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител против антигенов *Sca-1*, *CD44*, *CD73*, *CD117*, *CD38* (*Becton Dickinson*).

Результаты. При засеивании клеток на коллагеновый субстрат прикреплялись как МСК-подобные клетки, так и округлые клетки (предположительно, ГСК). Во время дальнейшего культивирования часть МСК-подобных клеток начала погружаться в коллагеновый субстрат, что сопровождалось увеличением их размера и приобретением более фибробластоидной морфологии. Округлые клетки пролиферировали и располагались исключительно на поверхности коллагенового субстрата, формируя конгломераты из клеток разного диаметра. При ограниченной трипсинизации от субстрата откреплялись преимущественно округлые клетки. Полученная суспензия была перенесена в стандартные необработанные флаконы. Клетки прикреплялись на культуральный

пластик, приобретая округлую форму, но демонстрируя при этом значительно большую степень расплывания, чем на коллагеновом субстрате. В дальнейшем они пролиферировали, формируя монослой плотно прилегающих друг к другу клеток, который был сходен с “булыжной мостовой”, наблюдаемой при культивировании эндотелиальных клеток. По данным иммунофенотипического анализа антиген *Sca-1* был экспрессирован на 77,6 % клеток данной культуры, *CD117* — на 85,8 %, *CD73* — на 46,1 %, *CD38* — на 81,8 % клеток. По уровню экспрессии *CD73* и *CD44* в каждом случае клетки приблизительно равномерно подразделялись на две субпопуляции с высоким (*CD73^{hi}* и *CD44^{hi}*) и низким (*CD73^{low}* и *CD44^{low}*) уровнем экспрессии антигена.

Выводы. При культивировании клеток костного мозга мыши на коллагеновом субстрате удалось изолировать и размножить субпопуляцию клеток, встречающихся в виде минорного компонента в стандартных культурах мышинных МСК. Для выяснения происхождения этих клеток, их пролиферативного и дифференцировочного потенциала необходимы дальнейшие исследования.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ В ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЕ ВРАЧА-ГЕНЕТИКА

И. Ю. Васильева, О. П. Романенко, О. С. Глотов*

Диагностический центр (медико-генетический), Санкт-Петербург, Россия
*НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Развитие современной молекулярной медицины, разработки по выявлению генов-кандидатов мультифакторных заболеваний, введение понятий “предиктивная медицина”, “репродуктивная карта”, а также заинтересованность пациентов в выявлении причин и факторов риска повторения патологии в семье, позволили практическому врачу-генетику расширить спектр обследований при проведении консультаций в плане периконцепционной профилактики. Данная работа проводится в тесном контакте с лабораторией пренатальной диагностики НИИ АГ им. Д. О. Отта СЗО РАМН.

С 2003 г. молекулярно-генетическое тестирование прошли 528 пациентов из 256 семей: с невынашиванием беременности в анамнезе (138 семей), с ВПР мультифакторной природы (45 семей), с неудачами при проведении ВРТ (25 семей), самостоятельно обратившиеся для генетического тестирования до зачатия (50 семей).

Генетическое тестирование предлагается после подробного разъяснения диагностической ценности каждого исследования и только с добровольного согласия (считаем, что директивность при назначении данных обследований недопустима). На первом этапе проводится кариотипирование супругов. На втором этапе предлагается диагностика гетерозиготного носительства мутаций по значимым для нашей популяции заболеваниям: муковисцидоз (*delF508*, *CFTRdel21kbn*), фенилкетонурия (*R408W*); адреногенитальный синдром (*CYP21A2* делеция гена в районе экзона 3, *P30L* (экз. 1), *i2splice* (интр. 2), *del8bp* (экз. 3), *I172N* (экз. 4), *V237G* (экз. 6), *V281L* (экз. 7), *Q318X* (экз. 8), *R356W* (экз. 8); *P453S* (экз. 10)), спинальная мышечная атрофия (исследование 7 и 8 экзонов генов *SMN1* и *SMN2*). Носительство мутации *delF508* в гене муковисцидоза выявлено у 5 женщин с неудачами ЭКО в анамнезе, носительство мутации *R408W* — у 2 женщин, имеющих в анамнезе самопроизвольный выкидыш с ВПР у плода. Среди супругов с невынашиванием беременности выявлено носительство в гене АГС у 13 пациентов (11 женщин и 2 мужчин), из которых в 2 случаях у обоих супругов. Тестирование супругов по генам “предрасположенности” предлагается после исключения хромосомной патологии и носительства мутаций моногенных заболеваний. Исследуется присутствие полиморфизмов в генах II фазы детоксикации (*GST*-гены), генах обмена гомоцистеина (*MTHFR*, *MTRR*), генах фибринолиза (*F7*, *FV*, *FGB*, *F II*, *PLAT*, *PAI1*, *ITGB3*), проводится типирование *HLA* II класса (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*). Далее по программе обследования, на основании полученных дан-

ных, как по отдельным аллельным вариантам, так и по сочетаниям определенных ослабленных генотипов назначаются исследования для определения так называемого биохимического фенотипа. Биохимические исследования включают в себя как стандартный перечень исследований (определение уровня гомоцистеина, фолатов, витамина В₁₂ в сыворотке крови, коагулограмма), так и дополнительные обследования с учетом генетического профиля (обследование на целиакию, сахарный диабет, определение липидного спектра и т. д.). С учетом полученных данных назначается периконцепционное лечение. В случае выявления повышенного генетического риска по акушерской патологии при беременности составляется индивидуальный план ведения беременности.

РАСЧЕТНОЕ КОЛИЧЕСТВО ПУЛА КЛЕТОК СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ХОРИОГЕНИЧЕСКИЙ ГОНАДОТРОПИН В РАЗНЫЕ СРОКИ ЭМБРИОГЕНЕЗА

Н. П. Веропотвелян, Л. А. Кодунов

ОКУ “Межобластной центр медицинской генетики и пренатальной диагностики”,
Кривой Рог

Согласно современным исследованиям, клетки синцитиотрофобласта (КС) отделены друг от друга мембранами с большим количеством десмосом. В отличие от эпителиоидного типа клеток цитотрофобласта (КЦ) КС содержат крупные митохондрии и большое количество рибосом, что характеризует их как секреторные клетки. По нашему мнению, КС дифференцируются из клеток Лангханса, а КЦ — из Х-клеток экстраворсинчатого цитотрофобласта. В связи с этим можно допустить, что одна из двух клеток при первом делении становится предшественницей КС и пул клеток КС составляет половину всех эмбриональных клеток. Таким образом, при скорости деления клеток (32 ч — первое деление и все последующие — через 18 ч) на период имплантации (7-е сут) эмбрион содержит 128 КС (2^7). Ранняя экспрессия синтеза и секреция хориогенического гонадотропина человека (ХГЧ) КС позволяет рассчитать количество синтезированного гормона, поступающего в кровотоки из одной клетки, а также рассчитать количество клеток участвующих в синтезе ХГЧ на ранних этапах эмбриогенеза.

Материал и методы. Разрешающая способность современных методов определения ХГЧ в сыворотке крови беременной составляет 0,1–0,3 МЕ/л. Средняя концентрация ХГЧ при нормальной беременности составляет 0,61 МЕ/л на 9-е сут, 1,8 МЕ/л — на 10-е сут, 6,3 МЕ/л — на 11-е сут лютеиновой фазы. Расчетное количество ХГЧ, выделенного одной клеткой, составляет 0,75 (0,52–0,98) мМЕ/л.

Результаты. На 7-е сут эмбриогенеза 2^7 клеток (128) продуцируют в кровотоки 96 (67–125) мМЕ/л ХГЧ, на 14-е сут 2^{17} клеток (около 130 тыс.) продуцируют 98 (66–128) МЕ/л ХГЧ. Экспоненциальный рост количества клеток завершается на 3-й неделе и составляет 2^{26} клеток (67 млн.). Такое количество клеток поддерживает уровень ХГЧ в крови от 50–120 МЕ/л в последующие сроки беременности.

СТВОРЕННЯ БІОАФІННОГО СОРБЕНТУ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

О. Б. Горбатюк, М. В. Цапенко

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Очищені імуноглобуліни широко використовуються як у фундаментальних дослідженнях, так і на практиці. Тому створення нових афінних сорбентів для отримання очищених фракцій імуноглобулінів із складних сумішей є актуальним. Зазвичай, використовують афінні сорбенти, створені на основі імуноглобулін-зв'язувальних білків (білки *A*, *G*, *L*), найбільш розповсюдженим серед яких є поверхневий білок *Staphylococcus aureus* білок *A* (*SPA*). *SPA* складається з 5 високогомологічних доменів, кожен з яких здатний до специфічного зв'язування з *Fc*-доменами (константними доменами) та *Fab*-фрагментами імуноглобулінів класу *G* (*IgG*) і деяких *IgM* та *IgA* різних видів ссавців. Сьогодні, завдяки розвитку технологій рекомбінантних ДНК, білок *A*, одержаний продукцією в *E. coli*, широко використовують в біотехнології.

При створенні афінних сорбентів для очищення імуноглобулінів на основі *SPA* його іммобілізацію проводять на хімічно активованих матрицях. Така іммобілізація є неспецифічною і потребує значних витрат. Генно-інженерне злиття ДНК-послідовності білка *A* з послідовністю целюлозо-зв'язувального домена (*CBD*), виділеного з целюлозо-літичного комплексу *Clostridium thermocellum*, забезпечує біоафінне зв'язування злитого білка на целюлозі або хітині. Основною перевагою є здатність *CBD* до специфічної взаємодії з вуглеводневим остовом целюлози в нативних та денатурувальних умовах, що забезпечує орієнтовану іммобілізацію молекули білка на матриці та експонування активних центрів зв'язування в положення, оптимальне для взаємодії з лігандом.

Мета роботи — створення біоафінного сорбенту на основі генно-інженерного злитого білка *SPA-CBD₂* для хроматографічного очищення імуноглобулінів.

Методи: конструювання рекомбінантних ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, електрофорез ДНК, секвенування ДНК, культивування і трансформація бактерій, експресія білків, електрофорез білків, виділення білків, афінна хроматографія.

Результати. Сконструйовано молекулу рекомбінантного злитого білка *SPA-CBD₂* та створено плазмідний вектор для його синтезу в бактеріях *E. coli*. Визначено умови ферментації, які забезпечили суперпродукцію *SPA-CBD₂* в *E. coli* в розчинному стані. В результаті специфічного зв'язування з відповідними лігандами підтверджена функціональна активність білків-партнерів злитого білка *SPA-CBD₂*. На основі *SPA-CBD₂* створено біоафінний сорбент. Показано перспективність використання сорбенту для хроматографічного очищення імуноглобулінів деяких видів ссавців.

ВІКОВІ ЗМІНИ КЛІТИННОГО СКЛАДУ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ

К. П. Горностай, О. В. Кучук, І. Ф. Лабунець

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Відомо, що з віком збільшується кількість випадків патологій опорно-рухового апарату, особливо остеопорозу. В експерименті встановлено, що патологія кісткової тканини значною мірою пов'язана із віковими особливостями у взаємодії клітин стромальної та кровоутворюючої тканин кісткового мозку. Такі взаємодії можуть мати певні відмінності у мишей різного генотипу.

Мета роботи — дослідити клітинний склад кісткового мозку у мишей ліній *CBA/Ca* і *FVB/N* різного віку та провести його порівняльну характеристику.

Матеріал та методи. Об'єкт дослідження — інтактні молоді (3–4 міс) і старі (18–21 міс) миші-самці ліній *CBA/Ca* (генотип $H-2^k$, $n = 16$) та *FVB/N* (генотип $H-2^g$, $n = 19$). У кістковому мозку тварин підраховували число ядровмісних клітин; визначали кількість клітин-попередників для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУК-ГМ) в напіврідких агарових культурах, а також кількість стромальних клітин-попередників для колоній фібробластів (КУК-Ф) методом культивування клітин кісткового мозку в моношарових культурах. Число колоній перераховували на загальну кількість ядровмісних клітин кісткового мозку стегнової кістки.

Результати. Клітинний склад кісткового мозку у мишей лінії *CBA* різного віку. Встановлено, що у кістковому мозку мишей загальне число ядровмісних клітин з віком зменшується, що співпадає з результатами попередніх досліджень Г. М. Бутенка та співавт., проведених на мишах цієї ж лінії у зимово-весняний період, і становить у дорослих і старих тварин, відповідно $(18,5 \pm 2,9) \times 10^6$ і $(14,2 \pm 1,04) \times 10^6$ ($P < 0,05$). Відносне число КУК-Ф (на 10^6 клітин) у дорослих мишей в 1,4 рази менше, ніж у старих тварин ($32,5 \pm 3,1$), тоді як абсолютний їх вміст практично не відрізняється ($411,3 \pm 84,1$ і $445,8 \pm 46,25$). Відносний та абсолютний вміст КУК-ГМ у кістковому мозку мишей цієї лінії з віком не змінювався.

Клітинний склад кісткового мозку у мишей лінії *FVB/N* різного віку. Встановлено, що у кістковому мозку дорослих і старих мишей загальне число ядровмісних клітин становить, відповідно $(18,6 \pm 3,57) \times 10^6$ і $(19,8 \pm 1,6) \times 10^6$, відносне число КУК-Ф — $31,0 \pm 3,7$ та $41,0 \pm 3,51$ ($P < 0,05$), абсолютне — $627,3 \pm 108,7$ і $788,2 \pm 81,3$. У старих мишей цієї лінії відносний та абсолютний вміст КУК-ГМ в 1,4 рази вище, ніж у дорослих мишей.

Порівняльна оцінка клітинного складу кісткового мозку у мишей різних ліній. Отримані відмінності щодо деяких досліджених показників у дорослих та старих мишей різних ліній. Так, у старих мишей лінії *FVB/N* загальне

число клітин у кістковому мозку вище, ніж у мишей лінії *CBA/Ca* того ж віку ($P < 0,05$). У дорослих мишей лінії *FVB/N* відносний вміст КУК-Ф перевищує в 1,4 рази значення показника дорослих мишей лінії *CBA/Ca*, а різниця між абсолютним вмістом цих клітин у старих мишей обох ліній стає вірогідно значущою ($P < 0,05$). У старих мишей лінії *FVB/N* абсолютний вміст КУК-ГМ ($339,5 \pm 90,0$) вище, ніж у мишей лінії *CBA/Ca* ($276,2 \pm 81,3$).

Висновки. У мишей різних ліній є відмінності щодо здатності мультипотентних стромальних клітин кісткового мозку до колонієутворення, які стають більш вираженими у старих тварин. Односпрямованість змін числа стромальних клітин-попередників у кістковому мозку мишей обох ліній вказує на загальне вікове підвищення здатності МСК КМ до проліферації. При старінні з'явилась різниця щодо загального числа ядровмісних клітин у кістковому мозку тварин різних ліній. Вивчення особливостей вікових змін функціонування кісткового мозку дозволить глибше зрозуміти механізми розвитку патологічних станів опорно-рухового апарату та може допомогти в розробці ефективних засобів індивідуальної корекції цих процесів.

АНАЛІЗ ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ, ЗАДІЯНИХ У МЕТАБОЛІЗМІ ЛІКІВ, ЩО ПРИЗНАЧАЮТЬ ХВОРИМ НА ГІПЕРТОНІЧНУ ХВОРОБУ

Н. Г. Горovenко*, С. В. Подольська, З. І. Россоха, Н. М. Левкович,
М. М. Долженко**

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

*Національна медична академія післядипломної освіти
ім. П. Л. Шупика МОЗ України, Київ

**Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України, Київ

Ген, який кодує фермент дебризокін-4-гідроксилазу (*CYP2D6*), локалізований на хромосомі 22q13.1 (*MIM*+124030), має виражений поліморфізм. Однонуклеотидна заміна в положенні 1934G-A гена *CYP2D6**4 призводить до втрати активності ферменту та появи фенотипу *PM* (*PM* — *poor metabolizer*, слабкий (повільний) метаболізатор). Ізофермент *CYP2D6* бере участь в метаболізмі більше 20 % лікарських засобів (ЛЗ), в тому числі великої кількості тих, що застосовуються в кардіології. Уповільнення метаболізму препаратів, що входять в схему стандартного лікування гіпертонічної хвороби, може викликати зниження очікуваної ефективності терапії і таким чином впливати на перебіг захворювання та частоту виникнення ускладнень.

Мета роботи — порівняти частоти виявлення генотипів за алейним варіантом *4 гена *CYP2D6* (*wt/wt*, *wt/*4* і **4/*4*) у групі хворих на гіпертонічну хворобу III ступеня з ускладненим перебігом і у населення України.

Обстежувані та методи. Обстежено 63 пацієнти з гіпертонічною хворобою III ступеня з ускладненим перебігом та 906 осіб групи контролю. Генотипи *wt/wt*, **4/wt* і **4/*4* визначали методом ПЛР-ПДРФ після попереднього виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові.

Результати. За результатами генотипування за алейним варіантом *CYP2D6**4 у жителів України нами було виявлено наступні частоти реєстрації генотипів: в групі дослідження *wt/wt* — 58,73 %, *wt/*4* — 31,75 % і **4/*4* — 9,52 %; у групі контролю — відповідно, 64,79 %, 31,35 % і 3,86 %. Нефункціональний алей *CYP2D6**4 при підрахунку у групі дослідження та в групі контролю виявлено з частотою 0,25 та 0,19, відповідно, а алей “дикого типу” *CYP2D6 wt* — з частотою 0,75 та 0,81, відповідно. У хворих на гіпертонічну хворобу III ступеня з ускладненим перебігом у порівнянні з особами групи контролю була вірогідно підвищена частота виявлення генотипу *4/*4 в гомозиготному стані за заміною ($\chi^2 = 14,98$, $OR = 2,62$, $CI: 1,15-6,68$) і знижена частота виявлення генотипу *wt/wt* у гомозиготному стані за “диким типом” ($\chi^2 = 4,71$, $OR=0,77$, $CI: 0,46-1,29$).

Висновки. Доведено вірогідну різницю частот виявлення генотипів *4/*4 та *1/*1 гена *CYP2D6* у осіб групи дослідження та групи контролю. Висока частота реєстрації генотипу *4/*4 гена *CYP2D6* у групі дослідження в порівнянні з групою контролю зумовлює доцільність визначення генотипу пацієнта за геном *CYP2D6* перед призначенням лікування тими ЛЗ, що метаболізуються ферментом *CYP2D6*, з метою вибору більш ефективної індивідуалізованої стратегії лікування.

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННЫХ СВЯЗЕЙ РАЗВИТИЯ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА В ХАРЬКОВСКОМ РЕГИОНЕ

Ю. Б. Гречанина, М. В. Снарская, Т. Д. Алиева

Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины

В структуре наследственных аномалий врожденные пороки сердца (ВПС) встречаются наиболее часто (приблизительно у 1 % новорожденных), сопровождаясь высоким уровнем инвалидизации и смертности. Этот факт делает чрезвычайно актуальным поиск путей профилактики ВПС, что, в свою очередь, требует изучения этиологических и патогенетических механизмов патологии. Этиология ВПС является мультифакторной, включая генетическую предрасположенность и влияние окружающей среды. Развитие эмбрионального сердца онтогенетически связано с миграцией клеток нервной трубки; процесс миграции особенно восприимчив к тератогенному действию гомоцистеина — биомаркера метаболизма фолатов.

Фолатный цикл (ФЦ) является поставщиком одноуглеродных фрагментов для процессов регенерации метионина, биосинтеза пуриновых нуклеотидов, метилирования ДНК и РНК. При изучении значимости полиморфизма генов ФЦ в развитии ВПС была отмечена существенная разнородность между популяционными результатами, которая была объяснена взаимоотношениями генотипа *MTHFR 677CT*, *MTRR 66AG* и статусом фолатного обмена на фоне внешнесредовых воздействий. Эпигенетический характер патологии требует дальнейшего изучения взаимоотношения генотип–окружающая среда с целью поиска путей профилактики.

Цель работы — исследование вклада генетических и внешнесредовых факторов в развитие ВПС в исследуемом регионе.

Обследуемые и методы. Проанализированы особенности родословных, молекулярных и цитогенетических характеристик 10 пациентов в возрасте 0–25 лет с ВПС.

Результаты. При анализе результатов обследования установлено, что в 2 случаях ВПС были изолированными, в 8 — комбинированные. В 1 случае комбинированного ВПС (тетрада Фалло) у пациента был выявлен хромосомный полиморфизм — спутничные нити по 13 хромосоме, в остальных кариотип был нормальным. Частота встречаемости полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTRR* у пациентов с ВПС была высокой (87,6 %), что согласуется с мировыми данными. Примечательно то, что в этой группе выявлена более частая встречаемость полиморфизма гена *MTRR* в гомозиготном состоянии по сравнению с таковым гена *MTHFR*. В одном случае у плода беременной с гомозиготным компаундом *MTRR/MTHFR* было выявлено трехкамерное сердце.

Отмеченная выраженная отягощенность по сердечно-сосудистой патологии в родословных обследованных пробандов может свидетельствовать о

накоплении мутационных событий в семьях больных до момента их клинической реализации под воздействием эпигенетических воздействий.

Выводы: 1. Наиболее значимым фактором развития ВПС может быть отягощенность генома полиморфизмом генов системы ФЦ в сочетании с возможной персистирующей инфекцией, что требует дальнейшего изучения.

2. в группу высокого риска могут быть отнесены пациенты с выраженной отягощенностью родословной по сердечно-сосудистой патологии.

3. преконцепционное исследование фолатного обмена у будущих родителей с индивидуальной коррекцией выявленных изменений может стать эффективным методом профилактики ВПС.

ЛЕЧЕНИЕ РЕФРАКТЕРНОЙ СТЕНОКАРДИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В. К. Гринь, С. И. Эстрин, А. Г. Попандопуло, Т. В. Кравченко,
Е. М. Денисова, Н. В. Сергиенко

ДУ “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака
НАМН Украины”, Донецк
Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького МЗ Украины

Несмотря на оптимальное использование медикаментозной терапии и методов механической реваскуляризации миокарда при ишемической болезни сердца (ИБС), проблема рефрактерной стенокардии остается актуальной. У большого количества пациентов сохраняются симптомы заболевания, высок процент инвалидизации. Клеточная терапия позволяет заместить поврежденные участки миокарда живыми функционирующими клетками путем неоангиогенеза в очаге ишемии.

Цель работы — изучить эффективность применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (аутоМСК) костного мозга путем интрамиокардиальных инъекций или внутривенного (в/в) их введения больным с рефрактерной стенокардией.

Обследуемые и методы. Обследовано 24 пациента с рефрактерной стенокардией (21 мужчина и 3 женщины) в возрасте от 46 до 68 лет с функциональным классом стенокардии II–IV. Всем выполнено катетерное электромеханическое картирование левого желудочка (ЛЖ) с помощью системы *Noga XR*, при котором выявлены обширные зоны гибернированного миокарда и рубцовые поля после перенесенных инфарктов. Оценивали количество приступов стенокардии в сутки, частоту госпитализаций, развитие инфарктов миокарда, летальность, качество жизни с использованием Миннесотского опросника. Пациенты были подразделены на 2 группы. Пациентам 1 группы ($n = 11$) сразу после завершения процесса картирования ЛЖ были выполнены инъекции аутоМСК с применением системы навигации *NOGA XR* (8–10 инъекций), а пациентам 2 группы ($n = 13$) — в/в введение.

Результаты. Период наблюдения составил 6–12 мес. Госпитализаций с острым коронарным синдромом или нарастанием сердечной недостаточности не было. При контроле у 21 пациента выявлена положительная динамика. В группе интрамиокардиального введения отмечено улучшение качества жизни по Миннесотскому опроснику на 13–38 баллов, а в группе внутривенного — на 24–45 баллов. Количество приступов стенокардии уменьшилось с 2–8 в сутки до 1–2 у пациентов обеих групп, улучшилась переносимость физических нагрузок. По данным ЭхоКГ, после интрамиокардиального введения на 5–10 % увеличилась фракция выброса ЛЖ и на 30–50 мл (до 10–12 % исходного объема), уменьшилось КДО ЛЖ, после внутривенного введения — на

3–8 % и 20–46 мл, соответственно. При контрольном картировании ЛЖ в первой группе у 9 из 11, а во второй группе у 10 из 13 пациентов отмечена положительная динамика, у 5 пациентов — данные без изменений. При этом зона гибернированного миокарда значительно уменьшилась или исчезла. На вольтажной униполярной карте увеличилась амплитуда электрограммы, что является свидетельством увеличения массы живого миокарда, на механической карте увеличилась амплитуда движения сегмента. При интрамиокардиальном введении наблюдалась более выраженная динамика — преимущественно исчезновение зон гибернации в зонах инъекций.

Выводы. Введение аутоМСК является безопасным и может быть использовано в практической медицине. Введение аутоМСК путем интрамиокардиальных инъекций несколько более эффективно, чем внутривенное введение, однако малое количество наблюдений не позволяет достоверно определить наиболее эффективный путь введения и требует дальнейшего исследования.

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ СУМІШІ НА ЖИТТЄВІ ПАРАМЕТРИ МИШЕЙ ВИСОКОРАКОВОЇ ЛІНІЇ

Т. П. Гулько, Л. І. Лихачова

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Важливим завданням медицини є як профілактика онкологічних захворювань, так і уповільнення росту пухлин, зменшення частоти утворення метастазів, подовження життя онкохворих. Для з'ясування питань етології, патогенезу, процесу росту пухлин та інших задач сучасна експериментальна онкологія широко використовує різні тваринні моделі, враховуючи при цьому їх особливості, переваги та недоліки, відповідність завданням, які поставлені.

Найбільш адекватним об'єктом експериментальної онкології є лінії гризунів (зокрема, мишей) з підвищеною частотою спонтанно виникаючих пухлин. У даній роботі використовували мишей високоінbredної та високоракової лінії *ICR*, яка стабільно підтримується в нашому інституті.

Метою роботи було вивчення впливу біологічно активної суміші (БАС) в якості добавки до щоденного раціону на життєві параметри мишей зі спонтанно виникаючими з високою частотою пухлинами молочної залози, як до виникнення пухлин з метою їх профілактики, так і в процесі їх зростання.

Комплексний препарат — БАС, яку ми пропонуємо, містить антиоксиданти, мікроелементи та інші компоненти, які забезпечують посилення захисних сил організму, стабілізацію геному, активацію процесів відновлення, регенерації та детоксикації. Кожний компонент суміші та дози, що рекомендуються, є природним, фізіологічним для організму та слугує в комплексі ефективним засобом як для запобігання утворення пухлин, так і для уповільнення патологічних процесів у випадку виникнення пухлин.

Використання БАС в якості добавки до щоденного раціону протягом тривалого часу позитивно впливало на загальний стан здорових та онкохворих мишей, сприятлива дія була відзначена також у відношенні їх розмноження та життєздатності їх потомства. Годування мишей БАС сприяє подовженню фази повільного росту пухлин та зниженню частоти виникнення метастазів, а головне — спостерігалась профілактична дія, тобто пухлини з'являлись у достовірно значно більш пізні строки.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МЫШИНЫХ БЛАСТОЦИСТ НА РАННИХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Т. П. Гулько, Е. Г. Дерябина, Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада,
В. И. Андриенко*, О. А. Маслова, С. Е. Рымарь, Л. И. Лихачева

ГУ ” Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Эмбриональные стволовые клетки (*ES*-клетки) представляют большой интерес как в плане фундаментальных исследований, так и возможного клинического применения. Удобными моделями для изучения эмбриональных клеток являются *ES*-клетки, изолированные из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты мышей. Культивирование бластоцист является важным этапом дальнейшего развития преимплантационных зародышей вне организма матери, при котором идет увеличение числа клеток ВКМ с сохранением их плюрипотентности.

Целью работы было получение мышинных зародышей на стадии бластоцисты, изучение особенностей их роста *in vitro*, идентификация гистохимическим методом по Гомори плюрипотентного состояния клеток ВКМ в бластоцисте и в культуре.

В опытах использовались половозрелые мыши линии *ICR*, которые являются потомством аутбредной популяции, полученной в Институте изучения рака (США) и длительно поддерживаемой путем инбредного размножения в виварии ИМБиГ НАН Украины. Животные этой линии характеризуются высокой плодовитостью, большой степенью жизнеспособности и выживаемости потомства. Использование метода суперовуляции яйцеклеток с помощью гормонов Фоллигона и Хориона давало возможность получать до 35 зародышей соответствующей стадии развития по сравнению с 15 при естественном покрытии самок. Жизнеспособные бластоцисты культивировали в среде *DMEM* с 20 % эмбриональной телячьей сыворотки на фидерном слое первичных мышинных фибробластов, инактивированных митомицином С. При культивировании преимплантационных мышинных зародышей были отмечены особенности их роста, который зависел прежде всего от состояния внутренней клеточной массы. В процессе культивирования полученные клоны эмбриональных клеток были перенесены с фидерного слоя в культуральную среду, дополненную *LIF* (*leukemia inhibitor factor*), в концентрации 1000 Ед/мл, что позволяло поддерживать культивируемые клетки в недифференцированном состоянии. Гистохимическим окрашиванием по Гомори выявляли экспрессию щелочной фосфатазы (одного из признаков стволовости *ES*-клеток) как на уровне клеток ВКМ бластоцисты, так и при культивировании. В обоих случаях имело место равномерное окрашивание, что указывает, вероятно, на сохранение стволовости клеток. Активность фермента

щелочной фосфатазы падала по мере дифференцировки краевых эмбриональных клеток, о чем можно было судить по снижению интенсивности окрашивания. Культивирование *ES*-клеток требует подбора условий для поддержания их в недифференцированном состоянии.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что данный метод получения бластоцист и культивирование ВКМ отвечает требованиям получения недифференцированных *ES*-клеток.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У МЫШЕЙ

Т. П. Гулько, Е. К. Топорова, С. П. Шпилевая*, Ю. В. Бойченко*,
В. А. Кордюм*

ГУ ”Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Сахарный диабет — одно из самых распространенных заболеваний человека, развивающееся из-за недостатка гормона (инсулина), что приводит к стойкому увеличению содержания глюкозы в крови. Последнее сопровождается выраженным нарушением гормональной регуляции углеводного обмена с проявлением в разной степени молекулярно-биологических, биохимических, патоморфологических изменений в разных системах организма. Использование экспериментальных моделей инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) для изучения особенностей его протекания и динамики патогенеза позволяет расширять наши возможности в разработке новых подходов к лечению этого многофакторного заболевания.

Цель работы — получение модели ИЗСД у мышей, изучение возрастных особенностей искусственного формирования эндокринной патологии, исследование нарушений деятельности физиологических систем и отдельных органов животных.

Материал и методы. Для получения модели экспериментального ИЗСД были использованы самцы мышей линии *C57BL/6J*, которым в течение 5 сут внутрибрюшинно вводили субдиабетогенные дозы стрептозотоцина (СТЦ) из расчета 45 мг на кг массы тела. Уровень глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью индикаторных полос “Темоглан” на фотометре “Глюкофот”. Забор крови производили из ретроорбитального венозного синуса мышей натошак.

Результаты. Анализ динамики развития гипергликемии у животных показал, что диабетогенное действие СТЦ проявляется у разных особей одной линии в зависимости от силы иммунного ответа на СТЦ. Животным, у которых диабет не развился или уровень гликемии был ниже 9 ммоль/л, через месяц повторно делали три инъекции СТЦ. Следует отметить, что в последнем случае развитие гипергликемии происходило более интенсивно. Уровень кахексии и выживаемость животных во время опыта коррелировали с уровнем гликемии. Процент гибели модельных животных с уровнем гликемии выше 25 ммоль/л через 2 мес после развития патологии возрастал до 90 %, что было следствием патологических процессов, происходящих в органах и тканях диабетических мышей. После окончания эксперимента (80 сут) был проведен качественный и количественный анализ содержания гликогена как индикатора состояния углеводного обмена в печени экспериментальных животных. Отмечена обратная корреляция уровня гликемии с накоплением

гликогена в гепатоцитах. Гистологическое исследование ткани печени показало значительные нарушения гистоструктуры ткани органа, дегенерацию гепатоцитов возле сосудов, очаги некрозов. В результате патоморфологического анализа препаратов почек диабетических мышей обнаружены глубокие проявления патологического процесса в виде атрофии клубочков, дистрофии канальцев и их некроза. Изучение системы оксида азота в тканях сердца, печени и почек выявило значительное повышение уровней стабильных метаболитов оксида азота, а также активности индуцибельной NO-синтазы.

Выводы. СТЦ-индуцированная модель диабета на грызунах несомненно представляет собой ценный материал для последующего выявления механизмов и конкретных звеньев патологических нарушений поддержания гомеостаза глюкозы в организме.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ У ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ: АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ

Н. Г. Даниленко, М. Г. Синявская, А. М. Левая-Смоляк*, О. А. Олейник, Е. П. Меркулова*, О. Г. Давыденко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Генетическая детерминация сенсоневральной тугоухости (СНТ) однозначно доказана. В 75–80 % случаев несиндромальная тугоухость наследуется по аутосомно-рецессивному типу, в 15–20 % — по аутосомно-доминантному, редко — сцеплена с X- или Y-хромосомами. Анализ ряда европейских популяций и групп пациентов с СНТ из разных стран выявил ведущую роль мутации *35delG* в гене коннексина 26 (*GJB2*) в этиологии данного заболевания. Кроме того, гораздо реже встречаются другие мутации в этом гене (*167delT*, *235delC*, *C254A*, *313–314delAA*, *360delG*), однако частота выявления каждой из них в различных европейских популяциях не превышает 1–2 % всех выявляемых мутаций. 1–5 % случаев тугоухости обусловлены мутациями в митохондриальном геноме, распространенность которых также варьирует в разных этнических группах.

Цель исследования — определение частоты мутации *35delG* в популяционных выборках этнических белорусов разных регионов страны, определение частоты выявления данной мутации у пациентов с СНТ 3–4 степени по ВОЗ, а также анализ встречаемости основных митохондриальных мутаций, ассоциированных с СНТ, в группе пациентов.

Обследуемые и методы. Обследованы 757 слышащих коренных жителей разных регионов Беларуси на наличие мутантного рецессивного аллеля *35delG* гена *GJB2*. Частота мутации в среднем по стране составила 5,35 %, что превышает уровень носительства этой мутации для жителей всех исследованных ранее европейских стран. Следует отметить, что были обнаружены значительные отличия частоты встречаемости данной мутации по регионам. Выявлены 2 региона с максимальной частотой — на севере Беларуси (6,1 %) и в Западном Полесье (10,2 %), минимальная частота отмечена на западе (Понеманье) — 2 % и на востоке страны — 3,9 %.

Результаты. При обследовании 261 пациента с СНТ у 112 (40,6 %) из них мутация *35delG* обнаружена в гомозиготном состоянии, у 31 (16,7 %) — в гетерозиготном состоянии, у 118 пациентов (42,7 %) мутация *35delG* не найдена. Таким образом, в группе пациентов мутация *35delG* выявлена более чем у 57 % обследованных, что доказывает ее значение как мажорной мутации и для белорусских пациентов. Среди пациентов с СНТ в двух семьях выявлена также митохондриальная мутация *A1555G* в гене *12S*. ДНК-диагностика дан-

ной мутации чрезвычайно важна — пенетрантность ее в среднем составляет 40 %, однако даже однократный прием ототоксичных аминогликозидных антибиотиков в 96 % случаев приводит к потере слуха у носителей этой мутации. У одного пациента в митохондриальном геноме обнаружена замена G→A в позиции 7444; данную замену относят к полиморфным в одних популяциях (Польша), и к патогенным — в других.

Выводы. Мутация 35delG в гене *GJB2* — основная причина развития СНТ у белорусских пациентов, тогда как митохондриальные мутации составляют примерно 1 %.

МЕЗЕНХИМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ПУПОВИНИ: ВИДІЛЕННЯ ТА МУЛЬТИПЛІКАЦІЯ *EX VIVO*

О. Г. Дерябіна^{1,2}, О. М. Сухорада^{1,2}, О. О. Маслова¹, С. П. Шпильова^{1,2},
Т. О. Рубан^{1,2}, Н. С. Шувалова¹, В. І. Андрієнко², С. М. Жукова³,
В. А. Кордюм^{1,2}

¹ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини” НАМН України”, Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

³Київський пологовий будинок № 5

Вивченню мезенхимальних стовбурових клітин (МСК) приділяють велику увагу в усьому світі як у фундаментальних, так і в клінічних дослідженнях. Така зацікавленість обумовлена багатьма чинниками, серед яких відносно просте культивування, існування специфічних маркерів, наявність імуносупресивної дії при використанні алогенного матеріалу, тощо.

Класичним джерелом МСК є кістковий мозок, але отримання клітин із нього є досить травматичною процедурою, що призвело до пошуку альтернативних джерел клітинного матеріалу. Останнім часом МСК активно виділяють із жирової тканини, а також із пуповинних крові та канатика; при цьому клітини з кордового матеріалу мають переваги перед іншими. Головними з таких переваг є більш високий проліферативний потенціал та потенціал до диференціації, а також виражені імуносупресорні властивості.

Нами був проведений цикл робіт по відпрацюванню отримання, мультиплікації *ex vivo*, характеристики на рівні різних пасажів у культурі клітин МСК з пупкового канатика людини. Метою цих досліджень була розробка уніфікованої та стандартизованої технології напрацювання клітинного матеріалу за максимальних фізіологічних умов в кількості, достатній для клінічного використання.

Було проведено порівняння різних методів виділення МСК пуповини — ферментативний із застосуванням різних ензимів, отримання клітин із пупкової вени та експлантів Вартонового геля. Перевірена ефективність використання різних варіантів поживних середовищ, сироваток, добавок, газового середовища для культивування. В результаті були визначені умови для виділення та напрацювання МСК пуповини.

Вивчені особливості цих клітин в пасажах. Характеристику проводили за морфологією, гістохімічно та за поверхневими маркерами, специфічними для МСК. Показано, що при культивуванні МСК поза організмом спостерігається зміна практично всіх характеристик, а також може мати місце спонтанна диференціація клітин в бік адипо- та хондроцитів.

Отримані результати слід мати на увазі при розробці критеріїв придатності клітинного матеріалу для введення його пацієнтові. Отримані результати свідчать про можливість клінічного використання лише клітин найнижчого рівня пасажів (0 та 1) в культурі, які максимально зберігають характеристики нативного матеріалу.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ИМАТИНИБОМ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОБЛАСТНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ

И. В. Дмитренко, Ж. Н. Минченко, И. С. Дягиль, В. Г. Федоренко

Научный центр радиационной медицины НАМН Украины, Киев

На сегодняшний день диагноз хронической миелобластной лейкемии (ХМЛ) окончательно верифицируют при обнаружении *Ph*-хромосомы или *BCR-ABL*-транскрипта. Определение этого генетического нарушения является не только диагностическим инструментом, но и фактором, определяющим стратегию и тактику дальнейшей терапии больных ХМЛ.

Цель работы — исследование цитогенетических и молекулярно-генетических нарушений, специфичных для ХМЛ, а также их прогностического значения в отношении ответа на терапию.

Обследуемые и методы. Обследованы 523 больных ХМЛ из 25 областей Украины в возрасте от 18 до 80 лет на момент заболевания. Диагностику и мониторинг ХМЛ проводили на основании результатов цитогенетического исследования клеток костного мозга методом дифференциальной окраски хромосом и молекулярно-генетического исследования экспрессии химерного гена *BCR-ABL* в клетках костного мозга и периферической крови методом РТ-ПЦР. 35 % пациентов получали иматиниб в качестве терапии первой линии и 65 % были предлечены различными препаратами (гидроксимочевина, бусульфан, интерферон). Длительность предлеченности составляла от 4 до 120 мес. Цитогенетический и молекулярный мониторинг проводили через 6 и 12 мес лечения иматинибом. Критерием оптимального ответа было достижение большого цитогенетического ответа через 6 мес и полного цитогенетического ответа через 12 мес терапии иматинибом.

Результаты. У всех пациентов в дебюте заболевания имела место транслокация $t(9;22)$, характерная для ХМЛ. У 6 % пациентов выявлены комплексные нарушения кариотипа (дополнительные к $t(9;22)$ хромосомные аномалии, добавочная *Ph*-хромосома), а также появление вариантных транслокаций $t(9;22)$ с вовлечением дополнительных хромосом, приводящих к образованию $der(22)t(9;22)$. Среди обследованных больных в 60 % случаев экспрессировался *b3a2 BCR-ABL*-транскрипт, в 36 % случаев — *b2a2*, в 1 случае (0,2 %) наблюдалась экспрессия исключительно *e1a2*-транскрипта и в 3,8 % — коэкспрессия нескольких транскриптов *BCR-ABL*. Полный цитогенетический ответ был достигнут у 35 % пациентов, частичный цитогенетический ответ с уровнем *Ph*-хромосомы <35 % — у 25 %, 40 % пациентов имели более 35 % *Ph*-позитивных клеток в костном мозге через 1 год терапии

иматинибом. Среди пациентов, у которых были выявлены вариантные транслокации $t(9;22)$, наблюдалась тенденция к снижению вероятности достижения оптимального ответа через год терапии иматинибом. Появление других клональных хромосомных нарушений в *Ph*-позитивных клетках достоверно сокращало бессобытийную и общую выживаемость пациентов с ХМЛ. Не выявлено достоверных различий в достижении полного цитогенетического ответа через год терапии иматинибом у пациентов с различными вариантами транскрипта *BCR-ABL*. Прогностическое значение коэкспрессии транскриптов *BCR-ABL* остается неопределенным.

ВПЛИВ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА *TP53* І ГЕНА ХЕМОКІНОВОГО РЕЦЕПТОРА *CCR5* НА РИЗИК ВИНИКНЕННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У ЖІНОК З УКРАЇНИ

С. П. Довженко, С. В. Подольська, Н. Г. Горovenko

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Ген-супресор *TP53* забезпечує негативну регуляцію експресії генів клітинного циклу і ангиогенезу, промоції апоптозу, контролює геномну стабільність клітин. У промоторних зонах багатьох генів, які беруть участь в контролі клітинного росту, знаходиться *p53*-зв'язуючий домен. Поліморфізм *G199C* в 4 екзоні гена *TP53* приводить до заміни аргініну на пролін, що може впливати як на процеси затримки клітинного циклу, так і на процеси апоптозу. Поліморфізм *G13494A* в 6 інтроні знижує рівень експресії *p53*, що відображається на ефективності і репарації ДНК і апоптозу. Поліморфізм *CCR5del32* змінює функціональну активність синтезованого білка, що впливає на ініціацію транскрипційної активності *TP53*. Зниження чутливості до сигналів, які надходять від *CCR5*, відбувається внаслідок заміни *G199C* у 4 екзоні гена *TP53*. Онкологічний ризик може визначатись індивідуальним генотипом, що формується комбінативним поєднанням взаємодіючих поліморфних алелів функціонально пов'язаних генів.

Мета роботи — вивчення розподілу поліморфних варіантів гена *TP53* (4 екзон, 6 інтрон) і гена *CCR5del3* та їх комбінацій у жінок з раком молочної залози (РМЗ) різних вікових груп з України.

Обстежувані та методи. Обстежено жінок із РМЗ ($n = 170$) та жінок без обтяженого онкологічного анамнезу ($n = 201$) у віці від 18 до 84 років, які проживають в Україні. Обстежених було розподілено за віком на підгрупи: 18–40 років, 41–55 років, 56–84 років. Середній вік у групах був порівняним. Виділення ДНК проводилось з лейкоцитів периферійної крові. Алельний поліморфізм для гена *CCR5del32* визначався методом ПЛР, для гена *TP53* (4 екзон, 6 інтрон) — методом ПЛР-ПДРФ.

Результати. Не було виявлено вірогідної різниці з контролем розподілу частот алельних варіантів гена *TP53* в 4 екзоні і 6 інтроні як в загальних групах, так і в залежності від віку. Було виявлено вірогідну різницю підвищення частоти (*wt/del*) поліморфізму гена *CCR5* у жінок, хворих на РМЗ 41–55 років (27,42 %) порівняно з жінками 18–40 років (11,29 %; $\chi^2 = 5,17$, $P = 0,023$). Визначено вірогідну різницю підвищення частоти (*wt/del*) поліморфізму у жінок з РМЗ 41–55 років (27,42 %, $\chi^2 = 7,32$, $P = 0,0038$) у порівнянні з контролем (7,69 %). Було виявлено асоціацію комбінацій гетерозиготних генотипів генів (*wt/m*) *TP53* (4 екзон) і (*wt/del*) *CCR5* у жінок віком 41–55 років, хворих на РМЗ, що мала вірогідну різницю з контролем ($\chi^2 = 4,83$, $P = 0,028$).

Висновки. Ризик розвитку РМЗ для жінок 41–55 років може бути асоційований з генетично детермінованим компонентом, а саме (*wt/del*) поліморфізмом гена *CCR5* і комбінацією гетерозиготних генотипів (*wt/del*) *CCR5*+ (*wt/m*) *TP53* (4 екзон). Такі асоціації комбінацій, що виникають в результаті порушення балансу процесів клітинного циклу, можуть сприяти накопиченню генетично змінених клітин і розвитку онкологічного процесу.

ЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВАКЦИНАЦІЇ

В. І. Задорожна, А. Ф. Фролов, Г. В. Мойсеєва

ДП “Центр імунобіологічних препаратів МОЗ України”, Київ

Етичні проблеми, пов’язані з вакцинацією, постали перед людством ще з часів Е. Дженнера, який у 1796 р. після тривалих сумнівів вирішився випробувати своє теоретичне припущення щодо захисту від природної віспи переохворілих на коров’ячу віспу на 8-річній дитині. Незважаючи на те, що вже минуло понад 200 років, а вакцинацію визнано як одне з найважливіших досягнень людства та найефективніший профілактичний засіб, активісти антивакцинальної кампанії продовжують звинувачувати Дженнера в антигуманності та в тих глобальних, як біологічних, так і соціальних “негативних” наслідках, які натеper намагаються приписати імунопрофілактиці (аутизм, соматичні захворювання, порушення прав людини тощо). Навіть вигадали термін “вакциноз”, який називають “чумою 21-го сторіччя” та застосовують у контексті з інфекційними хворобами. З кожним роком збільшується кількість як інфекційних, так і соматичних хвороб, що розвиваються внаслідок інфікування людини інфекційними агентами, для яких існують засоби специфічної профілактики. Застосування інноваційних технологій при виготовленні вакцинних препаратів (атенуйовані, інактивовані, рекомбінантні, віросомальні вакцини), зокрема перещеплювальних клітинних культур для виробництва вірусних вакцин, штамів бактерій та дріжджів, які є продуцентами протективних антигенів при отриманні рекомбінантних вакцин, спрямовано на підвищення безпечності вакцинопрофілактики та її ефективності. Однак окремих випадків післявакцинальних реакцій, які є короткочасними та минають без негативних наслідків для організму реципієнта вакцини, та ускладнень, які зустрічаються надзвичайно рідко, не можна уникнути, що спостерігається і при застосуванні будь-яких лікарських засобів. Прикладом може бути вакциноасоційований паралітичний поліомієліт (ВАПП), ймовірність виникнення якого становить 1 випадок на 1–10 млн. використаних доз вакцини, і який призводить до такого ж ступеня інвалідності захворілого, як і захворювання, що викликане “диким” поліовірусом. У той же час, лише за рахунок широкомасштабного застосування живої поліомієлітної вакцини 3 регіони ВОЗ вдалося сертифікувати як такі, що вільні від циркуляції “дикого” поліовірусу, та щорічно попереджати понад 350 тис. випадків паралітичного поліомієліту. Однак на фоні припинення циркуляції “дикого” поліовірусу кожний випадок ВАПП має розглядатися як надзвичайна ситуація, яка лягає фізичним, моральним, економічним тягарем на хворого, його родину, суспільство загалом.

Окремого обговорення потребує питання морального стану медичних працівників, причетних до вакцинації такої дитини. Такі випадки сприяють формуванню негативного ставлення населення до вакцинації (у тому числі

до медичних працівників, що займаються цією проблемою), збільшенню кількості відмов від щеплень. Зазначене, у свою чергу, призводить до накопичення прошарку сприйнятливих осіб та виникнення епідемічних спалахів, етіологічно пов'язаних з "диким" поліовірусом, завезеним з ендемічної території, що в даний час спостерігається в Таджикистані. В Україні з метою профілактики ВАПП до календаря щеплень для вакцинального комплексу введено інактивовану поліомієлітну вакцину. Реєстрації кожної нової вакцини передують спочатку доклінічні дослідження, потім 3 фази клінічних досліджень. Останні проводяться за участю волонтерів з обов'язковою їх письмовою згодою та дозволом етичної комісії. При призначенні вакцини вагітним та іншим особам з декретованих груп у кожному окремому випадку необхідно оцінити ймовірні ризик/користь від прийому препарату. Введенню до календаря щеплень тієї чи іншої вакцини (особливо тих, що входять до розділу "щеплення за віком") передують розрахунки щодо визначення економічної ефективності такого заходу. В окремих випадках вирішується питання про проведення кампаній масової імунізації, спрямованих на припинення епідемічного спалаху та циркуляції збудника. У зв'язку з використанням великого обсягу доз за короткий проміжок часу зростає в цей період і кількість післявакцинальних реакцій, ускладнень та несприятливих подій, що співпадають у часі з вакцинацією. Зазначене потребує постійної співпраці із засобами масової інформації, медичною спільнотою та індивідуального підходу до кожного реципієнта вакцини.

МОЖЛИВОСТІ СПРЯМОВАНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ МЕТОДАМИ КЛІТИННИХ ТА ЦИТОКІНОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

В. М. Запорожан, О. Л. Холодкова

Одеський державний медичний університет МОЗ України

Методи регенеративної медицини застосовують для стимуляції фізіологічних процесів репарації та регенерації функцій, що втрачені. До найбільш поширених в експериментальних та клінічних дослідженнях належать технології, які передбачають застосування цитокінів та стовбурових (прогеніторних клітин).

Функцією цитокінів є мобілізація та активація широкого кола клітин-мішеней: регуляція їх росту та функціональної активності. Цитокіни застосовують для стимуляції продукування та викиду у кров з депо власних стовбурових клітин, підсилення неоваскуляризації, а також відтворення тканин, що уражені. Доведена ефективність використання цитокінової терапії при такій експериментально індукованій патології, як інфаркт міокарда, токсичний гепатит з ознаками печінкової недостатності, гостре хімічне ураження яєчок та ін.

Потенційно більш перспективними для регенеративної медицини є стовбурові та прогеніторні клітини (до яких включають незрілі клітини, що почали диференціюватися у певному напрямку). У якості терапевтичного агенту клітини застосовують у вигляді клітинних сумішей, біоінженерних конструкцій, створених на основі скаффолдів, а також у вигляді так званих штучних органів та тканин. На цей час позитивні результати отримані при застосуванні клітинної терапії за умов ішемічного ураження головного мозку, нейродегенераторних захворюваннях, при створенні серцевих клапанів та вирощуванні судин різного калібру.

Наявні дані показують високу перспективність у застосуванні біотехнологій у регенеративній медицині і необхідність спрямованих фундаментальних досліджень біології стовбурових та прогеніторних клітин з метою їх широкого використання у клініці.

КЛІТИННА ТЕРАПІЯ КІСТКОВИХ ПЕРЕЛОМІВ ІЗ ПОРУШЕНИМИ ПРОЦЕСАМИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ

Д. О. Зубов, О. С. Мовчан*

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

*Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика
МОЗ України, Київ,

Існує загальна проблема сповільненої консолідації переломів кісток, що потребує вирішення. Прикладне значення проблеми полягає в можливості оптимізувати процеси загоєння кісткових ран із використанням клітинних технологій.

Відомо, що імунна система ретельно контролює процеси фізіологічної та репаративної регенерації кістки, в результаті чого зберігається її цілісність як органа (Aaron J., Choi Y., 2000). Але існують порушення остеорепаративного процесу, що спричинені явищем “остеогенної недостатності”, яке обумовлене руйнуванням камбію кісткової тканини, та, як наслідок, клітини не можуть реалізувати свої гістобластичні потенції, спрямовані на відновлення кістки, що призводить до її тривалого незростання чи субституції волокнистою сполучною тканиною (Гололобов В. Г. та співавт., 2004). Незважаючи на те, що при репаративному остеогенезі нібито є передумови для повного відновлення втраченої кісткової тканини в результаті згаданої “остеогенної недостатності”, кількість ускладнень, пов’язаних з порушенням або сповільненням загоєння кісткової рани після травматичного пошкодження, залишається достатньо високою, і, за даними різних авторів, коливається від 2,5 % (Claes L., Willie B., 2007; Романенко К. К., 2002; Горидова Л. Д., Романенко К. К., 2000) до 25 % (Афаунов А. И., Афаунов А. А., 1999; Гайдуков В. М., 1995). У теоретичному плані залишається невирішеним питання: за рахунок яких механізмів культивовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (МСК) та клітини імунної системи, що привертаються до рани, сприяють остеогенезу та дозволяють відновити цілісність кісткової тканини. Необхідно, зокрема, дослідити функціонально-фенотипові особливості та можливі механізми взаємодій остеогенних клітин та клітин імунної системи. Отже, на визначення імунних властивостей некомітованих та комітованих за остеогенним шляхом МСК в аспекті клітинної моделі *in vitro* й спрямовано мету та завдання наших досліджень.

У проведених дослідженнях здійснено визначення ефективності остеогенної індукції МСК кісткового мозку людини, що крім прояви характерних ознак відповідного диференціювання призводить до змін рецепторного апарату та динаміки цитокінової продукції досліджуваними клітинами з можливістю стимуляції остеорепаративного процесу за рахунок остеοімуних гуморальних та клітинних взаємодій. На основі розробленої *in vitro* клітин-

ної моделі остеогенної індукції показано, що кістковомозкові МСК людини секретують ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8 і ФНП- α та експресують поверхневі мембранні антигени — *CD44*, *CD166*, *CD58*, *CD62L*, *CD29*, *CD49b*, *CD49c* і *CD54* (Зубов Д. О., 2008). Клінічні спостереження дозволяють вважати, що трансплантовані аутологічні МСК в реципієнтному ложі можуть взаємодіяти з життєздатною кістковою тканиною із формуванням процесів, подібних до фізіологічного ремоделювання.

Таким чином, одержаний клінічний матеріал дозволяє зробити висновок, що трансплантація культивованих аутологічних МСК кісткового мозку сприяє процесам остеогенезу і дозволяє відновити цілісність кісткової тканини при її дефектах за рахунок участі в остеорепарації вивчених імунних механізмів.

АНТИГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ТЕРБИНАФИНА В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНОК *CANDIDA ALBICANS*

Н. Н. Иванова

ГУ “Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины”, Харьков

В организме человека 70–80 % бактериальных инфекций сопровождается образованием биопленок. Биопленки способны образовывать все микроорганизмы, которые имеют отношение к атопическому дерматиту. Среди грибов особое место занимают инфекции, вызываемые *Candida spp.* (прежде всего, *Candida albicans*). Матрикс, продуцируемый клетками в биопленках, обеспечивает физическую защиту клеток от факторов иммунной системы, от бактериофагов, затрудняет и замедляет проникновение антибиотиков, что способствует высокой резистентности к ним. Резистентность биопленок к противогрибковым препаратам является сложным многофакторным феноменом, который может определяться различными механизмами, включая экспрессию генов резистентности, особенно тех, которые кодируют функцию насосов подачи питательных веществ.

Нами была изучена возможность ингибирования формирования биопленок липосомальными формами антигрибковых препаратов. Лекарства, упакованные в наноконтейнеры, становятся более эффективными и безопасными, попадают к органам-мишеням и позволяют снизить терапевтические дозы препаратов, которые используются для лечения грибковых инфекций, а также сократить сроки лечения, снизить токсичность лечебных средств, упакованных в липосомы и нановезикулы.

При определении минимально ингибирующей концентрации (МПК) липосомального тербинафина в отношении биопленок *Candida albicans* было найдено, что МПК липосомальной формы тербинафина снижалось по сравнению с МПК интактного тербинафина в 4–8 раз. Введение в культуральную среду биопленок *Candida albicans* аутоиндуктора системы *Quorum sensing* (фарнезола) и липосомальной формы тербинафина приводило к повышению их чувствительности к тербинафину в 16 раз.

Таким образом, полученные данные показывают, что липосомальный тербинафин является высокоэффективным по отношению к биопленкам *C. albicans* и свидетельствуют о возможности применения липосомальных антигрибковых препаратов при лечении кандидоза.

УЛУЧШЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КАРДИОМИОЦИТЫ

Д. И. Иванюк, Т. Сарич*, А. Г. Попандопуло, Ю. Хешелер*,
В. К. Гринь

ГУ “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака
НАМН Украины”, Донецк

*Институт нейрофизиологии Кельнского университета, Кельн, ФРГ

Эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ЭСК и ИПСК, соответственно) — производные 3 зародышевых листков эктодермы, мезодермы, энтодермы — способны к самообновлению и спонтанной дифференцировке в разные ткани. В соответствующих условиях ЭСК и ИПСК могут дифференцироваться в специализированные кардиомиоциты (КМ), однако эффективность спонтанного дифференцирования обычно низка и варьирует от эксперимента к эксперименту.

Цель работы — найти химические соединения, способные направлять дифференцирование мышечных ЭСК и ИПСК в КМ, разработать улучшенный протокол для постоянного получения высокого числа ЭСК и ИПСК производных КМ и предложить возможный механизм действия данных соединений.

Материал и методы. На основе литературного анализа были выбраны химические соединения, способные индуцировать дифференцировку в КМ. Их эффективность тестировалась в 2 линиях ЭСК и 1 линии ИПСК. Кардиогенный потенциал веществ оценивали в трансгенных линиях мЭСК ($\alpha Pig44$) и ИПСК ($AT25$) клеток по проценту *EGFP*-положительных клеток, экспрессирующих данный белок и резистентность к пуромицину под контролем кардиоспецифичного *MLC2- α* -промотора методом проточной цитофлуориметрии, по числу сокращающихся кластеров и α -актинин-положительных клеток в линии мЭС *CGR8*. Общее количество КМ в линиях $\alpha Pig44$ и $AT25$ определяли после трипсинизации очищенных пуромицином кардиокластеров и подсчета числа витальных клеток. Также оценивали уровень экспрессии кардиальных генов *Nkx2.5*, *GATA4*, αMHC методом *RT-PCR*. Спонтанное дифференцирование ЭСК и ИПСК запускали формированием эмбрионидных телец в среде *IMDM*, содержащей 20 % *FBS*, а также (в течение первых 2 сут дифференцирования) тестируемые химические соединения.

Результаты. Из 4 выбранных соединений (дорсоморфин, циклоспорин А, цАМФ, аскорбиновая кислота) только аскорбиновая кислота (АК), способствовала стабильному дифференцированию ЭСК и ИПСК в КМ. Воздействие АК значительно увеличивало число *GFP*-положительных кле-

ток и площадь сокращающихся кластеров в эмбриоидном теле, усиливало экспрессию всех тестируемых кардиальных маркеров. Общее число КМ в группе с АК в 2–5 раз превышало число КМ, полученных в контрольной группе. АК увеличивало также число кардиоваскулярных предшественников, положительных по *flk1*-маркеру, на ранних этапах дифференцирования (3-и сут) в линии ИПСК. Эффект АК частично снижался ингибитором $TGF-\beta$ сигнального пути *SB431542*. Эти данные указывают на возможные механизмы действия аскорбиновой кислоты в улучшении дифференцирования мЭСК и ИПСК в КМ.

ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В СПОРТЕ

В. Н. Ильин, С. Б. Дроздовская

Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Киев

В последние годы отмечается стремительное развитие спортивной генетики, в арсенале которой появились высокоэффективные экспериментальные технологии, обеспечивающие возможность определения молекулярных механизмов наследования физических и психических качеств человека. Этот прогресс, несомненно, связан с общими успехами в области молекулярной биологии и генетики. В частности, расшифрована структура генома человека, разрабатываются скоростные и недорогостоящие методы массового секвенирования геномов. Одним из итогов изучения генома человека стало появление и развитие качественно нового раздела спортивной генетики — молекулярной генетики физической активности. Характерной особенностью молекулярной генетики мышечной деятельности, основанной на данных о молекулярной структуре генома человека, является ее индивидуальный характер. В сфере спорта она направлена на коррекцию процесса профессиональной подготовки спортсмена с учетом уникальных особенностей его конкретного генома. Изучение связи спортивных достижений человека с определенными генами, белковые продукты которых (структурные белки, гормоны, рецепторы, ферменты) могут прямо или косвенно участвовать в развитии двигательной функции, является одним из наиболее перспективных направлений в спортивной генетике.

Перспективы применения достижений молекулярной генетики в спорте весьма многоплановы и включают в себя следующее: идентификацию генов, ответственных за формирование, развитие и проявление двигательных качеств человека; анализ генетических систем, ответственных за метаболический ответ организма при выполнении различных по энергетическому обеспечению физических нагрузок; создание генетической карты человека, отражающей локализацию специфических генов и генетических семейств, связанных с двигательными качествами человека, и выявление их расположения на отдельных хромосомах; развитие методов ДНК-технологий, основанных на современных достижениях молекулярной генетики для выявления отдельных генов и их семейств, а также продуктов экспрессии таких генов в процессе подготовки спортсменов; развитие и использование новых технологий подготовки спортсменов, основанных на генетической предрасположенности к выполнению физических нагрузок. Полученные в настоящее время факты позволяют отметить, во-первых, значительную роль ряда генов в достижении высоких спортивных результатов и, во-вторых, активное воздействие физических нагрузок, составляющих основу многолетней подготовки спортсменов, на экспрессию генов и усиление синтеза их конечных продуктов — бел-

ков, что приводит к существенным изменениям значений метаболических и морфофункциональных показателей. Использование новых ДНК-технологий может служить научной основой построения программ многолетней подготовки спортсменов с учетом их индивидуальных генотипических возможностей. В последнее время популярными становятся исследования в области фармакогенетики. Применение различных схем фармакологической коррекции процесса подготовки спортсменов должно носить индивидуальный характер. Это связано с тем, что восприимчивость к фармакологическим препаратам и пищевым веществам передается по наследству и зависит от множества генов. Для достижения высоких результатов в спорте особую значимость имеет подход фармакологической регуляции экспрессии генов, отвечающих за физическую работоспособность и развитие морфологических признаков человека, а также определение генетических особенностей, обуславливающих индивидуальные различия в фармакокинетике и фармакодинамике отдельных препаратов. Главной задачей спортивной фармакогенетики является повышение спортивной работоспособности спортсменов, т. е. расширение возможностей адаптации организма спортсмена к физическим нагрузкам за счет фармакологических средств с учетом его генетической конституции. Решение этой задачи фармакологическими средствами и пищевыми веществами с использованием ДНК-технологий возможно за счет решения двух частных задач спортивной фармакогенетики: 1) выявление слабых и сильных сторон организма спортсмена (определение генетического потенциала) и направленная регуляция экспрессии генов, участвующих в адаптации организма спортсмена к физическим нагрузкам, разрешенными фармакологическими средствами и пищевыми веществами (увеличение экспрессии малоактивных аллелей генов, подавление экспрессии гиперактивных аллелей генов, увеличение экспрессии одних генов с целью компенсации малой или отсутствующей активности других); 2) лечение различного рода заболеваний, травм, нарушений функций организма с применением индивидуального подхода к конкретному спортсмену (подбор лекарственных средств и их режима дозирования с учетом генетической конституции спортсмена с целью повышения эффективности лечебного воздействия и профилактики побочных эффектов на лекарственные средства).

Проблемы. Бурное развитие генетики физической активности и коммерциализация этой сферы рождает ряд проблем, одними из которых являются проблемы генного биоэтики и допинга. Спортивной международной общественностью обсуждаются следующие аспекты: кто и с какой целью имеет право проводить генетические исследования; кому принадлежит право собственности на генетическую информацию, как она должна использоваться и храниться; нужно ли учитывать данные генетического тестирования при профессиональном отборе и страховании жизни; геномные исследования не могут быть основанием для любой формы дискриминации или для доказательства биологического превосходства отдельных индивидуумов и групп. Генный допинг — это «нетерапевтическое применение клеток, генов, генети-

ческих элементов или модуляторов экспрессии генов, обладающих способностью повышать спортивные результаты”. Экспрессия генов — это в конечном итоге синтез закодированных в них белков. Под определение “генетические элементы” подходят, например, модифицированные гены, а “модуляторы экспрессии” — это, в частности, разные типы РНК, которые переносят информацию из ДНК или регулируют синтез белков. В отличие от других видов допинга генетический невозможно поймать. Впрочем, специалисты утверждают, что наводкой может быть внешний вид атлета. Скажем, рельефная мышечная масса подскажет, что такой допинг применялся. Но уличить генетического гладиатора будет непросто. Потребуется мышечная биопсия с помощью громоздкого и сложного прибора, причем проба ткани должна быть взята именно с того участка, куда внедрен ген-пришелец. Внедрение гена — “лотерея” с непредсказуемыми последствиями. Спортсмен после введения генетического препарата может проститься с жизнью. Если к обычному допингу организм может со временем адаптироваться, то новые гены, попавшие в организм, могут влиять пожизненно.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЗАНЯТИЯМ РАЗНЫМИ ВИДАМИ СПОРТА

В. Н. Ильин, В. Е. Досенко, С. Б. Дроздовская

Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Киев
Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев

Стремительное развитие молекулярно-генетических методов и формирование молекулярной генетики мышечной деятельности позволило совершенствовать процесс спортивного отбора при помощи генетических маркеров. В качестве генетических маркеров чаще всего используются ДНК-полиморфизмы. Поскольку физические качества формируются полигенно, для наиболее благоприятного развития качества необходимо сочетание полиморфизмов многих генов.

Цель исследования — определить наиболее благоприятные для занятий разными видами спорта комбинации полиморфизмов генов.

Обследуемые и методы. Обследованы 263 чел.: 93 спортсмена, занимающихся скоростно-силовыми видами с преобладанием анаэробного энергообеспечения; 86 спортсменов, занимающихся видами спорта с преимущественно аэробным энергообеспечением; контрольную группу составили 84 чел. Методом ПЦР определяли *I/D*-полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*), *R/X*-полиморфизм гена α -актина-3 (*ACTN*), *Pro12Ala*- α полиморфизм гена γ -рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом (*PPAR γ*), *T(-786)→C*-полиморфизм промотора гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*), *Tag1 A*-полиморфизм гена дофаминового рецептора II типа (*DRD2*), *C*-аллель *C-1306T*-полиморфизм гена металлопротеиназы-2 (*MMP2*), *Gly422Ser*-полиморфизм гена эластина (*ELN*).

Результаты. Установлено, что к алеллям “скорость-сила”, способствующим физической работоспособности и достижению высокого спортивного результата в скоростно-силовых видах, относятся *D*-аллель *I/D*-полиморфизма гена *ACE*, *R*-аллель *R/X*-полиморфизма гена *ACTN*, *Ala*-аллель *Pro12Ala*-полиморфизма гена *PPAR γ* . На основании результатов наших исследований можно прийти к выводу, что *T*-аллель *T(-786)→C*-полиморфизма гена *eNOS*, *A2*-аллель *Tag1 A*-полиморфизма гена *DRD2* также способствуют высокой работоспособности в этих видах спорта. Группы спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами легкой атлетики, достоверно отличаются между собой по частоте встречаемости аллелей “скорость/сила”: *D*-аллели (*ACE*), *R*-аллели (*ACTN*) и *Ala*-аллель (*PPAR γ*). Доказано, что полиморфизмы генов, участвующих в метаболизме соединительных тканей, также влияют на работоспособность в разных видах спорта. В группе высококвалифицированных спортсменов, занимающихся видами спорта с преимущественно аэробным энергообеспечением, частота встречаемости *G/G*-генотипа (ген *ELN*)

выше, а *A/A*-генотипа — значительно ниже, чем в контрольной группе. Это может свидетельствовать о том, что *G*-аллель способствует выполнению длительной физической работы аэробного характера. Редко встречаемый *T/T*-генотип гена *MMP2* в группе спортсменов, занимающихся видами спорта с анаэробным энергообеспечением, встречается на 13,3 % чаще, чем в группе спортсменов аэробных видов спорта. Поскольку продукт этого гена принимает участие в обмене коллагеновых структур, возможно, что при интенсивных физических нагрузках скоростно-силового характера более высокий уровень этих процессов, обусловленный *T/T*-вариантом гена, способствует физической работоспособности.

Выводы. Информация о генетических маркерах может использоваться тренерами для отбора перспективных спортсменов, выбора индивидуального подхода к тренировкам, правильного построения процесса тренировочных занятий, предупреждения отрицательного эффекта тренировок (гипертрофии сердечной мышцы). Наиболее благоприятной для выполнения работы анаэробного характера является композиция следующих полиморфизмов: *D/D* (*ACE*)- *R/R* (*ACTN*)- *T/T*(*eNOS*)-*Ala/Ala*(*PPAR γ*)- *A2/A2*(*DRD2*)-*T/T*(*MMP2*); для работы аэробного характера — *I/I* (*ACE*)- *X/X* (*ACTN*)-*T/T*(*eNOS*)- *Pro/Pro*(*PPAR γ*)- *C/C*(*MMP2*)- *G/G* (*ELN*).

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АКФ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ КОНЬКОБЕЖЦЕВ

А. В. Ильютик, И. Л. Гилеп, И. Н. Рубчя

Белорусский государственный университет физической культуры, Минск

Молекулярная генетика физической активности — развивающееся направление медико-биологических исследований. Согласно обнаруженным эффектам полиморфизмов генов, выделяют аллели, ассоциированные с развитием основных физических качеств человека. Так, установлена ассоциация инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензинконвертирующего фермента (АКФ) (*I/D*) с ростом спортивных результатов. Спортсмены с генотипом *DD* гена АКФ в большей степени предрасположены к развитию скоростно-силовых физических качеств, а с генотипом *II* — к выполнению длительной физической работы (*H. Montgomery*, 1999, В. А. Рогозкин, 2003, И. И. Ахметов, 2009).

Цель исследования — изучение связи полиморфизма гена АКФ с показателями физической работоспособности высококвалифицированных конькобежцев на разных этапах годичной подготовки.

Материал и методы. Изучали показатели, характеризующие уровень физической работоспособности и частоты сердечных сокращений (ЧСС) в различных зонах энергообеспечения: на уровне порогов аэробного и анаэробного обмена, в смешанных и анаэробной зонах энергообеспечения. В качестве тестирующей нагрузки применяли субмаксимальный велоэргометрический тест со ступенчатовозрастающей нагрузкой. Проанализированы данные тестирования 10 высококвалифицированных конькобежцев (МС и МСМК). Обработаны данные 36 обследований.

Результаты. Показано, что физическая работоспособность спортсменов с генотипом *DD* достоверно отличается от значений ее показателей у спортсменов других групп ($P < 0,05$). Конькобежцы с *DD*-генотипом в большей степени склонны к развитию двигательных качеств со скоростно-силовым компонентом. Это подтверждается более высоким уровнем максимального накопления лактата в крови, чем у конькобежцев других групп во время тестирования, что свидетельствует о лучшей степени развития гликолического механизма энергообеспечения. Концентрация лактата в крови (в ммоль/л) после тестирования составляла $9,9 \pm 0,1$, $7,1 \pm 1,3$ и $6,6 \pm 1,5$ у носителей *DD*-, *ID*- и *II*- генотипов ($P < 0,05$). Физическая работоспособность конькобежцев с гомозиготным *DD*-вариантом гена АКФ достоверно ниже, чем у спортсменов-носителей *I*-аллеля, в аэробной зоне (на уровне лактата в крови 2 ммоль/л) и на уровне порога анаэробного обмена (лактат 4 ммоль/л). При этом значение показателей работоспособности в смешанной анаэробно-аэробной зоне (лактат 8 ммоль/л) и показателей специальной работоспособности, проявляемой

преимущественно за счет гликолиза (лактат 10 ммоль/л), в течение рассматриваемого периода подготовки достоверно увеличивались только у спортсменов с *DD*-генотипом ($P < 0,05$). Следовательно, именно у этих спортсменов в процессе спортивной тренировки более существенно развиваются анаэробные системы энергообеспечения, чем у спортсменов с *ID*- и *II*-генотипами, что подтверждает генетическую детерминированность скоростно-силовых качеств спортсменов. О более эффективной и экономичной работе сердечно-сосудистой системы у спортсменов с *ID*-генотипом свидетельствуют достоверно более низкие значения ЧСС при тестировании на уровне анаэробного порога в смешанной анаэробно-аэробной, смешанной аэробно-анаэробной и анаэробной зонах энергообеспечения ($P < 0,05$). У спортсменов с генетической предрасположенностью к выносливости (*I* аллель гена АКФ) в процессе подготовки достоверно увеличиваются значения показателей аэробной выносливости. У спортсменов с *DD*-вариантом гена АКФ, ассоциированным с проявлением скоростно-силовых качеств, улучшается работоспособность в анаэробных зонах энергообеспечения.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют, что биоэнергетические показатели общей и специальной работоспособности спортсменов в различных зонах энергообеспечения во многом обусловлены генетически и могут иметь высокую связь с полиморфизмом гена АКФ.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ *TLR2 ARG753GLN* ТА *TLR4 ASP299GLY, THR399ILE* ПРИ УРОГЕНІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЯХ

О. В. Ізмайлова, О. А. Шликова, І. П. Кайдашев

НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики при
Українській медичній стоматологічній академії МОЗ України, Полтава

Розвиток інфекційного процесу визначається не тільки властивостями збудника, але й індивідуальними властивостями макроорганізму-господаря (насамперед здатністю давати адекватну імунну відповідь), що є відображенням його генетичної структури. Спадкова схильність до інфекційних агентів пов'язана з генетичними дефектами, що призводять до імунодефіцитів, а також (більш частий варіант) із поєднанням у індивіда “нормальних” алелей генів, сукупність яких формує особливості імунітету.

Значна увага приділяється вивченню системи *Toll*-подібних рецепторів (*TLRs*), які експресуються на клітинах уродженої імунної системи. Вони є еволюційно найдавнішою консервативною сигнальною системою, що розпізнає патогенні та умовно патогенні мікроорганізми, віруси, гриби, найпростіші, паразити, а також ендогенні продукти (білки теплового шоку, продукти некрозу і апоптозу тощо).

Мета дослідження — виявлення асоціації поліморфізмів генів *TLR2 Arg753Gln*, *TLR4 Asp299Gly* і *Thr399Ile* із бактеріальними інфекціями, що передаються статевим шляхом (хламідіоз, уреоплазмоз, гарднерелльоз, мікоплазмоз, трихомоніаз).

Обстежувані та методи. Обстежено 299 практично здорових чоловіків та жінок (жителів Полтавської області) та 156 хворих із діагностованою методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) урогенітальною інфекцією (хламідіоз, $n = 16$, уреоплазмоз, $n = 102$, мікоплазмоз, $n = 4$, гарднерелльоз, $n = 9$, трихомоніаз, $n = 2$, наявність декількох інфекцій, $n = 23$). Особи, що входили до групи популяційного контролю, були всебічно обстежені: проведено детальний збір анкетних даних, анамнезу, а також даних клінічного стану на час огляду та об'єктивних даних зі сторони різних органів та систем. Матеріалом для дослідження був зішкріб епітеліальних клітин із уретри і цервікального каналу, який отримували за допомогою спеціальних одноразових стерильних урогенітальних зондів, а також периферична кров. Поліморфізм генів *TLR2 Arg753Gln*, *TLR4 Asp299Gly* і *Thr399Ile* визначали за допомогою ПЛР із використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів із наступним рестрикційним аналізом. Продукти розщеплення поліморфних ділянок генів виявляли за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Гель забарвлювали етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Результати. Дослідження поліморфізму *Arg753Gln* гена *TLR2* показало, що частота виявлення алеля *G* серед осіб полтавської популяції та осіб із діа-

гностованою урогенітальною інфекцією не відрізнялася. Частота виявлення мутантного алеля *A* становила 0,5 % і 4,2 %, відповідно (ВШ = 7,49, ДІ = 1,99–22,55, $P < 0,05$). При дослідженні поліморфізму *Asp299Gly* гена *TLR4* частота виявлення “дикого” алеля *A* серед осіб полтавської популяції становила 92,65 %, серед пацієнтів із урогенітальною інфекцією — 87,18 %, а мутантного алеля *G* — 7,35 % і 12,82 %, відповідно (ВШ = 1,77, ДІ = 1,06–2,96, $P < 0,05$). Частота виявлення мутантного алеля *T* серед жителів Полтавської області та серед хворих із поширеними урогенітальними інфекціями при дослідженні поліморфізму *Thr399Ile* гена *TLR4* становила 2,3 % і 3,5 %, відповідно (ВШ = 1,35, ДІ = 0,58–3,2, $P = 0,66$).

Висновки. Отримані дані свідчать, що наявність мутантних алелей генів *TLR2 Arg753Gln* та *TLR4 Asp299Gly* забезпечують підвищений ризик зараження урогенітальними інфекціями.

СВЯЗЬ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА ППАР γ 2 И НАРУШЕНИЯМИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

И. П. Кайдашев, Л. А. Куценко, О. А. Шлыкова, Л. В. Беркало,
И. Л. Солохина, Л. Э. Веснина, И. П. Смирнова*, И.М. Горбась*

НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики при Украинской медицинской стоматологической академии МЗ Украины, Полтава

*Национальный научный центр “Институт кардиологии им. академика Н. Д. Стражеско НАМН Украины”, Киев

Значительная распространенность нарушений липидного метаболизма в настоящее время требует поиска генетических детерминант их развития для ранней диагностики, прогноза и выбора правильной лечебной тактики. В настоящее время в качестве наиболее вероятных кандидатов рассматриваются представители семейства ядерных гормональных рецепторов, которые активируют пролиферацию пероксисом — ППАР γ 2.

Цель работы — определение связи между наличием *Pro12Ala*-полиморфизма гена ППАР γ 2 и нарушениями липидного обмена.

Обследуемые и методы. Обследованы 137 пациентов: с нарушениями липидного обмена ($n = 75$) и контрольная группа ($n = 62$). Липидный обмен оценивали по уровню триглицеридов, общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови. Аллели полиморфного участка *Pro12Ala* гена ППАР γ 2 выявляли с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров с последующим рестрикционным анализом.

Результаты. По сравнению с контрольной группой выявлены достоверные изменения значений всех показателей липидного обмена. Для выяснения связи между направленностью изменений липидного метаболизма и наличием полиморфного варианта гена *Pro12* группа пациентов с дислипидемией была подразделена на две подгруппы — пациенты с максимальной гиперлипидемией и пациенты с разнонаправленными изменениями. В подгруппе с гиперлипидемией выявлено достоверное увеличение частоты встречаемости генотипа *Ala12Ala* и аллеля *12Ala* (соответственно 22,2 % и 33,3 %). Анализ показателей популяционной статистики показал в этой подгруппе неравномерное распределение согласно выявленному снижению наблюдаемой гетерозиготности — в два раза по сравнению с ожидаемой. Сравнение двух подгрупп в зависимости от наличия определенного генотипа показало, что максимальные по величине показатели липидного обмена наблюдаются при наличии у пациентов генотипов *Ala12Ala* и *Pro12Ala*.

Выводы. Наличие у пациентов аллеля *12Ala* коррелирует с максимальными показателями гиперлипидемии по уровню триглицеридов, общего холестерина, холестерина ЛПВП. Эти результаты, полученные для украинской популяции, согласуются с данными международных публикаций относительно связи аллеля *12Ala* с нарушениями липидного обмена. По нашему мнению, выявленная связь может являться неблагоприятным генетическим фактором, предрасполагающим к нарушениям липидного метаболизма у пациентов.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

О. В. Квитко, И. И. Конева, Я. И. Шейко, Н. А. Балашенко, А. С. Сапун,
С. Е. Дромашко

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Старение организма и составляющих его клеток остается нерешенной биологической проблемой, практическая важность которой демонстрируется исследованиями в области регенеративной медицины. Старение препятствует восстановительным процессам *in vivo*, а также продукции клеток *in vitro* с целью их прямого либо опосредованного (при создании искусственных органов) введения в организм. В результате клеточного старения с возрастом ослабляются регенеративные процессы, а также уменьшается репликативный потенциал иммунологически безопасных собственных (аутогенных) клеток при размножении *in vitro*. Культивируемые клетки, лишённые совокупности питательных и регуляторных факторов внутриорганизменной среды, как правило, стареют быстрее, чем в организме, что ограничивает наработку клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии. В то же время, при неограниченной пролиферации *in vitro* клетки могут трансформироваться в направлении ракового фенотипа.

Поиск средств замедления или реверсирования процессов старения клеток является предпосылкой успешного применения клеточных технологий в медицине. В этом плане представляет интерес возможность того, что ведущее к омоложению эпигенетическое репрограммирование генома может происходить не только в связи с дедифференцировкой, которая происходит при переносе ядер соматических клеток в цитоплазму яйцеклетки (*somatic cell nuclear transfer*) или при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (*induced pluripotent stem cells*) (Singh and Zacouto, 2010). Согласно развитой теории омоложения (Квитко, 2005, Kvitko, 2009), в период эмбриогенеза и постнатального роста особый сигнальный механизм ревертирует эпигенетические ошибки и таким путем омолаживает клетки. Поэтому сложноорганизованные виды с протяженными периодами развития и роста обладают наиболее продолжительной жизнью, а виды с непрекращающимся ростом тела практически не стареют (*negligible senescence*). Механизм омоложения приводится в действие флуктуациями концентраций морфогенов — белков, управляющих развитием и ростом и одновременно (плейотропно) активизирующих репарацию эпигенетических ошибок (эпимутаций), представляющих собой изменения метилирования цитозина в ДНК и модификации гистонов хроматина. После завершения развития и роста флуктуации морфогенов затухают, и возрастные нарушения накапливаются.

Указанный природой основной способ продления жизни — это продолжение развития, которое в случае человека может заключаться не в измене-

нии структуры или увеличении размеров тела, а в совершенствовании информационного процессинга мозга, сопровождающегося генерацией особых нервных импульсов, стимулирующих флуктуирующую продукцию морфогенов посредством прямой иннервации тканей и опосредованно, путем эндокринной модуляции. При поиске способов омоложения культивируемых клеток целесообразно апробировать такие нестандартные подходы, как воздействия переменными сигналами, обладающими специфическими параметрами (амплитуда, частота, показатели фрактальности). Поэтому представляет интерес использование электромагнитных полей, характеристики которых могут варьироваться в большей степени, чем в случае “вещественных” воздействий (*Zhao et al.*, 2005). Кроме того, при анализе влияния различных факторов на культивируемые клетки представляется перспективным развиваемый нами подход по витальной видеомикроскопии живых клеточных культур, позволяющий детально анализировать события на уровне единичных клеток и их клоновых потомств (*Kvitko et al.*, 2005).

**ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН
КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ ПІСЛЯ
ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ФРАКЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ
КЛІТИН АБО Lin^- - $Sca-1^+c-kit^+$ — ГЕМАТОПОЕТИЧНИХ
КЛІТИН ІЗ КІСТКОВОГО МОЗКУ
ТА ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ**

В. М. Кирик, А. Є. Родніченко, О. В. Кучук

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Джерелом гематопоетичних стовбурових клітин (ГСК) для трансплантації можуть бути кістковий мозок, периферична кров, фетальна печінка та деякі інші тканини. Загальна фракція мононуклеарних клітин з цих тканин містить багато груп стовбурових і прогеніторних клітин, які можуть мати різний потенціал при трансплантації. Наприклад, ГСК, які не експресують групу маркерів лінійності (Lin^-), експресують антиген стовбурових клітин ($Sca-1^+$) та рецептор фактора росту стовбурових клітин ($c-kit^+$), виділено в групу LSK-клітин.

Мета роботи — порівняти проліферативну активність клітин кісткового мозку у реципієнтів несорттованих та сорттованих стовбурових клітин кісткового мозку або фетальної печінки.

Матеріал та методи. Експерименти виконано на мишах лінії FVB. Реципієнтами ГСК були миші FVB дикого типу (*wt*) віком 3 міс. Донорами ГСК кісткового мозку були миші FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенні по GFP) віком 3 міс, люб'язно надані Європейською молекулярно-біологічною лабораторією (м. Монтеротондо, Італія). Донорами ГСК фетальної печінки були плоди GFP+ мишей 13,5 доби гестаційного періоду. Фракцію мононуклеарних клітин кісткового мозку та фетальної печінки виділяли на градієнті густини Ficol-Paque (Sigma). Фенотипування та сортування LSK-клітин кісткового мозку та фетальної печінки проводили методом проточної цитометрії на сортері BD FACSAria (Becton Dickinson). Трансплантацію клітин мишам ($1 \cdot 10^7$ виділених ядровмісних кістково-мозкових клітин або $0,8 \cdot 10^7$ виділених ядровмісних клітин фетальної печінки, що відповідало $2 \cdot 10^4$ відсорттованих LSK-клітин) проводили у хвостову вену.

Результати. У молодих реципієнтів ГСК кісткового мозку через 4 тижні після трансплантації відносна кількість клітин-попередників гранулоцитарно-макрофагального ряду кісткового мозку зросла на 36 %, а у реципієнтів ГСК фетальної печінки — на 40,1 % у порівнянні з контрольною групою ($P < 0,05$). Порівнюючи співвідношення КУК-Ф/КУК-ГМ, було виявлено тенденцію до перерозподілу субпопуляцій прогеніторних клітин у бік більш вираженого зростання КУК-ГМ при меншій динаміці приросту КУК-Ф (у реципієнтів клітин фетальної печінки) або їх зменшенні — у реципієнтів клі-

тин кісткового мозку. У 9-добових культурах КУК-ГМ у реципієнтів несорттованих клітин кісткового мозку кількість *GFP*-позитивних колоній гранулоцитарно-макрофагального ряду становила $2,7 \pm 0,5$ на 10⁶ клітин кісткового мозку, а у реципієнтів клітин фетальної печінки — $1,5 \pm 0,3$ на 10⁶ клітин, що становило 7,1 % та 4,9 % від загальної кількості колоній, відповідно. У реципієнтів, що отримали сортовані *LSK*-клітини, кількість *GFP*-позитивних колоній КУК-ГМ була більшою порівняно з попередніми групами: після трансплантації *LSK*-клітин із кісткового мозку — на 12,3 %, із фетальної печінки — на 9,6 % ($P < 0,05$). При цьому відзначалось переважання середніх та великих колоній в культурах у реципієнтів клітин із кісткового мозку, а у реципієнтів клітин із фетальної печінки — малих та середніх колоній. У мишей, яким було трансплантовано сортовані *LSK*-клітини, не виявлено *GFP*-позитивних колоній фібробластів, що підтверджує функцію *LSK*-клітин як істинних гематопоетичних клітин без потенціалу стромальних стовбурових клітин. Це також підтверджує високу чистоту сортування заданої популяції для трансплантації.

Висновки. Показано активацію проліферативних процесів у кістковому мозку реципієнтів ГСК у ранні періоди після трансплантації та зміну співвідношень основних класів прогеніторних клітин, що може визначатись джерелом трансплантату та ступенем його очищення.

ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ G308A ГЕНА *TNF-α* НА РОЗВИТОК ТЯЖКОЇ ПЕРИНАТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

С. П. Кир'яченко, З. І. Россоха, Н. Г. Горovenko*

Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України, Київ

*Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика
МОЗ України, Київ

В останнє десятиріччя дослідженню ролі про- та протизапальних цитокінів було присвячено чимало робіт, у яких показано, що баланс у продукції цитокінів є надзвичайно важливим для фізіологічної адаптації новонароджених. При поліморфному варіанті 308AA гена *TNF-α* спостерігається надмірна продукція цитокінів за рахунок підвищеної транскрипційної активності цього алельного варіанту гена.

Мета роботи — визначити вплив однонуклеотидної заміни G308A у промоторній зоні гена *TNF-α* на розвиток перинатальної патології у новонароджених.

Обстежувані та методи. Обстежено 235 новонароджених з тяжкою перинатальною патологією (128 хлопчиків та 107 дівчаток) та 110 клінічно здорових новонароджених (48 хлопчиків та 62 дівчинки), що склали групу контролю. Серед новонароджених з тяжкою перинатальною патологією 119 (65 хлопчиків та 54 дівчинки) мали гестаційний вік 28–37 тижнів, а 116 (63 хлопчики та 53 дівчинки) — 38–40 тижнів. Число хлопчиків та дівчат у групах обстежених вірогідно не розрізнялося. Аналіз поліморфних варіантів специфічної ділянки гена *TNF-α* проводили з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції та оцінки поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Детекцію продуктів ПДРФ-аналізу проводили у 2 % агарозному гелі.

Результати. У новонароджених з тяжкою перинатальною патологією у порівнянні з новонародженими групи контролю була вірогідно підвищена частота досліджуваної нами однонуклеотидної заміни G308A: як в гомозиготному — 308AA ($\chi^2 = 5,62, P < 0,05, OR = 5,02, CI: 1,15-21,89$), так і в гетерозиготному — 308AG ($\chi^2 = 14,05, P < 0,001, OR = 2,55, CI: 1,55-4,19$) станах. Наявність поліморфного варіанту 308GG ($\chi^2 = 16,45, P < 0,001, OR = 0,28, CI: 0,17-0,46$) була вірогідно знижена у новонароджених з тяжкою перинатальною патологією на відміну від новонароджених групи контролю. Для оцінки ймовірних відмінностей у впливі поліморфізму G308A гена *TNF-α* на розвиток перинатальної патології у недоношених та доношених новонароджених було проведено аналіз розподілу поліморфних варіантів даного гена. Вірогідної різниці у частотах реєстрації досліджуваних нами генотипів серед доношених та недоношених новонароджених виявлено не було. Тобто наявність досліджуваної нами однонуклеотидної заміни G308A асоційована із розвитком перинатальної патології незалежно від гестаційного віку.

Висновки. Виявлено асоціацію поліморфних варіантів 308AA та 308AG гена *TNF-α* з розвитком тяжкої перинатальної патології. Дослідження поліморфізму G308A гена *TNF-α*, одразу після народження дитини може слугувати додатковим предиктивним діагностичним критерієм в оцінці ризику розвитку тяжкої перинатальної патології та неонатальних синдромів незалежно від гестаційного віку.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОКОРРЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕОНЕКРОЗОМ

Е. М. Климова, И. Л. Вотякова, Л. А. Шакина

ГУ “Институт общей и неотложной хирургии НАМН Украины”, Харьков

Некроз поджелудочной железы (панкреонекроз) представляет собой воспалительно-некротический процесс, развивающийся вследствие ферментативного аутолиза ткани поджелудочной железы. Патогенез панкреонекроза связан с излишней активацией протеолиза и процессов липопероксидации, нарушениями сигналинга и микроциркуляции с внутрисосудистой гемокоагуляцией, тяжелым эндотоксикозом и гнойно-некротическими осложнениями как в самом органе, так и в окружающих тканях. Существующие методы лечения больных с острым панкреонекрозом неудовлетворительны. Летальность при данной патологии достигает 80–100 %.

Опыт последних лет показал высокую эффективность применения прогениторных гемопоэтических клеток-предшественников кордовой крови (ГКП) для коррекции метаболических нарушений, поскольку эти клетки способны дискретно реагировать на факторы роста и другие сигнальные молекулы реципиента, генерируя клеточные клоны с различными кластерами дифференцировки, обладающие различными функциями; способны к направленной трансдифференцировке, являются источником цитокинов и ростовых факторов, которые обладают аутокринным действием и стимулируют регенеративные и репаративные процессы тканей реципиента; а также способны к активной миграции в зоны развития патологического процесса, обеспечивая регенеративные процессы в органах.

Цель исследования — оценка эффекта последствия применения ГКП для коррекции метаболических и иммунологических нарушений у больных, оперированных по поводу панкреонекроза.

Обследуемые и методы. Обследовано 18 пациентов с панкреонекрозом, которым в составе комплексного лечения проводили одномоментное двухэтапное введение ГКП. Первое однократное введение проводили внутримышечно, используя взвесь ГКП в объеме до 3 мл. Второе введение ГКП проводили внутривенно, используя максимальный объем клеточной взвеси (до 40 мл). Изменения значений иммунофизиологических показателей оценивали на 1-е и 3-и сут после применения ГКП.

Результаты. На 1-е сут после операции у больных, оперированных по поводу панкреонекроза, отмечали снижение лимфоцитотоксичности (ЛЦТ) до $(32,1 \pm 10,5)$ %, при исходных значениях $(62,8 \pm 9,9)$ % и контрольных — $(22,3 \pm 8,9)$ %. К третьим послеоперационным суткам наблюдали значительное снижение уровня циркулирующих иммунных комплексов — до $(181,4 \pm 24,6)$

ед. *E*, при дооперационных значениях показателя ($480,0 \pm 12,4$) ед. *E* и контрольных на уровне ($98,3 \pm 21,1$) ед. *E*. Также в этот период наблюдали позитивное увеличение количества общих $CD3^+$ (*T*-лимфоцитов) и $CD4^+$ (*T*-хелперов) до контрольного уровня, нормализацию исходно повышенной плотности поверхностных рецепторов $CD11a^+$, $CD16^+$, $CD162^+$.

Выводы. Полученные нами данные свидетельствуют о выраженном иммуотропном действии ГКП. Верифицированные нами изменения иммунологических параметров коррелировали со значительным улучшением клинических проявлений заболевания. У пациентов наблюдалось улучшение самочувствия, работоспособности, снижение выраженности болевого синдрома, дискомфорта в системе пищеварения.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В МЕДИКО- БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

М. В. Ковальчук, Т. П. Гулько*

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
*ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

Использование аллогенного клеточного материала в терапии и регенеративной медицине ставит ряд вопросов, связанных как с приживлением аллогенных клеток, так и возможными генетическими модификациями клеток донора. Линии лабораторных мышей обеспечивают соответствующие модели для изучения этих процессов, на которых может быть оценена их безопасность и эффективность перед клиническими испытаниями. Для получения объективных и воспроизводимых результатов таких исследований требуются не только стандартные условия проведения опыта, но и стандартизированный биологический материал, что обеспечивается использованием инбредных линий животных. Однако чистота линий, их гомозиготность, могут нарушаться как естественным мутационным процессом, так и вследствие технических ошибок.

Цель исследования — генотипирование линий лабораторных мышей по отдельным локусам главного комплекса гистосовместимости (*H2*) для последующего мониторинга донорных клеток.

Материал и методы. Для генетического мониторинга экспериментальных животных использовали микросателлитный анализ локуса *Eb*. Выбор именно этого района был связан с тем, что ампликоны, полученные к данному локусу, могут значительно отличаться по размеру среди линий мышей (около 30 пар нуклеотидов) в отличие от ранее исследуемых нами локусов генов *Tnfa* и *Tnfβ* для маркирования линий (около 2–10 пар нуклеотидов).

Результаты. Сравнительный анализ линий лабораторных мышей с использованием микросателлитного маркера в гене *Eb* показал, что *Eb*-микросателлиты отличаются по размеру в пределах тестируемых линий. Индивидуальный анализ животных из выборок позволил также детектировать нелинейный материал.

Выводы. Молекулярно-генетические маркеры линий лабораторных мышей по отдельным переменным локусам главного комплекса гистосовместимости — микросателлиты второго интрона гена *Eb* — позволяют не только проверить чистоту линейности животных, полученных из различных источников, но и оптимально подобрать их для исследовательских моделей, требующих дальнейшего отслеживания аллелей.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ТКАНЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В. А. Козлов, Я. Л. Петровский, Е. Я. Шевела, Е. Р. Черных,
А. А. Останин

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются отдельной субпопуляцией мультипотентных стволовых клеток и характеризуются способностью к самоподдержанию и дифференцировке в мезенхимальном направлении. МСК отличаются низкой иммуногенностью и обладают широким спектром биологической активности, что обуславливает повышенный интерес к использованию этих клеток при разработке новых технологий в области клеточной терапии.

Цель исследования — на основе анализа морфо-функциональных и иммунорегуляторных свойств фибробластоподобных клеток, выделенных из костного мозга (КМ-МСК), липоаспирата (Ж-МСК) и плаценты (П-МСК) человека, провести сравнительную характеристику МСК различного тканевого происхождения

Результаты. Установлено, что в жировой ткани количество клоногенных прекурсоров МСК достоверно выше, чем в костном мозге и плаценте. МСК вне зависимости от типа тканей были способны к самоподдержанию и активному клеточному росту. В популяции плацентарных клеток в отличие от КМ- и Ж-МСК преобладали клетки диаметром <20 мкм. При этом П-МСК характеризовались наиболее выраженным пролиферативным потенциалом, о чем свидетельствовало количество клеток, генерируемых в первичных культурах, а также динамика удвоений клеточной популяции в процессе культивирования. КМ-МСК обладали более выраженным остеогенным потенциалом, чем П-МСК и, особенно, Ж-МСК.

На основе анализа конститутивной продукции 24 биологически активных медиаторов впервые показано, что МСК различного тканевого происхождения обладают функциональным потенциалом для поддержания кроветворения (через продукцию *G-CSF*, *GM-CSF*, эритропоэтина), иммуномодуляции (через продукцию *IFN-γ*, *IL-2*, *IL-6*, *IL-1β*, *TNF-α* и хемокинов – *IL-8*, *MCP-1*, *MIP-1β*) и стимуляции репаративных процессов (через продукцию *VEGF*, *FGF-basic*, *IGF-1*, *IL-6*, *TIMP-1/MMP-9*). Впервые установлено, что по характеру и уровню спонтанной (базальной) продукции цитокинов Ж-МСК в большей степени проявляют провоспалительный (*IL-1β*, *TNF-α*), иммунорегуляторный (*IFN-γ*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *MCP-1*, *MIP-1β*) и гемопоэзстимулирующий (*G-CSF*, *GM-CSF*) фенотип, но при этом характеризуются более низкой чувствительностью к ЛПС-стимуляции, чем КМ- и П-МСК. Показано, что МСК исследуемых тканей обладают иммуносупрессорной активностью,

которая проявляется в ингибции пролиферативного ответа активированных *T*-лимфоцитов. При этом КМ-МСК отличались наиболее выраженной супрессией в отношении *T*-клеток, активированных анти-*CD3*-антителами, тогда как Ж- и П-МСК — в отношении *T*-лимфоцитов, активированных аллоантигенами в СКЛ. Иммуносупрессорная активность МСК была сопряжена со снижением экспрессии на *T*-клетках активационных молекул (*CD25*, *HLA-DR*), а также реализовалась через продукцию растворимых изоформ *HLA-G* и простагландина E_2 . Кроме того, действие МСК частично может опосредоваться через модуляцию функциональной активности дендритных клеток. Выявлено, что как КМ-МСК, так и П-МСК и Ж-МСК характеризуются наличием гемопоэзстимулирующей активности, которая проявляется в их способности усиливать дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников в эритроидном и гранулоцитарно-макрофагальном направлении.

Выводы. Полученные результаты обосновывают возможность разработки новых клеточных технологий лечения онкогематологических и аутоиммунных заболеваний, базирующихся на использовании ко-трансплантации стволовых кроветворных клеток и аутологичных и/или аллогенных МСК с целью сокращения сроков восстановления кроветворения после высокодозной полихимиотерапии, а также для индукции/поддержания толерантности к аутоантигенам или для контроля над выраженностью трансплантационных реакций.

DROSOPHILA MELANOGASTER ЯК МОДЕЛЬНИЙ ОБ'ЄКТ ПРИ ВИВЧЕННІ ЗАЛЕЖНИХ ВІД ВІКУ ПАТОЛОГІЙ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ

О. К. Коляда, К. Ю. Куценко, І. Ю. Хилобок, О. М. Вайсерман

ДУ “Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України”, Київ

Використання дрозофіли в якості модельного об'єкта для вивчення патологічних станів людини обумовлене, в першу чергу, значною вивченістю біології дрозофіли та легкістю застосування до неї різних методів. До того ж, значна подібність в механізмах клітинної загибелі, регуляції експресії генів, субклітинного транспорту та формування синаптичних зв'язків дає змогу використовувати дані, отримані на дрозофілі, в дослідженнях на інших організмах. Крім того, ключові шляхи клітинної регуляції (такі, як *Wnt*, *Ras/ERK*, *Toll-like*) були відкриті саме у дрозофіли, а потім їх наявність була встановлена і у ссавців. Дрозофіла має подібну до людської систему нейротрансмітерів (таких, як ГАМК, дофамін, серотонін, глутамат, ацетилхолін) та невелику кількість нейронів і клітин глії в центральній нервовій системі, що робить її зручною моделлю для молекулярних досліджень в нейрофізіології.

Розглянуто можливі принципи формування моделі таких патологій нервової системи людини, як хвороба Альцгеймера, Хантінгтона, Паркінсона та таупатія. Нами було виділено кілька типів моделей, базуючись на принципах їх створення та застосування. Перший тип моделей базується на класичному підході — пошуку мутантних ліній дрозофіл зі стабільними мутаціями в генах, які пов'язані із захворюваннями нервової системи та мають певний ступінь гомології з людськими генами. Цей метод є найбільш простим та реалізується завдяки Інтернет-пошуку необхідних ліній у світових базах даних. Другий тип моделей використовується при домінантному прояві захворювання. Якщо білок чи некодуюча РНК має домінантний ефект, то використання двоскладової експресуючої системи *GAL4/UAS* дає можливість підвищити рівень експресії певного продукту в певних тканинах організму чи при певних умовах середовища. Цю ж техніку можна застосовувати і в третій групі моделей, що використовуються для дослідження захворювань втрати функцій (*lost of function*). За допомогою малих інтерферуючих РНК стає можливим нокаут генів як на рівні деградації мРНК, так і на рівні компатизації хроматину в локусі локалізації гена. Якщо замість змістового продукту в *UAS* частині *GAL4/UAS*-системи використовувати інтерферуючі РНК, що мають властивість утворювати шпильки та призводити до деградації мРНК, можна створити нокаутну модель з регульованим сайленсінгом, залежним від зовнішніх умов, часу чи типу тканин. Четверта група моделей базується на використанні ксенобіотиків, що призводять до формування ознак патології. Наприклад, 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (МРТП) призводить до направленої загибелі дофамінпродукуючих нейронів дрозофіли шляхом пригнічення електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях. Загибель цих нейронів є загальною для всіх типів хвороби Паркінсона у людини, що є підставою вважати використання *МРТП* надзвичайно корисним при вивченні цитологічних особливостей патології.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

В.А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины” НАМН Украины, Киев

Биотехнология “стара как мир”, но ее взлет, который сегодня вышел за рамки чисто экономические и приобретает все большую политическую значимость, связан с практически синхронно появляющимися принципиально новыми биологическими, химическими и техническими решениями — генная и белковая инженерия, разнообразные реагенты и их наборы, приборы, обеспечивающие прецизионное фракционирование, секвенаторы, амплификаторы, синтезаторы и т. д. Это привело к такому уровню исследований клетки, что фактически сформулирована задача — полное разрешение клетки, а центральное внимание, концентрация основных усилий сосредоточены на том, что связано с человеком. Решающий шаг здесь сделан в виде совершившегося перехода от биотехнологий “для человека” к технологиям, осуществляемым непосредственно на/в человеке, — “биотехнологиям человека”. Направленность и возможности технологических решений обусловлены непрерывно возрастающими уровнем знаний и методической доступностью к тому, что происходит в клетках организма и той их совокупности, которая и есть организм. Классификация его составляющих существует самая разная и зависит от уровня, на котором она составляется. С позиций биотехнологии человека естественные процессы в организме имеют 3 ипостаси.

1. Сигнально-метаболические оси, включающие в себя как регулирующие синтезы, деградации, замены, замещения и т. д. внутриклеточных макромолекул, так и уровень всех метаболических циклов. Эта ипостась лучше всех изучена. На нее как на мишень направлена большая часть лекарств.

2. Клеточное замещение, поддержание стволовости и индукция терминальной дифференциации, внутриорганизменные клеточные миграции, потоки, превращения. Эта ипостась “на взлете”, изучена она пока еще очень слабо и крайне фрагментарно. Здесь ожидают великих свершений, и принципиально это оправдано.

3. Клеточные взаимодействия, контакты, межклеточные потоки “не выходящие на поверхность” (через клеточные контакты), внутри- и межклеточные обмены содержимым, а также клеточное самоподдержание в “компартаментах органов” (участки тканей, ограниченные фасциями). Пока это все (за исключением структуры межклеточных контактов) практически не изучено.

Сегодня возможности биотехнологий человека в основном реализуются единичными (и используемыми также поодиночке), нарабатываемыми вне организма человека его терапевтически значимыми белками и пептидами, а также клеточной (и первыми шагами – тканевой) терапией на уровне успеш-

ных попыток совмещения вводимого материала с контрольными системами организма, на такой материал реагирующих. Но даже эти, пока еще крайне несовершенные и с учетом сложных систем контроля и регуляции организма технологии обеспечили качественно новые реальные гигантские возможности лечения и восстановления.

Со второй половины начавшегося десятилетия прогнозируется новый виток биотехнологии человека. Исходя из направленности фундаментальной науки, ожидаемой ее практической реализации и ведущихся проработок, основными событиями станут переход от использования единичных препаратов к их комплексному применению, адресность доставки и локализации вводимого, управление клеточными потоками в организме.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ACE НА ФИЗИЧЕСКУЮ ПОДГОТОВЛЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНА

Г. В. Коробейников, Р. А. Тронь

Национальный университет физического воспитания и спорта Украины, Киев

Одним из генов, которые влияют на спортивную работоспособность, является ген ангиотензинконвертирующего фермента (ACE), определяющий молекулярную структуру ACE последовательностью нуклеотидов ДНК. Считается, что у индивидуумов с *D/D*-формой сердце приспособлено к тяжелым, но не продолжительным нагрузкам, а с *I/I*-формой наоборот — к длительным, но не очень интенсивным. Проводимая на базе гена ACE оценка позволила перейти от эмпирических методов определения развития двигательной функции человека к выявлению его генетической предрасположенности выполнять скоростно-силовую физическую работу.

Цель работы — установить связь полиморфизмов гена ACE с уровнем физической подготовленности спортсменов, занимающихся бегом на короткие дистанции и легкоатлетическими прыжками.

Обследуемые и методы. В исследовании принимали участие 67 спортсменов высокой квалификации, занимающиеся бегом на короткие дистанции и легкоатлетическими прыжками. Для решения поставленных задач были использованы методы физического тестирования, молекулярно-генетического анализа и математической статистики.

Результаты. Исследована связь между уровнем физической подготовленности и полиморфизмом гена ACE. Установлено, что у бегунов на короткие дистанции наиболее часто встречаются генотипы *I/D* (44,7 %) и *D/D* (39,5 %), а у спортсменов, занимающихся легкоатлетическими прыжками, чаще встречается генотип *I/D* (48,3 %). Бегуны на короткие дистанции с полиморфными вариантами *I/I* и *D/D* характеризуются средним уровнем физической подготовленности. У бегунов с генотипом *I/D* средний уровень физической подготовленности наблюдается у 80 %, уровень физической подготовленности выше среднего — у 20 %. Среди спортсменов с полиморфным вариантом *I/D*, специализирующихся в легкоатлетических прыжках, высокий уровень физической подготовленности выявлен у 33 %, средний уровень физической подготовленности — у 67 %. У 100 % легкоатлетов-прыгунов с генотипами *I/I*, *D/D* наблюдался средний уровень физической подготовленности.

Выводы. 1. Наиболее благоприятным для проявления повышенной результативности легкоатлетов-прыгунов является преобладание в генотипе I-аллелей гена ACE, для легкоатлетов-бегунов — D-аллелей гена ACE. 2. Наблюдается тенденция наличия более высокого уровня физической подготовленности у спортсменов с гетерозиготной формой *I/D* гена ACE. 3. Полиморфизм гена ACE является информативным показателем для отбора будущих спортсменов в скоростно-силовые виды спорта.

ОСОБЛИВОСТІ ОСТЕОГЕННОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЗА УМОВИ ПОШКОДЖЕННЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ТА КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

О. В. Кучук, І. Ф. Лабунець

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ

Відомо, що в інтактному організмі та при різних пошкодженнях мультипотентні стромальні клітини кісткового мозку (МСК КМ) мають різну функціональну активність. *In vitro* це може проявлятися у зміні кількості утворених колоній, їх розмірів, активності відповіді клітин на спрямоване диференціювання. Показано, що при механічному пошкодженні кістки активується система репарації, в яку залучені МСК КМ, а за умови імунодефіциту утворення кісткової тканини знижується. За даними літератури, в організмі існує певний баланс в утворенні з МСК КМ клітин кісткової та жирової тканин як в умовах *in vivo*, так і *in vitro*.

Мета роботи — *in vitro* дослідити проліферативну активність МСК КМ, отриманих від тварин з різними моделями ушкоджень, а також виявити їх здатність адекватно реагувати на спрямоване комітування в остеогенному напрямку.

Матеріал та методи. Дослідження було проведено на МСК КМ, отриманих зі стегнових кісток мишей лінії *FVB*: інтактних (після моделювання дефіциту імунної системи шляхом тимектомії) та після механічного пошкодження стегнових кісток. Отримані суспензії клітин пропускали через голки різного діаметра та підраховували кількість живих клітин. Для визначення проліферативної активності МСК КМ їх висаджували в кількості 5×10^6 у флакони для культивування з площею культуральної поверхні 25 см^2 . Через 11–12 діб утворені колонії фіксували етиловим спиртом, фарбували за Романовським — Гімза і підраховували їх кількість (на 10^6 клітин). Для направленої диференціювання МСК КМ висаджували в лунки 6-лункового планшету в кількості $1,67 \times 10^6$ на 11–12 діб. Після цього культуральне середовище замінювали на середовище для диференціювання в остеогенному напрямку, до складу якого входили *L* аскорбінова кислота, дексаметазон та β -гліцерофосфат. Диференціювання проводили протягом 21 доби. Середовище для диференціювання замінювали кожні 4–5 діб. Після цього клітини фіксували, фарбували масляним червоним для виявлення ліпідів та алізариним червоним *S* для виявлення ділянок відкладання кальцію клітинами (на 10^6 клітин).

Результати. Встановлено, що після тимектомії кількість утворених колоній МСК КМ зменшується (з $36,7 \pm 2,9$ до $24,5 \pm 3,2$; $P < 0,05$), однак після механічного пошкодження стегнових кісток їх кількість збільшується в 1,4 рази.

Після проведеного спрямованого остеогенного диференціювання МСК КМ було встановлено, що кількість колоній ліпидовмісних клітин у тимектомованих тварин має тенденцію до збільшення порівняно з інтактними мишами (з $5,5 \pm 2,5$ до $6,6 \pm 3,6$), що може свідчити про зсув у балансі утворення клітин кісткової та жирової тканин у таких тварин в бік останніх. Однак у групі тварин з механічним пошкодженням кісток колоній ліпидовмісних клітин виявлено не було, натомість спостерігали інтенсивне відкладання кальцію в поза-клітинний матрикс.

Висновки. Проліферативна активність МСК КМ змінюється залежно від характеру змодельованого пошкодження. Механічне пошкодження кісткової тканини є вагомим чинником у спрямованості диференціювання МСК КМ.

ФАКТОРИ ЕПІФІЗА ТА ГЕМОПОЕТИЧНІ КЛІТИНИ–ПОПЕРЕДНИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ: МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ВПЛИВУ

І. Ф. Лабунець

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Відомо, що гормон епіфіза мелатонін підсилює гемопоез у кістковому мозку, опосередковуючи цей вплив через *T*-хелпери органу (*Maestroni et al.*, 2005); стромальні фібробласти, як і *T*-хелпери, є важливими компонентами мікрооточення кісткового мозку, які контролюють гемопоез, а багато впливів мелатоніну на імунну систему реалізуються саме через гормони тимуса. Показано, що останні відновлюють у тимектомованих тварин диференціювання стовбурових клітин у гранулоцитарно-макрофагальному напрямку. Пептидні фактори епіфіза підвищують вміст мелатоніну в епіфізах та крові, а за нашими даними, активують ендокринну функцію тимуса.

Мета роботи — оцінити в експерименті значення клітин мікрооточення кісткового мозку та ендокринної функції тимуса у впливі факторів епіфіза на гемопоетичні клітини-попередники.

Матеріал та методи. Об’єкт — дорослі миші лінії *CBA/Ca*. Мелатонін (*Sigma*) вводили ввечері одноразово, внутрішньочеревно із розрахунку 50 нг/100 г маси; епіталамін (пептидний препарат епіфіза) — вранці, підшкірно, одноразово із розрахунку 5 мг/100 г маси тіла; контроль — 0,9 % розчин хлориду натрію. Частина дослідів проводили на тимектомованих мишах. У кістковому мозку визначали кількість клітин-попередників для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУК-ГМ) в агарових культурах, число стромальних клітин-попередників для колоній фібробластів (КУК-Ф) — методом культивування клітин в моношарових культурах, а також кількість *CD4*⁺-клітин — імунофлюоресцентним методом; у крові оцінювали вміст (*log2* титру) тимічного сироваткового фактора (ТСФ). У дослідях *in vitro* клітини, виділені із кісткового мозку інтактних дорослих мишей, інкубували з мелатоніном (125 пг), епіталаміном (0,1 мг) або супернатантом трьохгодинних культур строми тимусів дорослих інтактних мишей, якій містить тимічний гормон. Після інкубації в суспензії клітин визначали число КУК-ГМ, КУК-Ф і *CD4*⁺-клітин вказаними вище методами. Контроль — значення показників без додавання відповідних факторів.

Результати. *In vivo*. Введення мелатоніну призводить до істотного підвищення частки *CD4*⁺-клітин у кістковому мозку мишей — з $(6,6 \pm 1,2) \%$ до $(10,2 \pm 0,6) \%$ ($P < 0,05$). Абсолютний вміст КУК-Ф в одному стегні контрольних та дослідних мишей становить, відповідно $401,8 \pm 42,6$ і $507,0 \pm 67,6$, КУК-ГМ — 2757 ± 462 та 2474 ± 647 . Зміни у відношенні кількості КУК-ГМ та КУК-Ф у зазначених групах (з $7,1 \pm 1,7$ до $4,9 \pm 1,4$) свідчать про зсув у балансі цих клітин під впливом мелатоніну в бік збагачення кісткового мозку стро-

мальними попередниками. Цей факт може мати значення щодо посилення процесу гемопоезу весною. Так, за нашими даними, для кількості стромальних та кровоутворюючих клітин-попередників у кістковому мозку дорослих мишей властивий циркануальний ритм з піками КУК-Ф взимку і влітку, а КУК-ГМ — весною та восени. При цьому весною кількість КУК-ГМ у кістковому мозку в 1,9 разів вище, ніж взимку. Введення епіталаміну також призводить до підвищення вмісту КУК-Ф у кістковому мозку дорослих мишей ($P < 0,05$), тоді як у тимектомованих тварин ефект слабшає. Рівень ТСФ у крові мишей, які отримали мелатонін та епіталамін, вище, ніж в контрольних групах ($P < 0,05$).

In vitro. Після інкубації клітин кісткового мозку із мелатоніном частка $CD4^+$ -клітин збільшилась ($P < 0,05$), тоді як кількість КУК-Ф залишилась без змін ($P > 0,05$), що може свідчити про різні шляхи впливу мелатоніну на певні клітини мікрооточення кісткового мозку. Дія епіталаміну *in vitro* на число КУК-Ф подібна. Тимічний супернатант підвищує *in vitro* кількість КУК-Ф і не змінює КУК-ГМ.

Висновки. У дорослому організмі вплив мелатоніну на гемопоетичні клітини-попередники може реалізуватись через $CD4^+$ -клітини та стромальні фібробласти кісткового мозку. Якщо на $CD4^+$ -клітини гормон впливає безпосередньо, то на стромальні фібробласти — опосередковано, через підвищення рівня тимічного гормону. Останній механізм має місце і у впливі епіталаміну на складові мікрооточення кісткового мозку.

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ІНТАКТНИХ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ ТА ЗА УМОВ СТРЕСОВОГО ВПЛИВУ

І. Ф. Лабунець, А. Є. Родніченко, О. В. Кучук

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Встановлено, що характер імунних реакцій у мишей різних ліній має свої особливості та визначає схильність до розвитку деяких форм патології. Найбільш яскраво генетичні відмінності функцій імунної системи можуть проявитись в умовах дії стресових чинників. Для мишей лінії *СВА/Са* властива сильна імунна відповідь на *T*-залежний антиген, високі адаптивні можливості організму. Стан імунної системи та характер її адаптивних змін у мишей лінії *FVB*, які використовуються у генетичній та регенеративній медицині, вивчені недостатньо.

Мета роботи — дослідити та порівняти функціональний стан імунної системи у інтактних та після операційного втручання мишей ліній *СВА/Са* та *FVB*.

Матеріал та методи. У молодих мишей самців ліній *СВА/Са* ($n = 20$) та *FVB* ($n = 29$) дослідження проводили до (інтактна група) і через добу після операційного втручання. Проліферативну активність лімфоцитів під впливом мітогену оцінювали в МТТ-тесті. Кількість клітин-попередників для гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУК-ГМ) кісткового мозку визначали в напіврідких агарових культурах. Кількість стромальних клітин-попередників для колоній-фібробластів (КУК-Ф) оцінювали методом культивування клітин кісткового мозку в моношарових культурах. Вміст тимічного сироваткового фактора (ТСФ) визначали у сироватці крові мишей всіх експериментальних груп, а також у супернатантах тригодинних культур строми тимусів інтактних мишей обох ліній в присутності фізіологічної дози (50 нг) кортикостерону.

Результати. *Функціональний стан імунної системи у інтактних мишей ліній СВА/СА та FVB.* Показано існування генетичних відмінностей щодо кількості ядровмісних клітин в тимусі та селезінці: у мишей лінії *СВА/Са* вища кількість тимоцитів, але менша — спленоцитів ($P < 0,05$). Функціональна активність *T*-лімфоцитів та загальна кількість клітин у кістковому мозку подібна у мишей обох ліній. Більша кількість КУК-Ф у кістковому мозку мишей лінії *FVB* вказує на генетичні особливості здатності стромальних клітин органу до колонієутворення.

Вплив операційного стресу на функціонування імунної системи у мишей різних ліній. У мишей обох ліній після операції число клітин у селезінці дещо зменшується, проте є особливості в реакції тимуса на дію операційного стресу. Якщо вміст ТСФ у крові та число клітин в тимусі мишей лінії *СВА/Са* зменшується після операції, то у мишей лінії *FVB* — не змінюється. У мишей лінії

СВА/Са спостерігалось деяке зниження потенціалу спленоцитів та тимоцитів до бласттрансформації під впливом операційного стресу. Зміни числа клітин у кістковому мозку мишей обох ліній після операції були подібними до тиму-са. При цьому відносне число КУК-Ф у кістковому мозку збільшувалося у мишей лінії *СВА/Са* і не змінювалося у мишей лінії *FVB*. Мабуть, у останніх в умовах стресу диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин в бік фібробластів має особливості. Число КУК-ГМ дещо збільшується після операції у мишей лінії *СВА/Са*.

Чутливість секреторного компонента тимуса мишей різних ліній до дії in vitro кортикостерону. Вміст ТСФ у супернатанті культивованої стромы тимусів вірогідно зменшується після інкубації останньої із кортикостероном у мишей лінії *СВА/Са* і не змінюється у мишей лінії *FVB*.

Висновки. У мишей ліній *СВА/Са* та *FVB* існують відмінності у функціонуванні центральної та периферичної ланок імунної системи, які посилюються при дії стресових чинників. Існують генетичні відмінності в реакції тиму-са мишей на дію глюкокортикоїдів. Результати можуть бути корисними при розробці підходів і пошуку засобів до мобілізації аутологічних стовбурових клітин та їх спрямованого диференціювання *in vivo* при ушкодженнях тканин, а також до профілактики та лікування деяких форм патології, пов'язаних із генотипом.

КЛІТИННИЙ СКЛАД КІСТКОВОГО МОЗКУ У ТИМЕКТОМОВАНИХ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ

І. Ф. Лабунець, А. Є. Родніченко, О. В. Кучук, В. М. Кирик

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Відомо, що між функціонуванням тимуса та кісткового мозку існує зв'язок. Так, у тимектомованих тварин у кістковому мозку змінюється вміст стромальних клітин-попередників, порушується диференціювання стовбурових клітин у гранулоцитарно-макрофагальному і остеогенному напрямках. Гормони тимуса впливають на стромальні фібробласти та *T*-хелпери кісткового мозку, а дефіцит *T*-лімфоцитів при тимектомії може призвести до порушення взаємодій між імунною та кістковою системами. За нашими даними, внутрішньоімунні взаємодії та адаптивні реакції імунної системи мають певні відмінності у мишей різних ліній. Проте генетичні особливості проявів цих взаємодій на рівні центральних органів цієї системи залишаються недостатньо вивченими.

Мета роботи — дослідити та порівняти вплив тимектомії на клітинний склад кісткового мозку у мишей ліній *CBA/Ca* та *FVB*.

Матеріал та методи. У самців мишей обох ліній (віком 3–5 міс) піддослідної (тимектомія) та контрольної (псевдооперація) груп дослідження проводили через 1 міс після операції. У всіх тварин оцінювали вміст в крові тимічного сироваткового фактора (ТСФ); у кістковому мозку визначали число стромальних клітин-попередників для колоній фібробластів (КУК-Ф) методом культивування клітин в моношарових культурах, число клітин-попередників для гранулоцит-макрофагальних колоній (КУК-ГМ) в агарових культурах і відсоток *CD3*⁺-, *CD4*⁺8⁺- та *CD4*⁺8⁺-клітин — імунофлуоресцентним методом.

Результати. У тимектомованих мишей обох ліній тимічний гормон в крові не визначався.

Вплив тимектомії на кістковий мозок мишей лінії *CBA/Ca*. У кістковому мозку тимектомованих мишей відносно число КУК-Ф зменшується, що свідчить про зміну їх здатності до колонієутворення. За рахунок підвищення у таких мишей частки *CD8*⁺-клітин зменшується співвідношення *CD4*⁺/*CD8*⁺-клітин, яке у псевдооперованих і тимектомованих тварин становить $1,03 \pm 0,29$ та $0,78 \pm 0,13$ відповідно. Раніше нами показано, що в умовах зростання рівня в крові гормонів тимуса частка *CD4*⁺-клітин у кістковому мозку підвищується. У псевдооперованих і тимектомованих мишей співвідношення КУК-Ф/КУК-ГМ становить $3,5 \pm 0,9$ і $2,7 \pm 1,0$ відповідно.

Зміни кісткового мозку у тимектомованих мишей лінії *FVB*. Після тимектомії число КУК-Ф у кістковому мозку мишей лінії *FVB* зменшується в 1,5 рази — з $(36,7 \pm 2,9) \%$ до $(24,5 \pm 3,2) \%$ ($P < 0,05$) проти 1,3 рази у мишей лінії *CBA/Ca*. У тимектомованих мишей лінії *FVB* співвідношення *CD4*⁺/*CD8*⁺-клітин підвищується (з $1,11 \pm 0,14$ до $1,35 \pm 0,15$) за рахунок падіння в

1,4 рази частки $CD8^+$ -клітин. При цьому з'являється різниця між значеннями показника у тимектомованих тварин обох ліній ($P < 0,05$). У псевдооперованих мишей та тварин після тимектомії співвідношення КУК-Ф/КУК-ГМ становить $3,3 \pm 0,9$ та $1,8 \pm 0,8$ відповідно. При цьому у мишей цієї лінії, як і у мишей лінії *SBA/Са*, спостерігається тенденція до підвищення числа КУК-ГМ після вилучення тимуса. Отже, у мишей обох ліній потенційний вплив тимуса на гемопоез може здійснюватись через зміну числа стромальних клітин-попередників та зсув у балансі регуляторних *T*-клітин. В особливостях змін останнього у мишей різних ліній можуть мати значення генетичні особливості взаємодії імунної системи з глюкокортикоїдами (Лабунець І.Ф. та співавт., 2010).

Висновки. У мишей ліній *SBA/Са* та *FVB* клітинний склад кісткового мозку змінюється у відповідь на вилучення тимуса. Існують певні генетичні відмінності у реакції мікрооточення кісткового мозку мишей на дефіцит регуляторних факторів тимуса, які можуть впливати на чутливість стромальних фібробластів, а також на баланс $CD4^+/CD8^+$ -клітин. Результати можуть бути корисними при розробці індивідуалізованої клітинної терапії ушкоджень різного ґенезу (зокрема, опорно-рухового апарату) в умовах дисфункції імунної системи центрального характеру.

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ НА ІШЕМІЧНЕ ПОШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

І. Ф. Лабунець, А. Є. Родніченко, В. М. Кирик, О. В. Кучук,
О. В. Под'яченко, О. М. Цупиков, Р. Г. Васильєв, З. Л. Літошенко,
К. П. Горностай, О. Ю. Резнік, Т. Р. Стратійчук, П. А. Побережний

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Клітинна терапія є одним із перспективних напрямів лікування пацієнтів з ішемічним ураженням головного мозку, ефективність якої підвищується при застосуванні в перші дні після ішемічного інсульту. Разом з тим, ранні зміни периферичної імунної системи можуть бути однією із ланок ушкодження головного мозку і тому вплинути на ефект терапії. Особливості реакції імунної системи можуть мати генетичні відмінності.

Мета роботи — порівняльне дослідження функціонального стану імунної системи у мишей ліній *FVB* та *CBA/Ca* на фоні ішемічного пошкодження головного мозку.

Матеріал та методи. Об'єкт — дорослі (3–4 міс) миші-самці ліній *CBA/Ca* ($n = 14$) та *FVB* ($n = 18$), які були розподілені на дві групи: контрольна (псевдооперовані миші) та з ішемією головного мозку, яку моделювали шляхом 20-хвилинної оклюзії загальних сонних артерій. Дослідження — через добу після операції. Підраховували число клітин у лімфоїдних органах, визначали проліферативну активність лімфоцитів під впливом мітогенів у МТТ-тесті, кількість клітин-попередників гранулоцитарно-макрофагальних колоній (КУК-ГМ) та кількість стромальних клітин-попередників колоній-фібробластів (КУК-Ф), а також рівень в крові тимічного сироваткового фактора (ТСФ). Фенотипування клітин проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері *BD FACSAria*.

Результати. У мишей лінії *CBA/Ca* ішемія призвела до збільшення кількості клітин у селезінці і посилення їх проліферативного потенціалу порівняно з псевдооперованими тваринами. У мишей лінії *FVB* число спленоцитів дещо зменшується, а їх проліферативна активність залишається без змін. Виявлені генетичні особливості популяційного складу селезінки. Так, для мишей лінії *FVB* характерна більша кількість лімфоцитів субпопуляції $CD4^+8^-$ та менша — з фенотипом $CD4^+8^+$. Ішемія не призвела до істотних змін кількості лімфоїдних клітин в тимусі у мишей обох ліній, однак у мишей лінії *FVB* значення показника менші. При фенотипуванні лімфоїдних клітин тимусу не виявлено змін в кількості ранніх попередників тимоцитів $CD4^+8^-$ та малодиференційованих $CD4^+8^+$. У мишей лінії *FVB* ішемія призвела до зниження кількості зрілих $CD4^+$ -клітин. У мишей обох ліній спостерігалася тенденція до зниження кількості $CD8^+$ -клітин в тимусі. Відмінностей

функціональної активності тимоцитів у мишей різних ліній не спостерігалося. У ішемізованих мишей лінії *CBA/Ca* вміст ТСФ підвищується, тоді як у мишей лінії *FVB* — зменшується. У мишей лінії *FVB* на фоні ішемії було виявлено більш виражене зниження відносної та абсолютної кількості КУК-Ф. Зниження на фоні ішемії потенціалу клітин до утворення колоній фібробластного ряду може вказувати на деякі відмінності їх функціонування у мишей різних ліній. Істотних змін кількості КУК-ГМ у мишей обох ліній виявлено не було. Провівши аналіз субпопуляцій кісткового мозку, було виявлено, що у мишей лінії *CBA/Ca* дещо знижувалась кількість клітин із фенотипом $CD3^+$. У ішемізованих мишей обох ліній спостерігалася тенденція до зниження кількості $CD4^+$ - та $CD8^+$ -клітин з вищими значеннями цих показників у мишей лінії *FVB*.

Висновки. Ішемія призводить до змін значень показників імунної системи. На моделі ішемічного пошкодження головного мозку виявлені відмінності функціонального стану не тільки периферичної, але й центральної ланки імунної системи у мишей різних ліній. Результати можуть бути підґрунтям для подальшого вивчення умов та можливостей підвищення ефективності використання нейрогенних стовбурових клітин для лікуванні ішемічних пошкоджень головного мозку і розробки індивідуалізованих підходів до такої терапії.

ВПЛИВ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ЕПІФІЗА ТА ТИМУСА ПРИ ІШЕМІЧНОМУ ПОШКОДЖЕННІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

І. Ф. Лабунець, О. М. Цупиков, В. М. Кирик, О. В. Кучук, Т. А. Півнева,
Г. Г. Скибо, Г. М. Бутенко

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Перспективним напрямом у регенеративній медицині є вивчення можливостей застосування нейрогенних стовбурових клітин (НСК) у лікуванні ішемічних уражень головного мозку. Отримані позитивні результати щодо відновлення структури нейронів гіпокампа ішемізованих тварин за допомогою трансплантації фетальних НСК (Цупиков О.М. та співавт., 2009), однак механізми впливу останніх потребують подальшого дослідження. Встановлено, що введення мелатоніну (основного гормону епіфіза) тваринам із ішемією має нейропротекторний ефект через посилення синтезу антиоксидантних ферментів і здатність цього гормону впливати на диференціювання НСК. Крім того, показано активуючий вплив мелатоніну на ендокринну функцію тимуса — центрального органу імунної системи (Лабунець І. Ф., 2005) і значення дисфункції цієї системи в патогенезі ішемічного інсульту (J. Yan *et al.*, 2009).

Мета роботи — дослідити функціональну активність епіфіза і тимуса та провести аналіз структурних змін CA1-зони гіпокампа у мишей із ішемією головного мозку та після введення НСК.

Матеріал та методи. Досліди проведені на статевозрілих (3–4 міс) самицях мишей лінії *FVB* дикого типу та *FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J*, трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (*GFP*). Ішемічний інсульт у мишей лінії *FVB* моделювали шляхом 20-хвилинної двосторонньої оклюзії сонних артерій. Контроль — псевдооперовані тварини. Фетальні НСК отримували з мозку плодів 12,5-добового розвитку від мишей лінії *FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J*, трансгенних за *GFP*, і трансплантували у головний мозок тваринам з ішемією через 24 год після оклюзії. Частині ішемізованих тварин вводили фізіологічний розчин. Дослідження проводили у інтактних тварин через 24 год після операції та через 1 міс після введення фетальних НСК або фізрозчину. У тварин всіх експериментальних груп визначали концентрацію в крові мелатоніну радіоімунним методом та вміст тимічного сироваткового фактору (ТСФ). У тварин також досліджували структуру гіпокампа за допомогою імуногістохімічного забарвлення на маркери: для нейронів — *NeuN*; астроцитів — *GFAP*, мікроглії — *Iba-1*.

Результати. Встановлено, що концентрація мелатоніну в крові інтактних мишей і через 24 год після моделювання ішемії становить, відповідно ($75,6 \pm$

26,5) пг/мл та (58,6 ± 15,9) пг/мл. Через 1 місяць у ішемізованих тварин, яким вводили фізіологічний розчин, рівень в крові гормону зменшується до (11,42 ± 2,4) пг/мл і при цьому відрізняється від інтактних тварин ($P < 0,05$); через 1 місяць після введення фетальних НСК концентрація в крові мелатоніну виявилась вищою, ніж в групі ішемізованих тварин із введенням фізрозчину — (43,16 ± 15,5) пг/мл. У ішемізованих тварин, яким трансплантували фетальні НСК, у гіпокампі були виявлені *GFP*-позитивні клітини, які диференціювалися в клітини з нейронним (експресія *NeuN*) та гліальним (*GFAP*-позитивні) фенотипом. При індивідуальному аналізі виявляється, що серед тварин цієї групи у разі більш високих значень мелатоніну ступінь збереження тканини гіпокампа виявляється вищою. Більш того, через 1 місяць у ішемізованих тварин, яким вводили фетальні НСК, рівень у крові ТСФ (\log_2 титру) перевищує ($P < 0,05$) значення не тільки у ішемізованих тварин, яким вводили фізрозчин, але й у інтактних тварин (відповідно $7,2 \pm 0,7$, $5,5 \pm 0,9$ і $5,0 \pm 0,2$).

Висновки. Після введення фетальних НСК рівень мелатоніну в крові ішемізованих тварин підвищується, що корелює із відновленням структури гіпокампа і підвищенням концентрації в крові тимічного гормону.

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫС

А. С. Лебединский, А. Н. Сукач, О. А. Оченашко, А. Ю. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

В настоящее время для коррекции нейродегенеративных состояний большие надежды возлагают на использование клеточной терапии. Одним из наиболее перспективных источников клеток для этого являются фетальные ткани. Клетки фетального происхождения являются гетерогенной смесью, которая состоит главным образом из дифференцированных, прогениторных и стволовых клеток. Однако в связи с потенциальной плюрипотентностью фетальных клеток и их высокой пролиферативной активностью существует опасность возникновения аберрантных клеток, что может привести к образованию опухолей. Поэтому вопрос безопасности остается одним из главных требований при их использовании в терапевтических целях.

Нервные клетки (НК) выделяли из тканей мозга плодов крыс 15–16 сут гестации. Замораживание НК проводили в среде культивирования в присутствии 10 % ДМСО со скоростью 1 °С/мин до 80 °С, после чего контейнеры с клетками помещали в жидкий азот. Повреждение спинного мозга формировали путем удаления правого сегмента на уровне 10-го позвонка грудного отдела, что приводило к устойчивому нарушению двигательной функции задних конечностей. Для трансплантации использовали размороженные НК, смешанные с 13 % альгинатным гелем или со средой культивирования в соотношении 1:1. Клетки (15–20 млн.) вводили в зону повреждения сразу после проведения операции. Контрольной группе животных вводили эквивалентный объем альгинатного геля.

Через 1 неделю после операции животные, которым не проводили трансплантацию, и животные, которым в зону повреждения вводили альгинатный гель, характеризовались ограниченной подвижностью левой задней конечности и полной неподвижностью, а также отсутствием болевой чувствительности правой. Через 1 мес после операции наблюдалось существенное восстановление чувствительности левой задней конечности, вплоть до полной нормализации. При этом у животных обеих групп было отмечено восстановление болевой чувствительности правой задней конечности, однако ее подвижность или вообще не восстанавливалась, что сопровождалось атрофией мышц, или восстанавливалась в очень незначительной степени и ограничивалась появлением мышечного тонуса. У животных обеих групп также наблюдался парез правой половины брюшной стенки. В ходе дальнейшего наблюдения на протяжении 4 мес подвижность задних конечностей медлен-

но восстанавливалась, но полного восстановления не происходило. Животные, которым вводили в зону повреждения только суспензию деконсервированных НК и такую же суспензию, смешанную с альгинатным гелем, через 1 неделю после операции характеризовались отсутствием подвижности и чувствительности в правой задней конечности и слабым мышечным тонусом или ограниченной подвижностью левой. Через 1 мес после операции наблюдалось значительное восстановление чувствительности левой задней конечности, а также ограниченное восстановление подвижности правой — животные на нее опирались, наблюдался хватательный рефлекс пальцев. Через 3 мес после операции степень подвижности обеих конечностей прогрессивно восстанавливалась, однако нарушения (в особенности правой задней конечности) сохранялись.

За время наблюдений никаких злокачественных или доброкачественных образований ни у одного из 55 подопытных животных выявлено не было. Таким образом, можно сделать вывод о безопасности трансплантации фетальных НК при их стимулирующем воздействии на процессы восстановления при повреждении спинного мозга крыс.

МОЖЕТ ЛИ МАТЕРИНСКИЙ ГЕНОТИП ОКАЗЫВАТЬ ВЛИЯНИЕ НА ВЕРОЯТНОСТЬ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ У ДЕТЕЙ?

О. Д. Левданский, И. М. Голоенко, М. Г. Синявская, Н. Г. Даниленко,
В. Г. Объедков *

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск
*Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Шизофрения представляет собой психическое заболевание, характеризующееся нарушением восприятия реальности. Данная патология является достаточно широко распространенной в человеческих популяциях (по некоторым данным, риск развития шизофрении составляет около 0,5 %). Как показывают многочисленные исследования, на развитие шизофрении оказывают влияние, как факторы окружающей среды, так и генотип. Кроме того, значительный вклад в определение вероятности возникновения данного заболевания должен вносить и материнский генотип, т. к. он играет важную роль в формировании окружающей среды плода в течение эмбрионального развития.

Цель работы — изучение того, каким образом материнский генотип может влиять на вероятность возникновения шизофрении.

Обследуемые и методы. В качестве объекта исследования служили 100 пар образцов ДНК пациентов, страдающих шизофренией, их матерей и 49 контрольных пар без каких-либо психических расстройств. Генотипирование проводили методом мультиплексной ПЦР (по локусам *GSTM1* и *GSTT1*) или с помощью ПЦР/ПДРФ (замена *C677T* в гене *MTHFR*) с последующим гелелектрофорезом.

Результаты. Частота выявления материнских генотипов *GSTM1*¹⁻/*GSTT1*¹⁻ была значительно выше в группе больных по сравнению с контрольной выборкой при гетерозиготности матерей по замене *C677T* в гене *MTHFR* ($P = 0,048$). Генотипы *GSTM1*⁰⁰/*GSTT1*⁰⁰ в комбинации с *C/C*- или *C/T*-генотипом *MTHFR*, наоборот, были обнаружены значительно реже среди матерей больных шизофренией, чем у матерей здоровых индивидов ($P = 0,037$). Дети с генотипом *C/T MTHFR* были обнаружены гораздо чаще в контрольной группе, чем в группе больных шизофренией, если матери имели *GSTM1*¹⁻/*GSTT1*¹⁻ и *C/C MTHFR*-генотип ($P = 0,024$). Напротив, среди пар, в которых у матерей был обнаружен *GSTM1*¹⁻/*GSTT1*¹⁻ и *C/T MTHFR*-генотип, частота выявления *C/C MTHFR*-генотипа у детей была значительно ниже в контрольной группе ($P=0,042$).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что не только материнский генотип играет определенную роль в формировании шизофрении, но и разные комбинации генотипов матери и ребенка способны оказывать влияние на развитие данной патологии.

ЧАСТОТА РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНОТИПІВ ЗА АЛЕЛЬНИМ ВАРІАНТОМ *4 ГЕНА CYP2D6 У НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ

Н. М. Левкович, З. І. Россоха*, Н. Г. Горovenко**

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ,

*Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України, Київ

**Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика
МОЗ України, Київ

Метаболізм багатьох широкоживаних лікарських засобів (ЛЗ) відбувається за участі ферменту I фази детоксикації — CYP2D6, який є представником родини цитохромів P-450. Активність ферменту, що задіяний в метаболізмі ЛЗ, генетично детермінована. Зміни в структурі гена, а саме однуклеотидна заміна в положенні 1934G-A (CYP2D6*4), призводить до втрати активності ферменту та появи фенотипу *PM* (*poor metabolizer*, слабкий (повільний) метаболізатор), який приводить до накопичення високих рівнів неметаболізованих ЛЗ (субстратів CYP2D6) і є причиною небажаних реакцій на ліки та взаємодію між ЛЗ. Дослідження розповсюдження алейного варіанту *4 гена CYP2D6* в Україні не проводилися.

Мета роботи — визначити частоти розповсюдження генотипів за алейним варіантом *4 гена CYP2D6 (*wt/wt*, *wt/*4* і **4/*4*) у населення України.

Обстежувані та методи. Обстежено 906 осіб (355 чоловіків і 551 жінка) віком від 0 до 98 років, які не мали органічних захворювань внутрішніх органів. Усіх осіб було розподілено за віком на групи: до 25 років, 25–40 років, 41–65 років та старше 65 років. Генотипи *wt/wt*, **4/wt* і **4/*4* визначали методом ПЛР-ПДРФ після попереднього виділення ДНК із лейкоцитів периферійної крові.

Результати. За результатами генотипування за алейним варіантом CYP2D6*4 нами було виявлено наступні частоти реєстрації генотипів: *wt/wt* — 64,79 %, *wt/*4* — 31,35 % і **4/*4* — 3,86 %. Нефункціональний алей CYP2D6*4 виявлено з частотою 0,19, а алей “дикого типу” CYP2D6 *wt* — з частотою 0,81. При аналізі реєстрації частоти алейя CYP2D6*4 у жінок і чоловіків та в різних вікових групах різниці в розподілі алейних варіантів гена CYP2D6 не було виявлено. Проведено порівняльну оцінку частоти виявлення генотипу CYP2D6*4/*4 у населення України в нашому дослідженні та в інших етнічних групах. Розповсюдженість алейного варіанту *4 гена CYP2D6 у населення України становить 0,19, а генотипів *wt/wt* — 64,79 %, *wt/*4* — 31,35 % та **4/*4* — 3,86 %. Отримані частоти істотно не відрізняються від аналогічних частот у білих європейців.

Висновки. Висока частота розповсюдження алейного варіанту *4 гена CYP2D6 у населення України зумовлює необхідність визначення генотипу особи за цим геном перед призначенням лікування тими ЛЗ, що метаболізуються ферментом CYP2D6, а при виявленні гомо- та гетерозиготного статусу за *4 — здійснення відповідної корекції індивідуальної дози.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Н. И. Лисяный

ГУ “Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины”, Киев

Терапия стволовыми клетками является новым подходом к лечению многих заболеваний, но в то же время широкое применение стволовых клеток пока что ограничено как по этическим, так и медицинским проблемам. Среди последних важны такие, как реакции отторжения аллогенных эмбриональных клеток, онкогенный риск и развитие аутоиммунного ответа на специфические антигены этих клеток. Существует достаточно противоречивые мнения по этим вопросам, требующие всестороннего изучения.

В наших исследованиях на мышах линий *CBA* и *C57BL* изучалась аллоантигенность фетальных (12–16 сут) нервных и печеночных клеток по сравнению с лимфоидными клетками взрослых животных, на которых полноценно представлены антигены гистосовместимости. Установлено, что уже с 12–18 сут после внутрибрюшинного введения клеток крови определяются цитотоксические аллоантитела в высоком титре. Цитотоксическая активность лимфоцитов выявляется на 6-е сут и достигает максимума на 12-е. Интенсивность иммунного ответа на аллоантигены, экспрессированные на лимфоидных клетках взрослых животных, была несколько выше, чем экспрессированных на эмбриональных нервных клетках.

Проведенными исследованиями установлено, что фетальные нервные и печеночные клетки (15–16 сут), содержащие как стволовые, так и прогениторные клетки, экспрессируют аллоантигены, которые индуцируют развитие полноценного клеточно-гуморального иммунного ответа с накоплением в крови лимфоцитов и цитотоксических антител. Полученные данные подтверждаются исследованиями, выполненными ранее (Любич Л. Д., 2008; Лисяный Н. И., Любич Л. Д., 2009), в которых показано, что помимо иммунного ответа на аллоантигены фетальных клеток несколько позже (на 30–40-е сут) возникает иммунный ответ на аутоантигены клеток головного мозга.

Таким образом, несмотря на противоречивость данных об экспрессии *HLA*-антигенов эмбриональными клетками, проведенные исследования показывают, что фетальные гематогенные и нервные клетки (12–16 сут гестации) экспрессируют достаточное количество аллоантигенов, способных вызвать иммунный ответ как на алло-, так и аутоантигены, что может быть причиной краткосрочности эффекта и недостаточной эффективности такой терапии, особенно при повторных курсах лечения.

КЛІТИННИЙ ТЕСТ ЗА ЗМІНАМИ МСК ПРИ ЇХ ПАСАЖУВАННІ

Л. І. Лихачова, Т. А. Рубан, О. М. Сухорада,
О. Г. Дерябіна, В. А. Кордюм

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Однією із перешкод до широкого використання клітинних технологій в медицині є достатньо високий ризик. В культурах, отриманих із первинного експлантату, при пасажуванні (що є необхідним етапом для нарощування достатньої для отримання терапевтичного ефекту кількості відповідних клітин) відбуваються небажані зміни, які можуть являти потенційну небезпеку при подальшій трансплантації мультиплікованого матеріалу. До числа можливих ускладнень можна віднести небажані імунні реакції організму, токсикози, виникнення пухлин та ін. Для перевірки на безпеку існує ряд методів, які дозволяють ідентифікувати деякі зміни, що відбуваються в культурі при пересівах, зокрема виявлення хромосомних аберацій, транслокацій, делецій, зміни білкових маркерів, розташованих на поверхні клітин, та ін. Але, на жаль, далеко не завжди відомо, які та скільки змін відбулося в клітинах при культивуванні, тому потрібний певний інтегральний тест, який би показував, що зміни відбулися і клітини стали чужими, небезпечними для організму.

У самому організмі виявлення та вилучення чужорідних, небезпечних елементів виконує імунна система. Це було покладено в основу даної роботи, яка зводилася до того, щоб відтворити елементи імунного нагляду *in vitro*. Ми пропонуємо новий спосіб, який дозволяє досить просто і з високою індивідуальною специфічністю визначати та знешкоджувати змінені, несумісні з організмом клітини, які призначені для трансплантації. Це було випробувано на конкретному прикладі шляхом додавання сумарної популяції елементів білої крові дорослої людини (використовували кров донорів) до культури мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих із пуповини людини. У визначених умовах клітини білої крові або взагалі не знищують, або знищують тільки дуже незначну частину МСК 0-го та 1-го пасажів. Але вже в другому та третьому пасажах відбувається значне руйнування МСК клітинами білої крові. При подальших пересівах МСК (4–8 пасажі) знищуються практично всі клітини культури. Виявлені інтегральні чинники, які сприяють цим процесам або їх блокують.

ВЛИЯНИЕ ЛЕЙКЕМИЯИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА СИНТЕЗ ГЕМА В СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Е. С. Лобанок, И. Б. Василевич

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”, Минск

Исследование механизмов управления метаболическими процессами в стволовых клетках (СК) приобретает особую актуальность в связи с развитием методов клеточной восстановительной терапии. Поведение и развитие СК строго контролируется генетической программой и теми сигналами, которые они получают от ближайшего окружения. В условиях *in vitro* основное свое свойство — “стволовость” — они сохраняют только в присутствии регуляторных молекул, влияние которых направлено на подавление спонтанной цитодифференцировки. В случае эмбриональных СК (ЭСК) мыши к таким регуляторным молекулам относится лейкемияингибирующий фактор (*LIF*). Если клетки культивировать в условиях отсутствия *LIF*, они очень быстро образуют эмбриоидные тельца. Общие представления об особенностях влияния *LIF* на метаболические процессы в ЭСК могут быть получены из анализа показателей, характеризующих синтез ключевого биологического соединения гема.

Цель работы — исследование влияния *LIF* на пролиферативную активность, содержание гема, его ранних предшественников — аминолевулиновой кислоты (АЛК) и порфириновых пигментов — в ЭСК мышей линии R1 без и после воздействия дифференцирующего агента — ретиноевой кислоты (РА).

Материал и методы. ЭСК культивировали на фидере из первичных мышинных фибробластов, инактивированных митомицином С (5 мкг/мл), в среде ДМЕМ (“Sigma”, США) с 15 % эмбриональной телячьей сывороткой (“HyClone”, США), 5 % CO₂ при 37 °С. Для запуска клеточной дифференцировки культуру выдерживали в течение 48 ч в присутствии РА (2,6 нМ). Содержание АЛК определяли на фотометре *Spekol 11* (Германия) при $\lambda = 555$ нм, порфириновых пигментов и гема — на спектрофлуориметре *СМ 2203 (Solar, РБ)* при $\lambda_{\text{в}} = 405$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 636$ нм.

Результаты. Установлена выраженная дозовая зависимость регуляторной функции *LIF* на ЭСК. При 10 нг/мл *LIF* наиболее эффективно поддерживается эмбриональный фенотип, пролиферативный потенциал, возрастает количество плюрипотентных колоний (60–80 %), снижается процент поврежденных клеток. Выраженность *LIF*-эффекта зависит от времени (к 48 ч заметно снижается). В ЭСК удалось определить лишь следовые количества АЛК и порфириновых пигментов. Поэтому для активации гемообразования был применен подход с использованием экзогенной АЛК (0,8 ммоль/л), которую вносили на 4 ч в культуру после 18 ч выдерживания ЭСК с *LIF* или без него.

В этих условиях в ответ на *LIF* в клетках регистрируется в 1,5 раза меньше АЛК, в 2 раза больше порфиринов, изменяется процентное соотношение отдельных видов порфириновых пигментов, но уровень гема не изменяется. На ранних этапах детерминированного развития в присутствии РА замедляется рост культур, снижаются как пролиферативная активность, так и *LIF*-эффекты на АЛК-индуцируемое гемообразование. В клетках падает количество АЛК, уро- и копропорфирина. Однако на фоне депривации сывороточных белков до 1 %, в неблагоприятных условиях культивирования при снижении жизнеспособности, пролиферативной активности, антиоксидантного статуса ЭСК проявляют большую чувствительность к *LIF*, которая становится выше, чем в плюрипотентных и обработанных РА клетках, культивируемых с 15 % ЭТС.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о чувствительности отдельных этапов синтеза гема к важнейшему модулятору развития культур ЭСК — *LIF* — и дают основание предположить существование в ЭСК регуляторного механизма, четко контролирующего внутриклеточный уровень гема.

ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ КЛІТИННОЇ КАРДІОМІОПЛАСТИКИ

Л. Л. Лукаш

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

Лікування серцевої недостатності (СН) є однією з головних проблем системи охорони здоров'я економічно розвинених країн світу. Статистика свідчить про зростання долі СН серед причин смертності населення — до 60 % загальної кількості померлих. Тому розробка принципово нових ефективних методів корекції СН є актуальним і необхідним завданням сучасної біомедичної науки. Це особливо стосується клітинної терапії серцево-судинних захворювань, пов'язаних зі втратою чи дефектністю кардіоміоцитів дорослого серця при вроджених і набутих вадах та після гострого інфаркту міокарда. Нещодавно показано, що, всупереч колишнім уявленням, при пошкодженні серцевого м'язу відбувається обмежене розмноження клітин-попередників кардіоміобластів. Проте при масивних пошкодженнях міокарда процес регенерації серцевої тканини за рахунок власних ресурсів організму є недостатнім для відновлення повноцінної функції серця. Тому сучасні підходи до розробки ефективних методів терапії таких захворювань передбачають не лише медикаментозне та хірургічне лікування, але і безпосереднє заміщення клітин, що загинули, на функціонально активні донорські або власні клітини людини.

За ідеальний тип донорських клітин для кардіоміопластики вважаються кардіоміоцити. Проте труднощі в отриманні достатньої кількості донорських клітин є серйозною перешкодою для їх широкого застосування в клітинній терапії. Також перспективним типом клітин можуть стати тканинно-специфічні стовбурові клітини або клітини-попередники, які були ідентифіковані в серцях ссавців і несуть маркер *isl-1+*. Як вже показано, саме ці клітини беруть участь у відновленні пошкодженого міокарда. Принципово можливо виділити клітини *isl-1+* з біопсійного матеріалу для подальшого розмноження *in vitro* і застосування в клітинній терапії. Але вся процедура підготовки аутологічних клітин для трансплантації (ізоляція, розмноження, тестування) займає занадто довгий час. Тому виникла практична необхідність використання аллогенних стовбурових клітин, які можливо напрацювати та диференціювати у відповідний тип клітин *in vitro*. В літературі наводяться приклади диференціювання різних типів стовбурових клітин у термінально диференційовані кардіоміоцити, найбільш характерною рисою яких є здатність до спонтанних автоматичних ритмічних скорочень. На основі даних, одержаних на прикладі ембріональних гермінативних клітин, нами була розроблена стратегія кардіоміогенного диференціювання з використанням дорослих мезенхімальних стовбурових клітин.

Якщо в перших дослідженнях *in vivo* використовувались головним чином гематопоетичні стовбурові клітини або диференційовані клітини, то

тепер увага більш зосереджена на мезенхімальних стовбурових клітинах, які є менш імуногенними. Так, розроблено підхід внутрішньовенної ін'єкції аллогенних мезенхімальних клітин для покращення функції лівого шлуночка на моделі свині з експериментальним інфарктом міокарда. Пряме введення мезенхімальних стовбурових клітин призводило до їх приживлення і диференціювання в кардіоміоцити та ендотеліальні клітини, а також до покращення функції інфаркту міокарда.

Клінічні випробування було розпочато з використанням аутологічних змішаних популяцій, що виділені з кісткового мозку, або клітинних популяцій, збагачених на гематопоетичні стовбурові клітини *CD34+*. Результати клінічних випробувань, проведених в різних медичних центрах Європи та США, різняться значною мірою, але клініцисти вважають, що дослідження є цілком безпечними для пацієнтів, і в окремих випадках отримано дійсно позитивні зміни в їхньому стані. При цьому спостерігалось деяке покращення (в середньому на 6–8,5 %) серцевої функції. Залишається проблемою негайна допомога пацієнтам під час хірургічної корекції серцевих патологій і після гострого інфаркту міокарда, стандартизація та біосинхронізація клітинного матеріалу. Створення клітинних банків дозволяє завчасно напрацювати в спеціальних умовах та обрати відповідний донорський матеріал, найбільш придатний для лікування даного пацієнта, що зменшує ймовірність посттрансплантаційних ускладнень.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ CYP1A1, GSTM1 У БОЛЬНЫХ ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ И С ПАРАЗИТАРНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Л. И. Лукманова, О. В. Кочетова, Т. В. Викторова

ГОУ ВПО “Башкирский государственный медицинский университет Росздрава”,
Уфа, Россия

Печень — это основной орган, ответственный за метаболизм чужеродных веществ, попавших во внутреннюю среду организма. При повышенной индивидуальной чувствительности человека защитные механизмы могут оказаться несостоятельными и привести к развитию токсического процесса.

Цель работы — изучение полиморфизма генов CYP1A1 (*Ile462Val* экзона 7) и GSTM1 (*N/del*), ответственных за биотрансформацию ксенобиотиков, у больных токсическим (профессиональным) гепатитом и у пациентов с цистным эхинококкозом печени.

Обследуемые и методы. Для изучения повышенного риска заболевания гепатитом обследованы рабочие со стажем работы на вредном производстве от 8 до 40 лет: 73 — с токсическим гепатитом и 94 — практически здоровые лица. Для изучения восприимчивости к паразитарному поражению печени были выбраны 56 больных с эхинококкозом печени и 75 здоровых и серонегативных в отношении эхинококкоза лиц. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984). Анализ гена CYP1A1 (кодирующего цитохром P-450 1A1) проводили методом ПЦР-ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции синтеза ДНК) с использованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров (Oyama *et al.*, 1991). Анализ гена GSTM1 (кодирующего глутатион-S-трансферазу M1) был выполнен в стандартных условиях методом ПЦР (Seidegard, *et. al.*, 1986).

Результаты. Исследования показали существенное повышение частоты выявления гетерозиготного генотипа *Ile/Val* гена CYP1A1 в группе рабочих с токсическим гепатитом (до 11,3 %) по сравнению со здоровыми рабочими, у которых частота данного генотипа составила 2,1 % (OR = 5,8). Изучение полиморфизма гена GSTM1 показало, что среди больных профессиональным токсическим гепатитом частота регистрации делеционного генотипа составляла 42,3 %, а в группе здоровых рабочих незначительно меньше — 32,6 % (P = 0,22). Распределение частот выявления генотипов CYP1A1 у больных с эхинококкозом также существенно отличалось от контроля. Установлено, что частота встречаемости гомозигот *Ile/Ile* у больных с эхинококкозом составляла 73,2 % (в контроле — 95,2 %), гетерозигот *Ile/Val* — 25,0 % (в контроле — 4,0 %), гомозигот *Val/Val* — 1,8 % (в контроле — 0,8 %).

То есть, частота регистрации гетерозиготного генотипа у больных была значительно выше, чем в контрольной группе ($\chi^2 = 10,93$, $P = 0,001$, $OR = 8,11$). Частота встречаемости делеционного генотипа *GSTM1* у больных с эхинококкозом составляла 42,8 %. В контрольной группе она была незначительно меньше и равнялась 32,9 % ($\chi^2 = 0,62$, $P = 0,43$).

Выводы. Повышенный риск развития гепатита при действии токсичных веществ производственной среды и восприимчивость к эхинококкозу печени, ассоциированы с гетерозиготным генотипом *Ile/Val* гена *CYP1A1*. Высокое значение показателя отношения шансов позволяет рассматривать этот генотип в качестве прогностического маркера.

ПЕРСПЕКТИВЫ КОРРЕКЦИИ СХЕМ ХИМИОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЭНЗИМА О6-АЛКИЛГУАНИН-ДНК-АЛКИЛТРАНСФЕРАЗЫ

В. В. Лыло, Л. А. Шапошник, Л. Л. Лукаш

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Соединения нитрозомочевины составляют обширную группу химиопрепаратов. Наиболее важный их эффект — алкилирование О6-позиции гуанина ДНК, приводящее к гибели раковых клеток, — устраняется действием фермента *MGMT*. Его уровень в различных злокачественных клетках может сильно варьировать и не коррелирует с уровнем фермента в нормальных клетках-предшественниках опухолевых. В зависимости от уровня экспрессии гена *MGMT* выделяют *Mer⁻* и *Mer⁺*-генотипы. При отсутствии экспрессии фермента (*Mer⁻*-генотип) опухоль высокочувствительна к алкилирующим агентам, что позволяет снизить их терапевтическую дозу и избежать побочных эффектов. Опухоли с *Mer⁺*-генотипом экспрессируют фермент в количествах, часто во много раз превышающих его уровень в нормальных клетках. Для того чтобы в таких случаях добиться лечебного эффекта, не всегда достаточно использовать стандартные дозы химиопрепарата. Одним из путей решения этой проблемы является применение веществ-ингибиторов активности фермента (например, в США прошел клинические испытания О6-бензилгуанин). Они вводятся незадолго до начала курса химиотерапии и снижают активность *MGMT* практически до нуля. При этом восприимчивость опухолевых клеток к алкилирующим препаратам увеличивается во много раз. Но из-за неизбирательности действия ингибиторов *MGMT* страдают клетки всего организма, а особенно — красный костный мозг, где фермента и так мало, поэтому серьезным побочным эффектом использования таких ингибиторов являются вторичные лейкозы. Для их предотвращения разработана схема генной терапии, предусматривающая аутотрансплантацию пациенту клеток костного мозга, трансфицированных вектором, несущим О6-БГ-устойчивый аллель гена *MGMT*.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУСПЕНЗИИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ МОЗГА ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

Т. Д. Ляшенко*, М. В. Шевченко*, А. Н. Сукач*#

*Харьковский национальный педагогический университет им. Г. С. Сковороды

#Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Нервные прогениторные клетки имеют большой потенциал использования как в исследовательских целях, так и для разработки и развития потенциальных терапевтических методов. Как первичный источник нервных прогениторных клеток человека рассматривают фетальную ткань. Однако постнатальный мозг также является потенциальным источником нервных прогениторных клеток, которые могли бы уменьшить или устранить недостатки эмбриональных и фетальных источников.

Нервные клетки (НК) выделяли из тканей мозга плодов 15–16 сут гестации и новорожденных крыс. НК культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂/95 % воздуха в концентрации 1–2 млн./мл в обогащенной среде DMEM/F12 в присутствии эмбриональной сыворотки. НК иммуноцитохимически окрашивали на маркер нейронов β-тубулин-3.

Культивирование свежeweделенных клеток, полученных из нервной ткани как плодов, так и новорожденных крыс в среде, не содержащей митогенов и обогащенной сывороткой, уже через несколько часов приводило к образованию агрегатов, размеры, структура и количество которых зависели от концентрации посеянных клеток и их жизнеспособности. Дальнейшее культивирование приводило к увеличению размеров плотно упакованных агрегатов. При этом структура некоторых “рыхлых” агрегатов изменялась на плотную. Морфологически плотно упакованные агрегаты не отличались от нейросфер. Пересев агрегатов приводил к активному прикреплению большинства агрегатов НК как плодов, так и новорожденных крыс. Однако агрегаты, образованные НК плодов прикреплялись на протяжении 1-х сут культивирования, а НК плодов — на протяжении 2–3 сут культивирования. Уже в 1-е сут культивирования клетки прикрепленных агрегатов начинали дифференцироваться и мигрировать. Прикрепления мелких рыхлых агрегатов, образованных НК с низкой жизнеспособностью, как правило, не происходило, и они в процессе культивирования деградировали.

В процессе миграции и дифференциации НК как плодов, так и новорожденных крыс наблюдалось образование длинных β-тубулин-3-положительных отростков, по которым происходила миграция клеток. Клетки, мигрировавшие от агрегатов, образованных НК как плодов, так и новорожденных, в первые 3-е сут культивирования были β-тубулин-3-положительными и характеризовались нейрональной морфологией. На 13–14-е сут культивирования

НК плодов формировали монослой на 80–85 % площади лунки, и на нем появлялись единичные клетки, морфологически похожие на нейробласты. На 16-е сут культивирования на монослое глии образовывались небольшие колонии клеток, которые в процессе культивирования увеличивались в размере. При культивировании НК плодов клетки, похожие на нейробласты, в отличие от фетальных появлялись значительно раньше — на 5–7-е сут. Они также появлялись на участках монослоя глии. На 11–15-е сут культивирования эти клетки формировали колонии, которые в дальнейшем увеличивались в размерах. В культурах НК как плодов, так и новорожденных нейробластоподобные клетки и клетки колоний были β -тубулин-3-положительными.

Таким образом, поведение изолированных НК мозга плодов и новорожденных крыс в условиях культивирования *in vitro* практически не отличается, что указывает на подобный качественный и количественный клеточный состав суспензий. Проведенные исследования позволяют рассматривать НК новорожденных в качестве альтернативного источника нервных прогениторных и дифференцированных клеток.

РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ ПОТЕНЦИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

С. В. Малышкина, О. М. Костицкая, И. В. Вишнякова,
О. А. Никольченко

ГУ “Институт патологии позвоночника и суставов им. М. И. Ситенко
НАМН Украины”, Харьков

В сложной структуре заболеваний позвоночника весомое место занимает патология межпозвонкового диска — одного из важных компонентов позвоночного сегмента. На сегодня в решении проблемы восстановления структуры деструктивно измененного межпозвонкового диска превалирует биологическое направление — применение достижений тканевой и клеточной инженерии. Однако до настоящего времени остается нерешенным вопрос адекватного источника клеток для трансплантации в деструктивно измененный диск.

Цель работы — изучить структуру поврежденного межпозвонкового диска крыс разного возраста после трансплантации культивированных аутологичных клеток.

Материал и методы. Материалом служили клетки, выделенные из межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника крыс (возрастом 3 и 12 мес) и культивированные в высокой плотности в течение 9 сут, а также межпозвонковые диски поясничного отдела позвоночника (этих же крыс) после моделирования в них травматического повреждения и трансплантации культивированных аутологичных клеток. Используются методы культуры клеток, морфологии, электронной микроскопии, гистохимии.

Результаты. На стеклах в зоне высева клеток межпозвонкового диска молодых крыс через 9 сут культивирования определялась значительно большая плотность клеток по сравнению с культурой старых крыс. Выявлялись клеточные скопления, которые у молодых крыс были крупными и в большем количестве. В клеточных скоплениях отмечены клетки преимущественно хрящевого дифферона. Ультраструктурная организация клеток молодых и старых животных была различной. В культуре клеток молодых крыс преобладали клетки с хорошо развитой системой гранулярной эндоплазматической сети и аппаратом Гольджи. В культуре клеток старых животных таких клеток было значительно меньше. Определялись клетки с деструктивными изменениями. Между клетками (в культуре клеток только молодых крыс) выявлялись тонкие коллагеновые фибриллы и крупные гранулы протеогликанов.

После трансплантации культивированных клеток в область повреждения межпозвонкового диска был проведен анализ их структурной организации через 14, 30 и 90 сут. Было установлено, что в структуре межпозвонковых дисков крыс разного возраста через 3 мес после трансплантации клеток выяв-

лялись выраженные различия. Так, в зоне студенистого ядра старых животных присутствовали участки фиброзной ткани, которая плотно окружала одиночные фрагменты разрушенного студенистого ядра. Местами наблюдались небольшие участки хондроиды, которые прорастали в трещины поврежденного фиброзного кольца. Края трещин не имели клеток и были окрашены выражено базофильно. Отмечены участки расслоения колагеновых волокон в пластинах и небольшие поперечные трещины. Плотность клеток между волокнами была неравномерной и преимущественно низкой. У молодых животных в студенистом ядре располагались крупные участки хондроиды с большой плотностью клеток хрящевого дифферона. Хрящевые пролифераты распространялись между пластинами фиброзного кольца, которое на таких участках сохраняло слоистость за счет концентрической ориентации пучков коллагеновых волокон. Клетки хрящевого регенерата были крупных размеров, имели слабобазофильную цитоплазму и крупные гипохромные ядра. Ультраструктурная организация таких клеток свидетельствовала об их высокой биосинтетической активности.

Выводы. Трансплантация культивированных аутологичных клеток молодых крыс в область повреждения межпозвонкового диска сопровождается формированием крупных территорий хондроиды. Трансплантация клеток от старых животных не приостанавливает деструктивный процесс в межпозвонковом диске.

ВПЛИВ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ВАРТОНІВСЬКОГО ГЕЛЮ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ У ПАСАЖАХ

О. О. Масло́ва¹, О. Г. Дерябі́на^{1,3}, С. М. Жу́кова², В. А. Кордю́м^{1,3}

¹ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

²Пологовий будинок № 5, Київ

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) з пуповини є на сьогодні недостатньо вивченим матеріалом у зв'язку з наявністю різних субпопуляцій мультиклітинної культури та рядом індивідуальних особливостей породіль, які обмежують стандартизацію. Проте вивчення кордового матеріалу як джерела МСК є надзвичайно перспективним. Цей матеріал не є предметом дискусій з приводу морально-етичних особливостей використання СК, його відносно легко отримати. Згідно з останніми даними, МСК із Вартонівського гелю пуповини здатні експресувати ембріональні маркери *Oct3/4* та *Nanog*, що свідчить про можливу плюрипотентність цих клітин. Але підтримання МСК у культурі є складним завданням. Тому дана робота спрямована на пошук оптимального складу поживного середовища у залежності від мети культивування — індукції диференціації чи підтримання мультипотентності клітин. Одним із найновіших та найменш досліджених перспективних компонентів поживних середовищ вважається збагачена тромбоцитами плазма (ЗБТП), яка є концентратом тромбоцитів у невеликому об'ємі плазми. ЗБТП є джерелом 7 основних ростових факторів, що беруть участь у процесі загоювання ран та впливають на розвиток культур клітин. Проте як додаток до поживних середовищ вона зазвичай не використовується. Існують відмінності у поглядах на вплив ЗБТП на МСК у культурі. Одні дослідження доводять ефективність додавання ЗБТП з метою підтримки дедиференційованого стану МСК, інші показують здатність ЗБТП індукувати остеогенез та хондрогенез.

Мета роботи — протестувати різні концентрації ЗБТП у поживному середовищі та обрати оптимальні умови для підтримання недиференційованого стану МСК.

Матеріал та методи. Було протестовано різні концентрації ЗБТП (від 5 % до 20 %) на різних пасажах (від 0-го до 6-го). Морфологічний аналіз проводили за допомогою класичного гістологічного забарвлення гематоксиліном та еозином (ядра забарвлювались *Hoehst 33342*), для морфометричних розрахунків використовували програму *Image J*. Для визначення спонтанної диференціації були використані барвники: альціановий синій (для виявлення глікозаміногліканів) і судан (для виявлення ліпідних включень).

Результати. При культивуванні клітин, отриманих з кордового матеріалу, на середовищі *DMEM* з додаванням збагаченої тромбоцитами плазми спостерігалось переважання фібробластоподібної субпопуляції клітин порівняно з додаванням ембріональної телячої сироватки, що є однією з ознак мультипотентності МСК. Показано, що додавання збагаченої тромбоцитами плазми підвищувало інтенсивність адгезії клітин до пластикового субстрату. Клітини, вирощені з додаванням збагаченої тромбоцитами плазми, не диференціювались спонтанно на перших пасажах на відміну від клітин, культивованих із додаванням ембріональної телячої сироватки.

ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ СХИЛЬНОСТІ ДО РОЗВИТКУ АКУШЕРСЬКОЇ ПАТОЛОГІЇ ТА ВРОДЖЕНИХ ВАД ПЛОДА

Д. О. Микитенко, О. І. Тимченко

ДУ “Інститут гігієни та медичної екології ім. О. М. Марзеева НАМН України”, Київ

В умовах соціально-демографічної кризи, що склалася в Україні, проблема патології вагітних і плода вирізняється винятковою актуальністю та соціально-медичною значимістю. Частота ускладнень вагітності сягає 60–90 % та співвідноситься з даними щодо обтяженості новонароджених патологією, що підтверджує положення про неблагополуччя у стані репродуктивної функції жінок. Приблизно в 75 % випадків акушерські ускладнення супроводжуються тромбофілічними станами. При цьому відомо, що близько 10 % населення Європи є носіями генетичних маркерів схильності до тромбофілічних станів (М. De Santis et al., 2006). Сучасна наукова література з розвитком спадкових тромбофілій пов’язує носійство поліморфізмів низки генів, серед яких найвагомішими є гени системи згортання крові (*FII, FV, FGB, PAI-I*), гени, відповідальні за тонус судин (*ACE, NOS3, GNB3*), та гени фолатного циклу й метаболізму гомоцистеїну (*MTHFR, MTR, MTRR*).

Алельні варіанти цих генів достатньо широко досліджуються у світі. Їх носійство пов’язане з неефективністю застосування фолієвої кислоти в системі періконцепційної профілактики патології вагітних і плода та може асоціюватися із синдромом втрати плода, акушерськими ускладненнями та деякими вродженими вадами плода. Однак питання поширеності поліморфізмів, їх клінічного значення для населення України залишаються практично невисвітленими. Необхідність подальших вітчизняних розробок у цьому напрямі пов’язана з міжрегіональною різницею у структурі генофонду населення та варіабельністю клінічних асоціацій поліморфізмів ДНК, що залежить від способу життя людини та особливостей впливу чинників середовища. На сьогодні дослідження, присвячені поширеності та клінічній значимості алельних варіантів генів, асоційованих із розвитком тромбофілічних станів, частково проведені у Харківському (О. Я. Гречаніна та ін., 2009–2009), Київському (Д. О. Микитенко, О. І. Тимченко, 2009–2010), Західному (Г. Р. Акоюн, Е. Й. Пацкун, 2009), Одеському (В. М. Запорожан, В. І. Лінніков, 2006) регіонах. Їх результати базуються на аналізі різних вибірковок груп, тому дають лише часткове уявлення про генетичні особливості української популяції. Проте вони дозволяють зауважити наступне: а) в репродуктивних втратах вагому роль відіграють генетично зумовлені порушення метаболізму фолатів, метіоніну, гомоцистеїну та пов’язаний з ними дисбаланс редокс-системи та механізму метилювання ДНК; б) з огляду на поширення серед населення України алельних варіантів гена *MTHFR* та притаманні їм особли-

вості метаболізму фолатів, використання фолієвої кислоти в системі періконцепційної профілактики патології вагітних і плода має здійснюватись виключно індивідуально.

За нашими даними, носійство *C677T*-поліморфізму *MTHFR* істотно підвищує ризик загрози переривання вагітності ($OR = 4,75$; 95 % ДІ = $2,11 \div 10,74$) та гестозу другої половини вагітності ($OR = 4,86$; 95 % ДІ = $1,71 \div 14,95$) незалежно від застосування фолієвої кислоти у схемі періконцепційної профілактики. Однак відсутність у більшості проведених досліджень кількісної оцінки клінічної значимості як окремих поліморфізмів ДНК, так і їх поєднань чи компаунд-комбінацій на сьогодні утруднює запровадження в практику охорони здоров'я існуючих методичних рекомендацій щодо профілактики патології вагітних і плода, прийняття конкретних адміністративних рішень та проведення економічного обґрунтування доцільності запровадження скринінгових програм.

Висновки: 1. поліморфізми генів фолатного циклу та системи згортання крові надають істотний внесок у структуру репродуктивних втрат.

2. поширеність та клінічна значимість поліморфізмів генів, асоційованих із розвитком тромбофілічних станів, в Україні вивчена недостатньо.

3. використання фолієвої кислоти в системі періконцепційної профілактики патології вагітних і плода має здійснюватись індивідуально.

4. економічне обґрунтування доцільності запровадження та обсягу скринінгових досліджень потребує кількісної оцінки клінічної значимості як окремих поліморфізмів ДНК, так і їх комбінацій.

ІМУНОГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ ЯК ЧИННИКИ ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ ТА ЕФЕКТИВНОСТІ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН У ХВОРИХ З ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Ж. М. Мінченко, О. О. Дмитренко, Т. Ю. Шляхтиченко,
І. С. Дягіль, В. І. Хоменко

ДУ “Науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Ефективність лікувальних заходів у значній мірі залежить від застосування диференціально-діагностичних критеріїв, які би допомогли вже на ранніх стадіях захворювання обрати найбільш оптимальний метод терапії. На нашу думку, вивчення клінічних ознак хвороби у поєднанні з молекулярно-генетичними маркерами і *HLA*-імуногенетичним паспортом є перспективним напрямом для визначення інформативного комплексу прогнозу перебігу захворювання та ефективності обраної терапії.

Обстежувані та методи. Обстежено 94 хворих з онкогематологічною патологією —мієломна хвороба. У схему обстеження пацієнтів — потенційних реципієнтів аутологічної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (ТГСК) — для додаткової характеристики особливостей захворювання крім клінічних, інструментальних, лабораторних і цитогенетичних даних були введені імуногенетичні дослідження. Антигенний склад еритроцитів за системою *ABO* досліджували уніфікованим методом із використанням стандартизованих моноклональних антитіл. Аallelні *HLA*-варіанти визначали методом аallel-специфічної ампліфікації із сіквенс-специфічними праймерами фірми *PROTRANS* (Німеччина).

Результати. Встановлено, що використання лікувальних заходів із застосуванням ТГСК є ефективним методом терапії хворих із множинною мієломою як патологією групи високого ризику. Найбільшу результативність метод набуває при наявності повної клініко-гематологічної ремісії основного захворювання на момент проведення трансплантації. Формування, перебіг та ефективність терапії із застосуванням ТГСК хворих з онкогематологічною патологією знаходяться у зв'язку з імуногенетичними маркерами крові: у хворих із мієломною хворобою вірогідно підвищена поширеність фенотипу *O(I)* системи *ABO*. Найгірша відповідь на *VAD*-терапію зареєстрована у хворих з груповою належністю *A(II)* на III стадії мієломної хвороби. У хворих із множинною мієломою чинниками генетичної схильності до даної патології є присутність у *HLA*-генотипі алелей *HLA-Cw*06*, *HLA-DQB1*0501* та *HLA-DQB1*0601*. Наявність гаплотипу *HLA-A*24,B*07* у генотипі хворих була

пов'язана з несприятливим клінічним перебігом. Так, у цих пацієнтів відзначалась відсутність відповіді на циторедуктивну терапію другої лінії. Можливо, у даному випадку має значення висока асоційованість даних алелей з низькою імунологічною реактивністю організму. Несприятливим чинником також можна вважати гомозиготність за алелями *HLA*-комплексу. Позитивна відповідь на трансплантацію аутологічних гемопоетичних стовбурових клітин асоційована з носійством алелей *HLA-Cw*06* ($RR = 6,52$) і *HLA-DQA1*0101* ($RR = 5,81$), які можна розглядати як незалежні прогностичні чинники ефективності відповіді на лікування.

Висновки. Позитивний досвід, здобутий у цьому напрямку, є передумовою для пошуку нових шляхів підвищення ефективності лікування хворих з онкогематологічною патологією (у тому числі із застосуванням методу ТГСК), а дослідження імуногенетичного паспорту пацієнта на етапах терапії сприяє оптимізації формування лікувальної тактики.

НОВА СТРАТЕГІЯ ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ ПРОТИ ПОВЕРХНЕВИХ КЛІТИННИХ АНТИГЕНІВ НА ПРИКЛАДІ БІОМАРКЕРА CD34 ЛЮДИНИ

Ю. С. Ніколаєв, О. Б. Горбатюк*

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ
*Київський національний університет ім. Т. Г. Шевченка

Мета роботи — розробка універсальної платформи для одержання одноланцюгових рекомбінантних антитіл (*ScFv*) проти поверхневих клітинних біомаркерів на прикладі антигену *CD34* із використанням автоматизованих високопродуктивних систем для відбору та скринінгу.

Матеріал та методи. Виділення мРНК, синтез кДНК, клонування, фаговий дисплей із використанням антиген-позитивних клітинних ліній при проведенні афінної селекції, імуоферментний аналіз, *FMAT* (*Fluorescent Microvolume Assay Technology*)-аналіз, проточна цитометрія, секвенування ДНК.

Результати. Одержано імунну комбінаторну бібліотеку кДНК *V*-генів імуноглобулінів миші представленістю $1,8 \cdot 10^6$ окремих клонів. Виділено та протестовано панель *ScFv*, що розпізнає антиген на поверхні клітин *CD34*-позитивної лінії *KG1*.

Висновки. Запропоновано нову стратегію одержання *ScFv* проти поверхневих клітинних антигенів. Стратегія базується на конструюванні комбінаторної бібліотеки кДНК *V*-генів імуноглобулінів тварин, що були імунізовані рекомбінантним антигеном, на афінній селекції бібліотеки з використанням антиген-позитивних клітин у процедурах біопенінгу, а також подальшому високопродуктивному скринінгу бібліотеки на наявність цільових антитіл.

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СИНГЕННИХ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ, СТИМУЛЬОВАНИХ КОНТАКТОМ ІЗ МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ТИМУСА, НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ОПРОМІНЕНИХ ТВАРИН

І. С. Нікольський, В. В. Нікольська, Д. О. Зубов, Л. І. Тарануха,
С.М. Галицька, Н. А. Лисиця, Я.-М. О. Семенова, О. Г. Федорчук,
О. Ю. Толерова*

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України”, Київ

*Національний інститут раку МОЗ України, Київ

Матеріал та методи. Вивчали радіопротекторні властивості таких препаратів ГСК: клітини ембріональної печінки мишей та ці ж клітини, інкубовані з культурою МСК тимуса. Оскільки відомо, що ГСК є ключовим елементом розвитку клітин кровотворної та імунної систем, для вивчення змін активності ГСК була обрана модель на основі летально опромінених тварин, загибель яких обумовлена кістково-мозковим синдромом і біологічною агресією. Летально опроміненим мишам лінії СВА наступного дня після опромінення вводили в/в $0,5 \cdot 10^6$ нормальних клітин ембріональної печінки (КЕП) або КЕП, преінкубованих 20 год із мультипотентними стромальними клітинами тимуса (МСК). За тваринами спостерігали 100 діб, фіксуючи загибель кожної миші.

Результати. Середня тривалість життя опромінених мишей ($n = 36$) становила $(14,2 \pm 1,3)$ діб, тварин, які отримували КЕП ($n = 30$), — $(25,3 \pm 3,4)$ діб ($P < 0,05$), а мишей, яким трансплантували стимульовані контактом з МСК тимуса КЕП ($n = 30$), — $(41,3 \pm 8,0)$ діб ($P < 0,05$). На 30 добу після опромінення вижило 9 % опромінених тварин, 15 % мишей, які отримували КЕП ($P < 0,05$), та 23 % тварин, яких лікували стимульованими МСК тимуса КЕП ($P < 0,05$). У мишей, захищених нормальними або стимульованими МСК тимуса КЕП, спостерігалось відновлення маси і клітинності селезінки, клітинності кісткового мозку та кількості КУО-Ф у ньому. Відновлювались практично до норми значення показників НСТ-тесту з перитонеальними макрофагами, РБТЛ лімфатичних вузлів та реакція ГСТ. Тільки під впливом трансплантації стимульованих МСК тимуса КЕП відбувалась нормалізація маси тіла мишей, тимуса та його клітинності, а також повне відновлення кількості гемаглютининів та гемолізінів. Гемолізини (\log_2 титру): нормальні миші — $4,1 \pm 1,8$; миші опромінені, які отримували КЕП, — $1,7 \pm 1,7$; миші опромінені, які отримували стимульовані МСК тимуса КЕП, — $4,6 \pm 1,6$ ($P < 0,05$).

Висновки. Проведеними дослідженнями встановлено, що в результаті контактної взаємодії з МСК тимуса ГСК КЕП збільшують потенціал радіозахисної, регенеративної та імунобіологічної активності.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА АПОЛІПОПРОТЕЇНУ *Eε4* З КОГНІТИВНИМИ ПОРУШЕННЯМИ У БОКСЕРІВ ІЗ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВИМИ ТРАВМАМИ.

С. М. Новікова, А. В. Муравський*, І. М. Пишель**

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

*Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України, Київ

** ДУ “Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України”, Київ

Вираженість когнітивних порушень після перенесених черепно-мозкових травм (ЧМТ) залежить від ряду чинників, таких, як характер та тяжкість травми, вік хворих, локалізація ураження, преморбідний когнітивний рівень, генетична схильність (наявність АпоЕε4). Доволі часто розлади когнітивних функцій виявляються у спортсменів контактних видів спорту (зокрема, боксерів) як під час активних занять спортом, так і в більш пізньому періоді.

Мета роботи — дослідити наявність генетичної схильності до когнітивних порушень на основі вивчення поліморфізму аполіпопротеїну *E* у боксерів з повторними легкими ЧМТ.

Обстежувані та методи. Обстежено 43 боксери віком від 18 до 26 років високого рівня кваліфікації, тривалість занять боксом яких становила від 5 до 14 років (чемпіони та призери чемпіонатів України, Європи, світу). Обстежувані боксери знаходились в підготовчому періоді. Кількість проведених боксерських поєдинків становила від 51 до 260, загальна кількість ЧМТ у виді нокдаунів у залежності від тривалості спортивної кар'єри коливались від 2 до 15. У контрольну групу увійшли 30 чол. віком від 18 до 25 років, які не мали в анамнезі перенесених ЧМТ. У всіх пацієнтів проводилось нейропсихологічне дослідження та генетичне тестування на предмет визначення генотипу та алелей АпоЕ. Нейропсихологічне дослідження включало в себе наступні методики: коротка шкала дослідження психічного стану (*MMSE*), батарея тестів лобної дисфункції (*FAB*), тест малювання годинника. Для визначення поліморфізму гена АпоЕ використовували набори фірми ООО “Центр молекулярної генетики” (Москва, РФ).

Результати. Результати генетичного тестування показали наявність трьох алельних варіантів ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) та чотирьох генотипів ($\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$, $\epsilon 4\epsilon 4$) досліджуваного локуса гена АпоЕ. Порівняльний аналіз розподілу частот алелей та генотипів гена АпоЕ між групою боксерів із повторними легкими ЧМТ та контрольною групою виявив певні закономірності. За частотою в обох групах домінував алель $\epsilon 3$, у групі боксерів дещо частіше зустрічались алелі $\epsilon 2$ і $\epsilon 4$. В обох групах домінував генотип $\epsilon 3\epsilon 3$, у групі боксерів частіше зустрічались генотипи $\epsilon 2\epsilon 3$ і $\epsilon 3\epsilon 4$. Дані нейропсихологічних тестів вказували

на зниження когнітивних функцій у боксерів. Мали місце легкі когнітивні порушення, переважно у пацієнтів з алелем $\epsilon 4$. У контрольній групі значення показників когнітивних функцій незначно відрізнялись від норми.

Висновки: 1. об'єктивізація когнітивних порушень потребує використання досить чутливих нейропсихологічних методик.

2. легкі когнітивні порушення у обстежуваної групи боксерів виражені частіше в порівнянні з групою контролю.

3. незважаючи на незначну вираженість, виявлені когнітивні порушення викликають стурбованість пацієнта, знижують якість життя, затруднюють виконання службових обов'язків.

4. відзначена кореляція між наявністю алеля $\epsilon 4$ з розвитком когнітивних порушень у осіб, які перенесли повторні легкі ЧМТ.

КЛОНУВАННЯ ФАКТОРА СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН *SDF-1A* ЛЮДИНИ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЙОГО СИНТЕЗ В КЛІТИНАХ *E. COLI*

О. В. Окунєв, Г. О. Константинова, Я. О. Похолоenko, Д. М. Іродов,
В. А. Кордюм*

ДУ “Інститут генної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

Міграція циркулюючих прогеніторних клітин у зону ураження при різноманітних патологіях сприяє як неоваскуляризації, так і регенерації пошкодженої тканини. Фактор стромальних клітин (*SDF-1a*) на сьогоднішній день є одним із найбільш досліджених чинників хоумінгу власних стовбурових та прогеніторних клітин кісткового мозку. До функцій *SDF-1a* відносять інгібування апоптозу, стимуляцію проліферації, посилення адгезії та рухливості клітин, хемотаксису та міграції. З літературних джерел відомо, що використання *SDF-1a* може сприяти відновленню тканини після ураження. Так цей фактор задіяний у процесі хоумінгу прогеніторних клітин кісткового мозку у зону ішемічного ураження нирки на моделі ішемії-реперфузії у мишей. Проте виділення *SDF-1a* із джерела його природного синтезу, а саме з кісткового мозку, в достатній кількості є неможливим. Тому одержання рекомбінантного *SDF-1a* людини для його дослідження та можливого подальшого застосування для лікування патологій є актуальним питанням.

Метою даної роботи було клонування кДНК гена *SDF-1a* людини, одержання продуценту та дослідження впливу компонентів поживного середовища на продукцію *SDF-1a* клітинами *E. coli* штаму BL21 (DE3).

Тотальну РНК виділяли з клітин кісткового мозку людини, використовуючи гуанідин-тіоціонатний метод. *PolyA*⁺-РНК була ізольована хроматографією на *oligo(dT)*-целюлозній колонці. Одержану *PolyA*⁺-РНК використовували як матрицю для синтезу кДНК за допомогою зворотньої транскриптази та олігонуклеотидної затравки (*oligo dT*). Одержаний набір кДНК кісткового мозку людини використовували для синтезу гена в реакції ПЛР із використанням *Pfu*-ДНК-полімерази. З метою спрощення виділення та хроматографічної очистки *SDF-1a* на 3'-кінець кДНК за допомогою праймерів було введено послідовність, яка кодує ділянку з 6 гістидинів, що дозволяє здійснювати рефолдинг та очистку рекомбінантного білка за допомогою іммобілізованої метал-афінної хроматографії. Первинну послідовність клонованої кДНК визначали секвенуванням.

Для експресії цільовий ген клонували у плазмідний вектор *pET-24a(+)*, який містить промотор одного з ранніх генів фага T7, та трансформували в клітини штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3). Клітини-продуценти *SDF-1a*

вирощували в складних поживних середовищах із додаванням до їх складу різних джерел вуглецю. Ферментацію проводили в умовах інтенсивної аерації протягом 3–18 год після додавання індуктора — ІПТГ — до кінцевої концентрації 1 ммоль/л.

Електрофоретичний аналіз білкової фракції клітин, які містили плазмідну ДНК, продемонстрував наявність поліпептиду з очікуваною молекулярною масою 8 кДа, яка відповідає *SDF-1a*. У контрольному варіанті рекомбінантний білок електрофоретично не виявлявся. Також було продемонстровано, що вихід цільового білка варіює в залежності від складу поживного середовища.

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ В УКРАЇНІ

Н. В. Ольхович^{1,2}, Н. О. Пічкур^{1,2}, А. М. Недобой², О. М. Грищенко²,
Т. П. Іванова², Н. Г. Горovenko^{1,2}

¹ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

²Центр метаболічних захворювань НДСЛ “Охматдит”, Київ

Лізосомні хвороби накопичення (ЛХН) — група спадкових метаболічних захворювань, що налічує на сьогодні близько 50 нозологічних форм. Переважна більшість ЛХН представляють собою тяжку інвалідизуючу патологію, провідною складовою якої є ураження центральної нервової системи. Розробка і успішне впровадження в медичну практику такого методу специфічної корекції, як ферментзамісна терапія (ФЗТ) дозволяє загальмувати процес накопичення патологічного субстрату в організмі і запобігти ураженню органів і систем.

Ферментативні дослідження ЛХН в Україні проводяться з 1995 р. і на сьогодні нараховують визначення активності 18 лізосомних ферментів, що дозволяє верифікувати 25 захворювань. За період з 1995 р. нами обстежено 784 пацієнта із 700 сімей з усіх регіонів України. Діагноз ЛХН підтверджено у 148 випадках з 141 сім'ї. 38 % усіх діагностованих нами ЛХН становили мукополісахаридози (11 % МПС I, 17 % МПС II, 13 % МПС IIIA, 7 % МПС IIIB, 2 % МПС IIIC, 17 % МПС IVA, 7 % МПС VI). У 27 % випадків сімей у одного або кількох сибсів була діагностована хвороба Гоше (35 пацієнтів мали ненейропатичний тип і чотири — хронічний нейропатичний). Серед інших ЛХН, діагностованих нами: метахроматична лейкодистрофія — 16 %, GM1-гангліозидоз та муколіпідози II/III — по 7 %, нейрональний цероїдліпофусциноз II типу — 5 %, α-манозидоз, хвороби Фабрі, Краббе і Сандхоффа — по 2 %, хвороба Тея-Сакса — 1 %.

На сьогоднішній день 49 % (19 із 39) пацієнтів із хворобою Гоше, 100 % (3) пацієнтів із хворобою Фабрі та 43 % (3 із 7) пацієнтів з МПС I отримують ФЗТ рекомбінантними лізосомними ферментами людини — Церезим®, Фабразим® та Альдуразим®, відповідно. В результаті ФЗТ були отримані позитивні зміни в клінічному стані пацієнтів. У всіх хворих спостерігалось істотне покращення самопочуття та зменшення слабкості і втомлюваності. У пацієнтів із хворобою Гоше симптоми вісцеромегалії (гепато- та спленомегалія) та прояви гіперспленізму (анемія та тромбоцитопенія) зменшились протягом 3–4 міс ФЗТ. У пацієнтів з МПС I типу спостерігалось покращення зовнішнього дихання, збільшення амплітуди активних та пасивних рухів у великих сугавах, підвищення денної рухливої активності. На жаль, у жодного з них не було відзначено значного впливу ФЗТ на дегенеративні зміни

серцево-судинної системи та на когнітивні функції. У пацієнтів із хворобою Фабрі спостерігалось зменшення больового синдрому, нормалізація термо-регуляції та зменшення темпів утворення нових ангіокератом.

Таким чином, ФЗТ є високоефективним способом корекції таких спадкових метаболічних захворювань, як лізосомні хвороби накопичення. Хоча ця терапія не приводить до повного відновлення усіх уражених органів і систем у хворих із ЛХН (особливо у хворих з МПС), але вона істотно покращує якість їх життя. Ефективність ФЗТ залежить від віку початку лікування, тому раннє виявлення захворювань є запорукою покращення якості життя цих тяжких хворих.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ КРИТЕРІЇ ПОРУШЕННЯ ФОЛАТНОГО ОБМІНУ У ДІТЕЙ З КОГНІТИВНИМИ РОЗЛАДАМИ

Н. В. Ольхович^{1,2}, З. І. Россоха³, С. П. Кир’яченко³, Н. О. Пічкур¹,
С. В. Подольська², Н. Г. Горовенко^{1,2}

¹Центр метаболічних захворювань НДСЛ “Охматдит”, Київ

²ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

³Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України, Київ

Ряд спадкових і набутих чинників приводить до порушення балансу між утворенням та утилізацією гомоцистеїну. У цьому випадку він накопичується в організмі і стає для нього токсичним, викликаючи ряд патологічних ефектів. 5,10-метилентетрагідрофолатредуктаза (*MTHFR*) — ключовий фермент фолатного циклу, який відіграє провідну роль у внутрішньоклітинному метаболізмі гомоцистеїну. У зв’язку з тим, що похідні фолієвої кислоти та вітамін B_{12} відіграють важливу роль в метаболізмі гомоцистеїну, їх дефіцит є частою причиною гіпергомоцистеїнемії. У пацієнтів з легкою та помірною формою гіпергомоцистеїнемії можна досягти зниження рівня гомоцистеїну до нормального шляхом призначення або фолієвої кислоти, або вітаміну B_{12} , або використовуючи обидва препарати. Але стандартне призначення фолієвої кислоти, як і інших вітамінів усім пацієнтам без урахування їх реальної концентрації у крові, індивідуальних особливостей і потреб може призвести до створення її надлишку в організмі і, як наслідок, несприятливо впливати на ріст і розвиток та навіть створити реальну загрозу розвитку серйозних ускладнень. Враховуючи вищенаведене, тактика лікування гіпергомоцистеїнемії має враховувати дані комплексного біохімічного і молекулярно-генетичного дослідження чинників, що її обумовлюють.

Матеріал та методи. Матеріалом для дослідження були зразки крові 76 дітей з когнітивною недостатністю та атактичними порушеннями. Молекулярно-генетичному дослідженню піддавали зразки периферійної крові хворих та контрольної групи для оцінки поліморфізму в 4-му екзоні гена *MTHFR* (C677T). Рівень гомоцистеїну визначали в плазмі крові на автоматичному біохімічному аналізаторі *Cobas Integra 400+* з використанням тест-систем виробництва *Roche Diagnostics*. Концентрацію фолієвої кислоти визначали в сироватці крові та еритроцитах на автоматичному імунохемилюмінесцентному аналізаторі *Cobas E411* з використанням тест-систем виробництва *Roche Diagnostics*. Фолатний статус визначали як інтегральний показник, який розраховується за рівнем фолієвої кислоти в еритроцитах та сироватці крові з урахуванням показника гематокриту.

Результати. У дітей з когнітивними розладами та атактичними порушеннями не було виявлено вірогідних відмінностей у розподілі частот реєстрації генотипів *MTHFR* порівняно з контрольною групою, хоча спостерігалась

певна тенденція до підвищення кількості гомозигот *TT* і зниження кількості гомозигот *CC*. Наявність гетерозиготності по алелю *T* у позиції 677 гена *MTHFR* вирогідно не асоціюється з гіпергомоцистеїнемією як у здорових, так і у дітей з когнітивними порушеннями. У гомозигот *TT* серед здорових дітей спостерігалась тенденція до незначного підвищення рівня гомоцистеїну, яка однак не досягала значень показників, що класифікуються як легка гіпергомоцистеїнемія. У гомозигот *TT* серед дітей з когнітивними розладами було встановлено вирогідне підвищення рівня гомоцистеїну до легкого ступеня порівняно із хворими з генотипами *CC* та *CT*. Значного зниження фолатного статусу (менше 200 нг/л), який би свідчив про серйозний фолатний дефіцит, не спостерігалось у жодного з обстежених. Аналіз фолатного статусу у дітей обох досліджених груп показав відсутність тісного зв'язку між цим показником та поліморфізмом локусу 677 в гені *MTHFR* як у здорових осіб, так і у дітей з когнітивними порушеннями.

Висновки. Аналіз результатів комплексного обстеження здорових дітей та дітей з когнітивними розладами та атактичними порушеннями показав, що жоден із вищезазначених показників фолатного обміну — поліморфізм гена *MTHFR*, рівень гомоцистеїну в крові або фолатний статус — сам по собі не може виступати як однозначний діагностичний критерій. Лише комплексне використання всіх цих показників разом з даними клінічного та параклінічного обстеження дозволяє виявити порушення фолатного обміну та їх вплив на розвиток патологічних станів і обрати правильну тактику лікування. Надійний лікувально-профілактичний ефект застосування фолієвої кислоти в медичній практиці можливий лише за умови раціонального і правильного її використання з урахуванням реальної її концентрації у крові, а також індивідуальних особливостей і потреб певного пацієнта.

СИНТЕЗ ІНТЕРФЕРОНУ ЛІМФОЦИТАМИ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПРОБІОТИКІВ ТА ІНГІБІТОРА ПРОТОНОВОЇ ПОМПИ

Л. І. Остапенко, В. В. Нікольська*, О. Г. Короткий, С. В. Пилипенко,
І. С. Нікольський*

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
*ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Формування нормальної морфофункціональної композиції імунної системи обумовлено антигензалежним диференціюванням клітин і можливо тільки у нестерильних тварин. Перманентні взаємозв'язки мікро- та макроорганізма протягом всього життя визначають стан бар'єрних тканин та органів, а також внутрішнього середовища організму. Тому фармакологічні препарати, які порушують рівновагу, можуть стати чинниками розвитку патології. До найбільш розповсюджених таких препаратів можна віднести блокатори протонної помпи, а саме омез, а імуноадекватними коректорами можна вважати пробіотики. Моніторинг їх впливу на організм доцільно проводити, досліджуючи інтерферони, які є ключовими чинниками антигензалежної диференцировки і можуть бути індикаторами складних процесів, які відбуваються за участю інтерферонсинтезуючих клітин.

Інтерферон визначали мікрометодом в супернатантах клітинних культур тимоцитів та спленоцитів за антивірусною активністю, враховуючи цитопатогенну дію вірусу везикулярного стоматиту в перевивній культурі фібробластів щура.

Тимоцити щурів, які отримували пробіотики, продукували більшу кількість спонтанного інтерферону, ніж клітини нормальних тварин, а продукція спонтанного інтерферону спленоцитами в таких умовах дещо змінювалась в більшу сторону, але не істотно. У тварин із пробіотиками спленоцити та тимоцити продукували значно більшу кількість індукованого інтерферону, ніж клітини нормальних щурів. Продукція спонтанного та індукованого інтерферону лімфоцитами щурів, які отримували омез, значно збільшувалась порівняно з нормальними тваринами та знаходилась на рівні продукції цитокіна тваринами, які отримували пробіотики. У щурів, що отримували омез і пробіотики, відзначалась чітка тенденція до підвищення продукції лімфоцитами спонтанного та індукованого інтерферону порівняно з тваринами, що отримували тільки омез.

Отримані результати свідчать про включення системи інтерферону в реакцію організму на досліджувані препарати та обумовлюють необхідність подальшого вивчення ролі окремих індукторів інтерферону та механізмів зміни індуктивності лімфоцитів.

ВПЛИВ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ЗАГОЄННЯ СТРЕСОВИХ ВИРАЗОК

Л. І. Остапченко, І. С. Нікольський*, С. М. Галицька*, Д. О. Зубов*,
Л. І. Тарануха*, В. В. Нікольська*, Я.-М. О. Семенова*, Н. А. Лисиця*

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

*ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Незважаючи на суттєві сучасні досягнення у вивченні етіології і патогенезу виразкової хвороби шлунка, широка розповсюдженість цього захворювання, частий торпідний перебіг і рецидивування робить виразкову хворобу актуальною проблемою і в теперішній час. Одним із найбільш перспективних наукових напрямів у цьому відношенні є дослідження ролі стресових процесів, реалізація котрих часто призводить до утворення виразок, справедливості чого для експериментальних умов відома ще з часів Г. Сельє. Потребують також вдосконалення методи лікування та профілактики, в основу яких мають бути покладені нові підходи з використанням останніх досягнень біології та медицини. Одним з таких сучасних напрямів є регенеративна медицина з використанням клітинних технологій, в тому числі мезенхімальних стромальних клітин (МСК). Здатність МСК до міграції в патологічні вогнища, мультилінійне диференціювання, експресія великої кількості адгезивних молекул, що обумовнює можливість мультиорганного хомінгу, та імуномодуючі властивості визначають перспективність дослідження впливу цих клітин на стресові виразки шлунка.

Виразкоутворення у щурів моделювали за допомогою гострого та пролонгованого імобілізаційного водоімерсійного стресу. МСК кісткового мозку, культивовані *in vitro*, вводили тваринам за 24 год до відтворення стресу в кількості $4 \cdot 10^6$ клітин.

Кількість виразок після гострого стресу становила $18,7 \pm 2,2$ ($n = 11$); у щурів, які отримували МСК, — $20,0 \pm 4,1$ ($n = 8$), у тварин після поглибленого стресу — $25,0 \pm 5,0$ ($n = 6$). Введення МСК цим тваринам приводило до зменшення ($P < 0,05$) кількості виразок до $8,0 \pm 3,0$ ($n = 6$). Площа виразкових уражень шлунка (мм^2) становила, відповідно: $10,17 \pm 1,19$, $14,19 \pm 4,32$, $20,45 \pm 3,92$ та $4,37 \pm 1,67$ ($P < 0,05$). При пролонгованому стресі у тварин, що отримували МСК, істотно вищою була клітинність тимусу, нижче кількість гемоглобіну, тромбоцитів, лейкоцитів, лимфоцитів та великих гранулярних лімфоцитів.

Таким чином, МСК змінюють значення загальних показників стресової реакції організму та ефективно сприяють загоєнню виразок при пролонгованому стресі.

КОРРЕКЦИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АЛЛОГЕННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

О. В. Оченашко, А. С. Лебединский, А. С. Сукач, А. Ю. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Лечение различных форм печеночной недостаточности (ПН) остается одной из самых актуальных проблем гепатологии. В большинстве случаев медикаментозная коррекция состояния таких пациентов оказывается малоэффективной, а при тяжелых формах ПН единственным радикальным методом лечения остается пересадка гистосовместимой печени. В связи с этим трансплантация суспензии клеток фетальной печени, обогащенной стволовыми и прогениторными клетками и биологически активными соединениями, все чаще рассматривается как перспективный подход в лечении ПН.

Материал и методы. В работе оценивали терапевтическую эффективность аллогенной трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) на течение ПН на двух экспериментальных моделях. Первую модель — цирроз печени (ЦП) — формировали путем введения крысам малых доз CCl_4 на протяжении 4 мес, вторую — ААФ/ЧГЭ — путем интрагастрального введения 2-ацетиламинофлуорена (ААФ) на протяжении 5 сут, после чего проводилась частичная гепатэктомия (ЧГЭ). КФП для трансплантации выделяли из печени плодов крыс 14–15-х сут гестации и криоконсервировали под защитой 10 % ДМСО. Животным со сформированной моделью ПН вводили в селезенку 10^7 аллогенных КФП, причем согласно схеме эксперимента, крысам с моделью ЦП — на 10-е сут после отмены инъекций CCl_4 , а животным с моделью ААФ/ЧГЭ — сразу после ЧГЭ. Контрольным группам в обоих случаях вводили эквивалентный объем среды криоконсервирования. Длительность наблюдения составила 1 мес. Течение ПН оценивали по динамике содержания альбумина и билирубина, активности ЛДГ, АЛТ и АСТ в сыворотке крови. В обоих случаях оценивали выживаемость животных, а после завершения эксперимента проводили гистологические исследования состояния их печени.

Результаты. На модели экспериментального цирроза установлено, что через 1 мес после ложной трансплантации у животных контрольной группы сохранялись все признаки ПН, характерные для цирроза. Выживаемость крыс составила 75 %. Введение КФП существенно не влияло на выживаемость, но постепенно улучшало биохимические показатели крови: увеличивало содержание альбумина и снижало уровень билирубина через 4 недели после трансплантации. Однако полной нормализации значений показателей в этот период не происходило. При гистологическом исследовании печени выявлено частичное восстановление структуры органа.

Наблюдение за животными с моделью ААФ/ЧГЭ в течение 21 сут после ложной операции показало, что при развитии ПН выживаемость крыс составила 48 %, при этом отмечалось резкое изменение биохимического профиля сыворотки. Введение КФП способствовало повышению выживаемости до 60 % и постепенному восстановлению значений показателей крови с достоверным отличием от контроля на 7-е и 21-е сут. Проведенные исследования позволили выявить позитивное действие трансплантации КФП, которое носило двухфазный характер: в пределах первой недели после трансплантации и в более отдаленные сроки.

Выводы. Результаты работы демонстрируют, что на двух экспериментальных моделях ПН введение КФП позитивно влияет на функцию и структуру печени и не оказывает негативного воздействия на организм крыс (по крайней мере, в течение периода наблюдения).

ІМУНОРЕАГЕНТИ, СТОРЕНІ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНИХ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ

М. В. Павлова

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

З розвитком новітніх технологій, які розширюють можливості детекції захворювань в медичній практиці, а також спрямовані на вивчення фундаментальних питань в біології, зростає потреба у створенні високочутливих імунореагентів. Найбільш поширеними сьогодні є моноклональні антитіла, одержані за гібридомною технологією. Проте існує комплексний підхід, який дозволяє створювати аналоги природних антитіл — рекомбінантні антитіла (pAt), а також забезпечує їх продукування в бактеріальних клітинах та інших гетерологічних системах. Такий підхід включає в себе методи створення та селекції великих комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів *in vitro* і дозволяє одержувати високоспецифічні імунореагенти проти широкого спектра антигенів. Як і класичні моноклональні антитіла, pAt можуть бути використані для виділення і встановлення характеристик біомолекул, для кількісного виявлення пікомолярних концентрацій певних речовин у біологічних рідинах, сортування і мічення клітин, виявлення місць пухлинного росту, нейтралізації токсинів тощо, але, разом з тим, мають низку переваг.

До переваг вищезгаданого підходу можна віднести достатню простоту методів одержання pAt необхідної специфічності, можливість продукування рекомбінантних антитіл в бактеріях, що зумовлює нижчу їх собівартість порівняно із моноклональними антитілами. Крім того, існує можливість проводити генетичні модифікації послідовностей pAt з метою підвищення афінності та/або стабільності останніх, а також створення на їх основі химерних білків: антитіл, генетично злитих з ферментами або флуоресцентними білками. Створення та використання таких імунологічних зондів нового типу відкриває принципово нові перспективи у дослідженні великої кількості молекулярних процесів, а також нові можливості їх застосування у сфері діагностики та лікування захворювань.

Оскільки найпоширенішим форматом pAt є одноланцюгові антитіла (*ScFv* — *single-chain fragment variable antibodies*), метою даної роботи було одержання на основі *ScFv* високочутливих високоселективних імунологічних реагентів та подальше використання одержаних молекулярних зондів у процедурах імунодетекції цільових білків.

Зі створених бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів миші вперше ізольовано та охарактеризовано панелі одноланцюгових антитіл проти таких білків, як *rhIFN-β1b*, *rhIFN-α2b*, *rhExCD34*. Проведено дизайн та створено генетичні вектори для експресії в бактеріях химерних білків, створених на

основі вищезгаданих *ScFv* та різних білків-партнерів — таких, як флуоресцентний білок *mCherry* та бактеріальна лужна фосфатаза — відповідно, *ScFv-AP* та *ScFv-mCherry*. Визначено молекулярні, біохімічні та імунологічні характеристики всіх вищезгаданих рекомбінантних білків. Створено колекцію бактеріальних продуцентів, які їх синтезують, та показано їхню стабільність. Показано можливість використання одержаних імунореагентів для імуноцитохімії та для визначення пікомолярних кількостей цільових білків в імуноферментному аналізі.

Виявлені властивості одержаних *ScFv* та створених на їх основі химерних білків дають підстави вважати, що дані імунореагенти в подальшому можуть стати основою для створення високочутливих тест-систем для детектування відповідних біомолекул.

МУЛЬТИЛИНЕЙНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ МОНОСЛОЙНОМ И ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

**А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н. А. Волкова, Н. Г. Скоробогатова,
А. И. Правдюк, Р. В. Иванов*, В. И. Лозинский***

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва

Цель работы — исследование пролиферативного и дифференцировочного потенциалов мезенхимальных стромальных клеток (МСК), полученных из различных тканей взрослого человека, в условиях монослойного и объемного культивирования в составе альгинатных микрокапсул и макропористых губок.

МСК выделяли из костного мозга, жировой ткани и дермы кожи взрослого человека в соответствии с этическими нормами. После экспансии в монослойной культуре иммунофенотип клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для инкапсуляции МСК смешивали с раствором альгината натрия и распыляли в раствор, содержащий ионы кальция. Макропористые губки изготавливали из альгината или агарозы с последующим ковалентным присоединением к поверхности пор желатина типа А. МСК культивировали в контрольной (среда экспансии) и дифференцировочных средах. Жизнеспособность МСК определяли по окрашиванию флуоресцеин диацетатом в сочетании с этидиум бромидом, пролиферацию и метаболическую активность — *Alamar Blue*-тестом. Дифференцировку осуществляли добавкой соответствующих индуцирующих факторов в среду культивирования, продукты дифференцировки определяли биохимическими и гистологическими методами.

Цитофлуориметрические исследования показали, что клетки, изолированные из костного мозга, жировой ткани и дермы кожи человека, после 4-го пассажа имели иммунофенотип, характерный для МСК ($CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD105^+$, $CD34^-$, $CD45^-$). В ходе следующего монослойного культивирования в присутствии соответствующих индуцирующих факторов МСК дифференцировались в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. После инкапсуляции в микросферы МСК не распластывались, сохраняя сферическую форму. При следующем культивировании альгинатинкапсулированные МСК не изменяли форму и практически не пролиферировали. Вместе с тем, клетки сохраняли жизнеспособность, метаболическую активность и способность к индуцированной дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Были разработаны условия заселения МСК макропористых губок на основе биодegradируе-

мых (альгинатные криогели) и небиodeградируемых (агарозные криогели) носителей. При использовании оптимальных условий заселения МСК равномерно распределялись в объеме макропористых губок, но не адгезировали к их поверхности, что сопровождалось потерей способности к пролиферации. Модификация носителей путем ковалентной сшивки желатиновых наночастиц к поверхности пор увеличивала адгезивные свойства носителя. В ходе следующего культивирования в широкопористых криогелях с модифицированной желатином поверхностью пор МСК пролиферировали и мигрировали, занимая весь объем носителя. Изучение дифференцировочных возможностей показало, что МСК в составе макропористых губок способны дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.

Рассматриваются вопросы о перспективах применения тканеинженерных конструкций на основе МСК в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Ю. А. Петренко, А. Ю. Петренко, С. П. Мазур, К. Блох*, П. Варди*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

* Университет Тель-Авива, Петах-Тиква, Израиль

Диабет 1-го типа развивается в результате повреждения инсулинпродуцирующих бета-клеток поджелудочной железы. Реверсии диабета удается добиться путем трансплантации островков поджелудочной железы, однако этот подход ограничивается недостатком доноров поджелудочной железы, сложностью получения и подбора панкреатических островков. В связи с этим большие надежды в лечении диабета возлагают на достижения регенеративной медицины, сфокусированные на направленной дифференцировке стволовых клеток в инсулинпродуцирующие клетки (ИПК). Перспективным источником для получения бета-клеток поджелудочной железы являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие широким (и до настоящего времени не полностью изученным) дифференцировочным потенциалом.

Цель работы — изучение способности МСК жировой ткани человека дифференцироваться в инсулинпродуцирующие клетки под влиянием индуцирующих факторов *in vitro*.

Материал и методы. МСК выделяли ферментативным методом из жировой ткани взрослого человека, полученной после процедуры липосакции с письменного согласия проинформированных доноров в соответствии с этическими нормами. Индукцию дифференцировки в ИПК проводили при культивировании МСК жировой ткани человека в среде с высоким содержанием глюкозы в присутствии или в отсутствие экстракта регенерирующей поджелудочной железы крыс или экстракта поджелудочной железы новорожденных поросят. Эффективность дифференцировки МСК в ИПК оценивали по окрашиванию культур дитизином, иммуноцитохимически по экспрессии инсулина и проинсулина, а также по содержанию инсулина, которое определяли иммуноферментным методом.

Результаты. В ходе культивирования в присутствии индукторов МСК изменяли свою морфологию и образовывали кластеры. Прилегающие к кластерам клетки приобретали эпителиоподобную морфологию. Часть клеток в монослое и в составе кластеров демонстрировали позитивное окрашивание антителами к инсулину и проинсулину, а также дитизином, цинк-хелатирующим агентом, который селективно окрашивает панкреатические β -клетки. Сравнительный анализ данных, полученных с использованием разных индуцирующих факторов, свидетельствует о том, что присутствие экстракта поджелудочной железы новорожденных поросят в наибольшей степени способствует дифференцировке МСК в ИПК. Это подтверждается результатами о способности клеток, дифференцированных в присутствии экстракта поджелудочной железы новорожденных поросят, синтезировать и секретировать инсулин.

Выводы. Результаты настоящей работы могут послужить основой при разработке новых направлений биотехнологии, предназначенных для медицинских целей, в частности для клеточной терапии инсулинзависимого сахарного диабета.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Ю. А. Петренко, А. Ю. Петренко, Е. Б. Ревенко,
Н. Н. Скоробогатова, Н. А. Волкова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Применение аутологичных и аллогенных фибробластов кожи человека продолжает оставаться актуальным в различных областях регенеративной и пластической хирургии, а также косметологии. Пул фибробластов дермы включает в себя клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. При этом наибольший интерес представляют собой самые ранние клетки мезенхимального ряда, которые являются малоизученными.

Цель работы — определение фенотипических характеристик и пролиферативно-дифференцировочного потенциала клеток дермы человека в условиях селективной экспансии *in vitro*.

Материал и методы. Фибробласты получали из биоптата кожи взрослого человека размером 3–4 мм после ферментативного отделения эпидермиса, иссечения дермы до микрофрагментов с последующей их эксплантацией и культивированием до образования вокруг них клеточного монослоя. Затем выполняли трипсинизацию сформировавшегося монослоя, высевали клеточную суспензию в специальные условия монослойного культивирования. После 4–5 пассажей методом проточной цитофлуориметрии определяли иммунофенотип клеток, для чего окрашивали клеточную суспензию моноклональными антителами *CD29-PE*, *CD45-PE*, *CD105-FITC*, *CD34 Class II-FITC*, *CD 38-RPE*, *CD44-FITC*, *CD73-PE*. Для определения мезенхимального дифференцировочного потенциала суспензию адгезивных дермы культивировали в присутствии остеогенной и адипогенной индуктивных сред. Об эффективности индукции остеогенной дифференцировки судили по экспрессии щелочной фосфатазы и по накоплению минерализованного матрикса, выявляемого по окрашиванию ализариновым красным и по методу серебрения Ван Косса. Индукцию адипогенеза оценивали по накоплению в цитоплазме вакуолей с нейтральными липидами, выявляемыми по окрашиванию красителем масляным красным *Oil Red O*. Пролиферативный потенциал оценивали по способности фибробластоподобных клеток к колониеобразованию при посеве 40 клеток/см².

Результаты. В ходе селективного монослойного культивирования адгезивных клеток дермы в течение 3–4-х пассажей была получена культура фибробластоподобных клеток, которые активно пролиферировали и были способны формировать колонии разного размера. Эффективность колониеобразования исследуемых клеток составляла свыше 10 %. Цитофлуориметрические исследования показали, что клетки, полученные из дермы взрослого человека, имели фенотип, характерный для мезенхимальных стромальных

клеток: $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD105^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$. При последующем культивировании исследуемых клеток дермы человека в адипогенной среде наблюдали изменения формы клеток, характерные для преадипоцитов. Через 2–3 недели культивирования в этих клетках обнаруживались сферические капли нейтрального жира, которые давали позитивное окрашивание *Oil Red O*. При культивировании в остеогенной среде клетки приобретали полигональную и кубоидальную форму и демонстрировали позитивное окрашивание на щелочную фосфатазу и минерализацию матрикса.

Выводы. На основании определения фенотипа, пролиферативных и дифференцировочных свойств фибробластоподобные клетки дермы человека, полученные при селективном культивировании *in vitro*, могут быть отнесены к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам.

ДОСВІД ВИКОРИСТАННЯ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ ЗМІН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

І. І. Піскун

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України

Смертність від серцево-судинної патології в Україні настільки висока, що її абсолютна величина у 2007 р. становила 1034 на 100 тис., що більше ніж втричі переважає цифри в США і в Західній Європі (Е. Н. Амосова, 2009), хоча в США приблизно 75 % кардіоваскулярної смертності обумовлено атеросклерозом, а ознаки цього захворювання виявляються у 80–90 % людей вже в 30 років (S. J. Lewis, 2008). За прогнозами експертів ВООЗ, у 2030 р. захворювання серцево-судинної системи — переважно ішемічна хвороба серця і інсульт — стануть причиною смерті більше ніж 23 млн. людей (Г. И. Кочуев, 2010). Кардіоваскулярна система дуже чутлива до тиреоїдних гормонів (Bernadette Biondi, 2002). Явний гіпотиреоїдизм найчастіше асоціюється з гіперхолестеринемією і зростаючим ризиком розвитку атеросклерозу (Aysin Oge, 2004). Чисельні клінічні та експериментальні спроби профілактики і лікування атеросклерозу основані на використанні засобів, які знижують рівень холестерину і атерогенних ліпопротеїнів у крові, що дає ефект тільки на час прийому препарату (С. Н. Новикова, 2009). Тому пошук антиатеросклеротичних засобів триває. Зважаючи на те, що атерогенез обумовлений генетичними чинниками і пов'язаний з мутаціями генів ліпопротеїнів, особливу зацікавленість викликає використання генної терапії з метою корекції структурних і функціональних змін щитоподібної залози за умов змодельованого холестеринним навантаженням атеросклерозу.

Матеріал та методи. Експеримент проводили на 30 білих лабораторних щурах-самцях, які були розподілені на 3 групи: 1 — інтактні щури, 2 — щури, яким моделювали атеросклероз протягом 30 діб за загальноприйнятою методикою шляхом щоденного введення холестеролу з соняшниковою олією із розрахунку 0,5 г/кг і 4(б) Метил-2-тіоурацилу із розрахунку 12 мг/кг для пригнічення функції щитоподібної залози; 3 — щури, яким на фоні моделювання атеросклерозу з лікувальною метою вводили ген АРО- E_2 по 50 мкг ДНК на тварину внутрішньом'язево, один раз на 15 добу експерименту. По закінченні досліду евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Після розтину тіла кров для біохімічного дослідження по визначенню гормонального статусу щитоподібної залози забирали з черевної аорти, а щитоподібну залозу виділяли для макро- та мікроморфометричного, гістологічного і гістохімічного досліджень. Для вимірювання мікромор-

тричних характеристик використовували програмне забезпечення *UTHSCSA Image Tool for Windows* (version 2.00) (Відео-Тест-5.0) в інтерактивному режимі з використанням об'єктива $\times 40$ і фотоокуляра $\times 10$. Програма морфометричних досліджень включала в себе визначення площин фолікулів, колоїду, фолікулярного епітелію, висоти та площі тироцитів і розрахунок фолікулярно-колоїдного індексу та індексу накопичення колоїду.

Результати. Проведене дослідження структури щитоподібної залози при експериментальному атеросклерозі виявило морфологічні ознаки її гіпофункції: збільшення площі фолікулів, сплюснення клітин фолікулярного епітелію (тобто зменшення висоти тироцитів), накопичення і ущільнення колоїду фолікулів і відсутності в ньому крайових резорбційних вакуолей, зменшення в крові рівня трийодтироніну і збільшення концентрації тиреотропного гормону. За умов генної корекції значення вивчених показників змінюються мало.

МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

Р. П. Піскун, Н. М. Мрих, А. В. Білошицька

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України

Починаючи з 1995 р., в Україні відзначено прогресуючий ріст смертності від серцево-судинних захворювань (ССЗ), що досяг у 2008 р. одного з найвищих рівнів у Європі (63,6 %), причому в структурі смертності від ССЗ перше місце (66,8 %) займає ішемічна хвороба серця. Щорічно в Україні реєструють біля 50 тис. нових випадків інфаркту міокарда (в 2008 р. — 50 368) (Бабушкіна А. В., 2009). Основою багатьох порушень серцево-судинної системи є атеросклероз. Поширеність атеросклерозу та його тяжкі ускладнення обумовлюють необхідність пошуку нових засобів, які б діяли на всі ланки патогенезу атеросклерозу і сприяли б регресу склеротичних змін в різних органах, особливо в серці. Із генетичних чинників, які причетні до атерогенезу, на сьогодні відомі поліморфні гени аполіпротеїну В, аполіпопротеїну Е, ліпопротеїнліпази, рецепторів ліпопротеїнів низької густини, білка-переносника ефірів холестерину, параоксонази, ангіотензиногена, рецепторів ангіотензину II, ендотеліальної синтази оксиду азоту, глутатіон-S-трансферази (Yusuf S., 2006). В нашій роботі ми застосовували генну корекцію з використанням гена апоЕ.

Матеріал та методи. Досліди проведені на білих лабораторних щурах-самцях, які були розподілені на три групи: 1 — інтактні тварини, 2 група — щури, яким протягом 30 діб моделювали атеросклероз, щоденно згодовуючи холестерол із розрахунку 0,5 г/кг маси тіла і 4(6)-Метил-2-тіоурацил із розрахунку 12 мг/кг; 3 (“профілактична”) — щури, яким в першу добу моделювання атеросклерозу вводили ген апоЕ по 50 мкг на тварину внутрішньом’язево. Після досліду евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Після розтину грудної клітки забирали кров для біохімічного дослідження показників ліпідного обміну, а також серце і печінку для подальшого морфологічного вивчення. На парафінових, зафарбованих гематоксилін-еозином зрізах цих органів вимірювали площу профілю, периметр та діаметр клітин і їх ядер, розраховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення та коефіцієнт формули клітин і їх ядер. Для вимірювання мікрометричних характеристик використовували програмне забезпечення *UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00)* (Відео-Тест-5.0) в інтерактивному режимі з використанням об’єктива $\times 40$ і фотоокуляра $\times 10$. На свіжозаморожених зрізах проводили гістохімічне виявлення ліпідів суданом чорним Б за методом Лізон.

Результати. Показано, що у тварин, яким моделювали атеросклероз, порівняно з інтактними тваринами зростають значення показників ліпідно-

го обміну крові (загальний холестерол, холестерол β -ліпопротеїнів, індекс атерогенності, загальні ліпіди), а також максимальний і мінімальний діаметри клітини і їх ядер, площа клітин і їх ядер, коефіцієнт формули ядра і, відповідно, зменшується ядерно-цитоплазматичне співвідношення, що вважається важливою діагностичною ознакою порушень структурних основ гомеостазу клітини. Гістохімічна реакція на ліпіди показала їх наявність у значній кількості в клітинах стромі обох органів та в гепатоцитах тварин з експериментальним атеросклерозом.

Висновки. Використання гена апоЕ призводить до часткової нормалізації значень показників ліпідного спектру сироватки крові та тенденції до нормалізації значень морфометричних показників кардіо- та гепатоцитів і вмісту ліпідів у стромі і паренхімі органів.

**ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ПРОГЕНІТОРНИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ
В ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ
ІШЕМІЮ КІНЦІВОК
(результати першого року клінічного дослідження)**

Ю. В. Поляченко, Р. В. Салютін, С. С. Паляниця

Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова НАМН України
Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

Незважаючи на досягнення сучасної медицини, лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок при оклюзійних та облітеруючих ураженнях термінальних судин залишається однією із складних проблем судинної хірургії. Незадоволення хірургів існуючими методами лікування хронічної ішемії кінцівок змушує до пошуку нових методів терапії, а саме до розробки методів непрямой реваскуляризації.

В рамках доклінічних досліджень на лабораторних тваринах проведено експеримент, результати якого свідчили про істотну стимуляцію процесів неоангіогенезу в ішемізованій м'язовій тканині після трансплантації прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки. Надалі, згідно з наказом МОЗ України від 10.10.2007 р. № 630 “Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань тканинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань”, Координаційним центром трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України на базі Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова було розпочато перший етап клінічних випробувань, метою яких є визначення та обґрунтування перспективності використання стовбурових клітин ембріо–фетального походження в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок. 12 хворим на хронічну ішемію кінцівок з “нереконструктабельним” ураженням периферичних артерій внаслідок облітеруючого атеросклерозу та ендартеріїту виконували внутрішньом'язову (сегмент гомілка-стопа) трансплантацію прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки. Пацієнтів обстежували до операції та через 1, 3, 6 та 12 міс після трансплантації за спеціально розробленим алгоритмом, що складався з опитувального листа, інструментальних та спеціальних методів дослідження.

У всіх хворих у кінці першого місяця після клітинної трансплантації отримані позитивні клінічні результати, а саме покращення загального самопочуття, збільшення в 3,5–4 рази дистанції безбольової ходи, самостійне загоєння трофічних виразок на стопі та пальцях. При проведенні інструментальних досліджень фіксували збільшення сегментарного тиску на ішемізованій кінцівці в середньому на 15–20 %. Дані лазерної флуометрії свідчили про покращання мікроциркуляції в дистальних відділах кінцівки вже

через місяць після проведення клітинної трансплантації. На 6-й місяць після трансплантації, за даними рентгенконтрастного артеріографічного дослідження, вздовж обтурованих магістральних судин мала місце значно розвинута колатеральна мережа. Крім того, за допомогою гістологічних, імуногістохімічних та електронно-мікроскопічних методів досліджували біоптати м'язової тканини у хворих, що брали участь у клінічних випробуваннях.

Результати досліджень показали активацію (вже на 1–3-й місяць після трансплантації стовбурових клітин) процесів неоангіогенезу в ішемізованій кінцівці, про що свідчила поява молодих ендотеліоцитів та неокапілярів, виражена експресія фактора Віллебранда, мезенхімального фактора віментину та колагену IV типу в стінках новоутворених судин. Отже, результати першого етапу клінічних досліджень свідчать про безумовну перспективність застосування в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок трансплантації прогеніторних стовбурових клітин фетальної печінки.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСТЕОРЕПАРАТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПУЛОВ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

А. Г. Попандопуло, В. В. Буше, В. М. Оксимец, А. В. Оберемко

ГУ “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака НАМН Украины”, Донецк

Проведены исследования, целью которых было изучение функционального состояния трех основных клеточных пулов из зоны повреждения костной ткани при различной интенсивности механического воздействия травмирующего агента.

Экспериментальные исследования выполняли на клеточных линиях периоста (1 группа), эндоста (2 группа) и МСК костного мозга (3 группа), полученных из зоны перелома лабораторных животных (крысы) с моделированной травмой высокой (1-я подгруппа каждой группы) и низкой (2-я подгруппа каждой группы) интенсивности. Контролем являлись клеточные линии эндоста, периоста и МСК костного мозга интактных животных. Морфо-функциональное состояние определяли с помощью методов фазово-контрастной микроскопии для визуализации культур, пролиферативную активность — МТТ-анализом (*Cell Proliferation Assay*), активность щелочной фосфатазы — цитохимическим методом с использованием субстрата *BCIP/NBT Liquid Substrate System*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основным источником формирования тканевого регенерата в костной ране являются МСК костного мозга. При травмах низкой интенсивности периостальные, эндостальные и костномозговые клеточные источники остеорепарации сохраняют присущее им морфофункциональное состояние — пролиферативную активность и остеогенную детерминацию (для клеток периоста и эндоста). Благодаря этому пролиферирующие в костную рану МСК находятся в окружении остеогенно детерминированных клеток, что создает условия для дифференцировки МСК по остеогенному пути и перестройки тканевого регенерата в костную ткань.

При травмах, возникших в результате воздействия травмирующего агента высокой интенсивности, периостальные и эндостальные источники остеорепарации гибнут на значительном удалении от линии перелома, а сохранившиеся клетки теряют остеогенную детерминацию. В результате этого МСК, пролиферирующие в костную рану, не могут сформировать костный регенерат. Индуцирование МСК происходит со стороны фибробластоподобных клеток, проникающих в костную рану из окружающих мягких тканей. Это приводит к формированию неспецифической рубцовой ткани.

ІНЖЕНЕРІНГ ТРИВИМІРНОЇ ПРЕОСТЕОГЕННОЇ ТКАНИНИ

А. Г. Попандопуло, А. В. Оберемко, В. М. Оксимець, В. В. Буше

ДУ “Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В. К. Гусака
НАМН України”, Донецьк

Відновлення кісткового дефекту є однією з головних проблем, яка сторіччями продовжує турбувати реконструктивних хірургів. Для вирішення цієї задачі було випробувано багато методів, але прорахунки кожного з них приводили до аналізу іншого.

З метою проектування тривимірної преостеогенної тканини були досліджені індуктивні властивості різних носіїв клітинних ліній: зразків гідроксиапатиту, склокераміки, губчастого і кортикального демінералізованого кісткового матриксу, біоматеріалу “Остеоматрикс” (“Конектбіофарм”, Росія). Метод клітинного культивування застосовувався для ізоляції і масштабування культур мультіпотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) і прогеніторних клітин окістя. Перед посівом клітин на носії здійснювали біоостеоіндукцію ММСК за розробленою і запатентованою нами технологією. Для поліпшення візуального спостереження за розташуванням клітин на поверхні скафолдів використовували метод мічення плазматичних мембран вітальними фарбниками *PKH67 Green* і *PKH26 Red Fluorescent* (“Sigma”, США). Для детекції лужної фосфатази використовували цитохімічний метод із використанням субстрату *BCIP/NBT Liquid Substrate System* (“Sigma”).

При специфічних умовах культивування ММСК індукувалися за остеогенним шляхом, що було підтверджено позитивним забарвленням на лужну фосфатазу. Гістологічний препарат нагадує кісткову тканину. Дана технологія дозволяє одержати 3D-остеопрогеніторний трансплантат *in vitro*.

ДЕВИТАЛИЗАЦИЯ ТКАНЕЙ КСЕНОГЕННЫХ СЕРДЕЧНЫХ КЛАПАНОВ

А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова, И. Ю. Мокрик, А. М. Салахова

ГУ “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака
НАМН Украины”, Донецк

Цель работы — получение ксеногенных девитализированных графтов сердечных клапанов.

Материал и методы. Исследовали сердечные клапаны, взятые у 6-месячных свиней. Децеллюлизация проводилась по пути индукции апоптотической гибели донорских клеток раствором ЭДТА. На первом этапе выделяли три группы исследований. Образцы сердечных клапанов первой группы помещали в раствор ЭДТА концентрацией 10 ммоль/л на одни сутки. Вторую группу клапанов помещали в раствор с такой же концентрацией на двое суток. Третью экспериментальную группу составили образцы, помещенные в раствор ЭДТА (5 ммоль/л) на двое суток. Все образцы прошли гистологическую окраску гематоксилин-эозином.

Результаты. Данные первого этапа исследований показали, что лишь в образцах, подвергавшихся действию раствора ЭДТА (10 ммоль/л) в течение двух суток, в толще клапана присутствовали отдельные клетки с эозинфильно окрашенной цитоплазмой, что свидетельствует о запуске в них процесса апоптоза. Учитывая результаты первого этапа исследований, на втором этапе экспериментальных групп также было три: первая — контрольная, интактная; вторая — образцы, помещенные в рабочий раствор, с концентрацией ЭДТА 10 ммоль/л на двое суток; третья — двое суток содержалась в условиях, аналогичных условиям второй группы. По истечению вторых суток образцы третьей группы отмывали от рабочего раствора и помещали в физиологический раствор еще на двое суток. Согласно гистологическому анализу образцов второго этапа исследований, третий путь воздействия оказался наиболее удачным. Это свидетельствует о том, что для реализации иницированного апоптоза необходимо некоторое время.

**РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДО СТВОРЕННЯ
БІОДЕГРАДАБЕЛЬНИХ МАТРИКСІВ
ІЗ КОЛАГЕНУ ІІ ТИПУ КУРЧАТИ
ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН,
ОДЕРЖАНИХ ІЗ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ**

**Я. О. Похолоenko, Л. Т. Рачкова*, Т. О. Рубан, О. М. Сухорада,
С. П. Величко*, С. П. Шпильова**

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

* Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

Впровадження в практику експериментальної біології та медицини методів довготривалого культивування клітин (особливо клітин-попередників спеціалізованих тканин) дало поштовх дослідженням, спрямованим на розробку нових технологій та підходів для реконструктивної медицини. Створення біодеградабельних матриксів, які можуть застосовуватися як для культивування клітин *in vitro*, так і для імплантації в пошкоджений орган чи тканину разом із донорськими чи аутологічними клітинами, є одним із напрямів сучасної тканевої інженерії.

Одним із перспективних матеріалів для виготовлення біодеградабельних матриксів є колаген. У порівнянні з багатьма синтетичними матеріалами він має наступні переваги: біосумісність, оскільки він є природнім компонентом позаклітинного матриксу; продукти його деградації не є токсичними для організму та його імплантація не викликає реакцію в організмі на введення чужорідного тіла.

Метою даної роботи була розробка підходів до створення біодеградабельних матриксів із колагену ІІ типу курчати для культивування та диференціації мезенхімальних стовбурових клітин, одержаних із пуповини людини.

Телопептиди колагену другого типу виділяли з грудного хряща курчати шляхом протеолітичного розщеплення пепсином. Грудний хрящ курчати було обрано як джерело колагену ІІ типу через доступність та низьку вартість вихідного матеріалу. Було розроблено методику одержання матриксів різної структури, а саме: фібрил, плівок та колагенових губок. Для одержання фібрил розчин колагену ІІ типу в 0,1 М оцтовій кислоті доводили до рН 7,2–7,6 додаванням 5-кратного фосфатного буферу та NaCl до кінцевої концентрації 0,15 М, після чого інкубували протягом 1 год при 37 °С. Колагенові плівки одержували з розчину колагену шляхом вакуумної сушки при кімнатній температурі. Колагенову губку одержували методом сублімаційної (ліофільної) сушки. Для цього розчин колагену ІІ типу у 0,1 М оцтовій кислоті поміщали у скляні чашки Петрі діаметром 35 мм та заморожували при –40 °С та –70 °С протягом 24 год. Далі зразки ліофілізували у

сублимаційній сушці при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 діб до повного висихання. Проведений аналіз стабільності колагенових губок при зберіганні показав, що губки, одержані заморожуванням при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, менше деформуються. Також, згідно з даними літератури, вони мають більший діаметр пор, що сприяє кращій дифузії газів та поживних речовин всередину губки. Тому в подальшому використовували саме ці колагенові губки. Для оцінки придатності створених матриксів для культивування клітин ссавців було використано клітини лінії *CHO-K1* та сублінії *CHO-K1 tk⁺ neo⁺egfp⁺ hig⁺*, а також мезенхімальні клітини, одержані з желе Вартона пуповини. Клітини висівали на створені матрикси та проводили культивування протягом 2–3 тижнів при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 .

Одержані дані свідчать про те, що створені нами матрикси з колагену II типу придатні для культивування клітин ссавців на прикладі *CHO-K1* та сублінії *CHO-K1 tk⁺ neo⁺ egfp⁺ hig⁺*, а також мезенхімальних клітин, одержаних із пуповини людини.

ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ПРОЦЕССА ПОДГОТОВКИ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ НА ОСНОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА (НА ПРИМЕРЕ ГЕНА АКФ)

И. Л. Рыбина, А. А. Михеев, А. А. Гилеп*

НИИ физической культуры и спорта Республики Беларусь, Минск
*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Обобщение передового опыта и результаты исследований свидетельствуют о том, что в спорте существует два перспективных направления использования результатов генетических исследований. Первое направление связано с совершенствованием многоуровневой системы отбора. Ключевыми здесь являются результаты генетических исследований претендентов перед началом спортивной деятельности и выдаваемые на их основе рекомендации по выбору спортивной специализации. Другой важной составляющей системы отбора является определение перспективности действующих спортсменов на этапах спортивного совершенствования. Еще одна важная сфера системы отбора, которая подразумевает использование генетических исследований в качестве решающего аргумента, — это ситуации, требующие решения при отборе в сборные команды различного уровня для участия в крупнейших соревнованиях. Второе направление связано с оптимизацией тренировочного процесса спортсменов. Результаты генетического исследования (в комплексе с другими исследованиями) могут использоваться в целях коррекции тренировочного процесса.

Изучены распределение полиморфных вариантов гена ангиотензинконвертирующего фермента (АКФ) у 520 высококвалифицированных спортсменов, занимающихся разными видами спорта, а также динамика физической работоспособности, переносимость тренировочных нагрузок, эффективность фармакологического обеспечения и результативность соревновательной деятельности у спортсменов с различными полиморфными вариантами исследуемого гена. Проведенные исследования распределения полиморфных вариантов гена АКФ у 320 жителей Республики Беларусь показали меньшую частоту встречаемости генотипа II (18,9 %) по сравнению с DD-генотипом (31,1 %).

Проведенные исследования показали, что результаты генетической экспертизы могут использоваться в целях коррекции тренировочного процесса относительно направленности и соотношения видов нагрузки, в частности, например, при выдаче рекомендаций, основанных на выявленных физиологических факторах риска у спортсмена в соответствии с его генотипом. Определение генетической предрасположенности является тем резервом,

раскрытие которого даст возможность повысить соревновательный результат, когда все возможные педагогические средства уже исчерпаны. В целом процесс коррекции тренировочного процесса заключается в том, что сначала с помощью генетического тестирования определяется генотип того или иного элитного спортсмена, после чего, используя данные настоящего исследования, тренер намечает структуру подготовки, адекватную генотипу атлета. Более того, в единоборствах и игровых видах спорта знание генетической предрасположенности можно использовать для составления тактической схемы поединка или действий игроков.

Результаты проведенных исследований показали, что первым фактором долгосрочного доминирования в элитном спорте на основе использования генетических методов является постоянный научный поиск полиморфизма генов, определяющих профильные качества спортсмена с целью более точного определения его специализации на этапе предварительного отбора. Кроме того, этот подход наряду с другими методами может быть использован при текущем отборе и определении перспективности действующих спортсменов различной квалификации, а также в случаях разрешения спорных ситуаций при отборе в сборные команды. Вторым фактором долгосрочного доминирования в элитном спорте на основе использования генетических методов является поиск полиморфизма генов, определяющих восприимчивость спортсмена к физическим стимулирующим воздействиям и альтернативным видам тренировки. Третьим фактором является поиск полиморфизма генов, определяющих восприимчивость спортсмена к медикаментозным стимуляторам.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА *LIF* ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С. Е. Рымарь, Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада, А. В. Базалий*,
Д. М. Иродов, В. А. Кордюм*

ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

LIF (фактор, ингибирующий лейкемию) является полифункциональным цитокином и осуществляет важные биологические функции. Он влияет на различные эндокринные ткани и типы клеток (включая гемопоэтические, нейрональные и мышечные клетки, гепатоциты, адипоциты, остеобласты и остеокласты, клетки легких), на процессы эндометриальной децидуализации и имплантации бластоцисты, на активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси, развитие гипофиза и т. д. *LIF* влияет также на пролиферацию различных типов стволовых клеток (в частности, гемопоэтических и нейрональных); кроме того, он является фактором позитивной регуляции дифференцировки стволовых клеток. В силу этих причин *LIF* широко используется в исследованиях, связанных с экспансией и дифференцировкой стволовых клеток *in vitro*.

Целью данной работы было клонирование гена *LIF* человека, его экспрессия как в клетках *E. coli*, так и в клетках млекопитающих.

Клонирование данного гена осуществляли с помощью технологии ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы мРНК, выделенной из плаценты. В ПЦР были использованы праймеры, позволяющие получить кДНК, кодирующую как зрелый белок, так и белок с сигнальным пептидом. После определения первичной последовательности продуктов ПЦР, клонированных в *pUC28*, фрагмент ДНК, кодирующий зрелый белок, был субклонирован в вектор экспрессии *pET24*. Индукция *IPTG* приводила к синтезу в клетках *E. coli* белка молекулярной массой около 20 кД. Этот белок был получен в рефолдированной форме, и его биологическая активность была проверена на культуре миелоидных лейкоэмических клеток мыши *M1*. Добавление полученного белка в среду для культивирования приводило к угнетению пролиферации этих клеток и появлению вокруг колоний характерной короны из дифференцирующихся клеток, что свидетельствовало о том, что нами получен рекомбинантный *LIF*.

Для экспрессии *LIF* в клетках млекопитающих были сконструированы две рекомбинантные плазмиды на основе вектора экспрессии для эукариотических клеток *pCVU55763*, в которых экспрессию рекомбинантного гена *LIF*, кодирующего белок с сигнальным пептидом, обеспечивает цитомегаловирусный промотор. Одна из сконструированных плазмид несет *IRE5* вируса энце-

фалита. Генетическую модификацию клеток китайского хомячка (*CHO K-1*), мыши (*LMTK(ins⁺)*) и человека (*HEK293T*) осуществляли трансфекцией с помощью полиэтиленэмина. Трансформированные клетки отбирали либо на среде с G418, если трансфекция осуществлялась плазмидой *C1-L*, либо на среде с гигромицином, если рекомбинантная плазида (*C1-IL*) содержала *IRES*. Экспрессию *LIF*, которая должна была приводить к последующей его секреции в культуральную среду, изучали методами вестерн-блота и иммунопреципитации. С целью определения экспрессии *LIF* и его секреции в среду трансформированные клетки отмывали от полноценной среды и культивировали (до 2 сут) в среде, не содержащей эмбриональной сыворотки.

Нами показано, что генетически модифицированные клетки трех линий экспрессируют гликозилированный *LIF*, который секретируют в культуральную среду. Белок проявляется в виде трех основных полос — меньше 34 кД, около 55 кД и в ряде случаев полосой между 55 кД и 72 кД.

ВПРОВАДЖЕННЯ ЕТАЛОННИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ ТА СТРЕПТОКОКІВ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

О. М. Сахнюк, Н. І. Настояща

ДП “Центр імунобіологічних препаратів МОЗ України”, Київ

У наш час досить складно зберегти правильний баланс мікрофлори людини. Безконтрольне застосування антибіотиків, стреси, неправильне харчування, харчові отруєння, кишкові інфекції, малорухливий спосіб життя і багато іншого — все це може призвести до порушення біоценозу макроорганізму.

У світі широко використовується профілактичне і терапевтичне застосування пробіотичних препаратів. Дана група імунобіологічних препаратів містить живі культури бактерій, характерні для кишково-шлункового тракту, піхви, ротової порожнини як дітей, так і дорослої людини. До них належать перш за все бактерії роду *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, деякі види стрептококів (*Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*) та лактатутворюючих бактерій роду *Enterobacteriaceae* (*E. faecium*). Лактобактерії і молочнокислий стрептокок, що вміщуються в пробіотичних препаратах, здійснюють ферментативне розщеплювання білків, жирів і складних вуглеводів, виділяють ферменти, що полегшують перетравлення білків як у дорослих, так і грудних дітей. Бактерії нормофлори ферментують різноманітні вуглеводи з утворенням в основному молочної кислоти, при цьому знижуючи рН до 4,2–4,6. Таким чином, створене кисле середовище є несприятливим для розвитку патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Препарати даної групи мають бути стабільними впродовж визначеного терміну їх придатності, показники якості мають відповідати вимогам технічної документації. Ефективність дії пробіотичних препаратів залежить від ферментативних та імунобіологічних властивостей виробничого штаму.

Досвід роботи контролюючих організацій показав, що ефективність оцінки якості комерційних препаратів залежить від наявності стандартних зразків різних рівнів: міжнародних, державних, галузевих, виробничих, які використовують для стандартизації та порівняння показників препаратів, що досліджуються. Робочі стандартні зразки штамів на виробництві або безпосередньо виробничі штами, що містяться в пробіотичних препаратах, неохоче надаються для контрольних лабораторій в якості еталонного матеріалу. Тому виникає потреба створення відповідних еталонних зразків під час випробувань бактерієвмісних препаратів у контрольних лабораторіях.

Основною метою роботи є отримання еталонних зразків штамів лактобактерій та стрептококів для контролю якості пробіотиків. Для цього проводилося їх виділення експрес-методом із бактерієвмісних препаратів із подальшою валідацією властивостей молочнокислих бактерій для отримання галузевих стандартних зразків.

У результаті проведення валідаційних робіт еталонних матеріалів і перевірки умов їх зберігання створені лабораторні еталонні зразки, у відповідності з якими проводиться гігієнічна оцінка та контроль пробіотичних препаратів, які містять лактобактерії та стрептококи: перевіряють автентичність, нешкідливість, специфічну активність та контролюють ефективність ростових властивостей поживних середовищ, які застосовуються для культивування молочнокислих бактерій.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИММУННОГО СТАТУСА ЛЮДЕЙ С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

Т. В. Серебровская, И. С. Никольский*, В. А. Ищук,
В. В. Никольская*, Л. И. Тарануха*, В. М. Кирик*, С. Н. Галицкая***

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев

*ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

**ГУ “Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины”, Киев

Определяли содержание в крови ГСК и особенности иммунного статуса людей с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии, изучали реакцию пациентов обоих контингентов на интервальные гипоксические тренировки (ИГТ). Обследовано 10 практически здоровых людей в динамике ИГТ. Устойчивость к гипоксии определяли по скорости падения насыщения крови кислородом при дыхании смесью со сниженным до 10 % содержанием кислорода при нормальном атмосферном давлении. Обследованных подразделили на две группы: 1 — с высокой стойкостью к гипоксии, 2 — с низкой стойкостью.

У людей с высокой устойчивостью к гипоксии определялся более высокий уровень гемоглобина и гематокрит, несколько выше количество эритроцитов и ретикулоцитов, что в целом свидетельствует о лучшем состоянии красной крови. У них также снижено количество лейкоцитов, лимфоцитов, $CD8^+$ -клеток и уровень IgA ; индуцированная и резервная бактерицидность нейтрофилов значительно больше. Количество $CD45^{+34^{+}}$ -клеток в крови людей обеих групп примерно одинаково, но пациенты с низкой устойчивостью к гипоксии реагируют на ИГТ существенным двукратным снижением их содержания, а также повышением активности комплемента и резервной бактерицидности нейтрофилов. Таким образом, можно предположить, что высокая устойчивость к гипоксии в первую очередь обусловлена состоянием красной крови. Людям этой группы присущ и особый иммунный статус как врожденного, так и приобретенного иммунитета, что ставит вопросы о механизмах связи кислородного обеспечения организма с функцией отдельных звеньев иммунной системы.

Возможно, устойчивость к гипоксии может быть врожденной конституционной особенностью. Но, ориентируясь на существенные изменения иммунного статуса под влиянием ИГТ, можно предположить, что значения большинства показателей иммунной системы функционально зависимы и формируются в тесной связи с вариантами ответа на кислородное обеспечение.

РЕАКЦІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ НА ГОСТРУ ГІПОКСІЮ

Т. В. Серебровська, І. С. Нікольський*, В. А. Іщук**, В. В. Нікольська*,
Л. І. Тарануха*, В. М. Кирик*, С. М. Галицька*

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

*ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

**ДУ “Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України”, Київ

Позитивний вплив гіпоксії на організм людини проявляється в покращенні функціонування дихальної та серцево-судинної систем, підвищенні стійкості до екстремальних чинників зовнішнього середовища, стимулюванні очищення дихальних шляхів від сторонніх частинок, зниженні негативних ефектів при дії іонізуючого випромінювання. Не викликає сумнівів той факт, що у складній реакції організму на гіпоксію певна роль належить імунній системі. Дослідження ефективності інтервальних гіпоксичних тренувань при різних патологічних станах показали, що позитивний клінічний ефект супроводжується значним покращенням значень імунологічних показників. Але на сьогоднішній день дані про вплив гіпоксії на показники імунної системи досить розрізнені.

Мета роботи — вивчення особливостей динаміки значень імунологічних показників на різних етапах гострої гіпоксичної проби.

Обстежувані та методи. Гострі гіпоксичні проби проведено у 5 здорових добровольців. На апаратному комплексі “Гіпокситрон” у лікувальному режимі були проведені гіпоксичні сеанси (4 цикли 5-хвилинного дихання гіпоксичної 10 % суміші, які чередувалися з аналогічним періодом дихання атмосферним повітрям). Перед початком сеансу на останніх секундах другого та четвертого циклів та через 15 та 30 хв по завершенню проби проводився забір венозної крові.

Результати. Вже на 20 хвилині гострої гіпоксичної проби змінюється формула крові. Першими реагують нейтрофільні лейкоцити і гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) $CD45^{+34}^{+}$. Кількість лейкоцитів, сегментоядерних нейтрофілів та $CD45^{+34}^{+}$ -клітин тимчасово збільшується, далі поступово зменшується і нормалізується через 30 хв після сеансу. Можна вважати, що найбільш ймовірним варіантом вказаних змін є вивільнення пристінкового кістково-мозкового резерву і виходить, що використана схема експерименту вперше дозволила виявити входження в нього певного пулу ГСК. Чи є такою реакція ГСК на всі загальні чинники або вона розвивається суто на гіпоксію, а також функціональне значення вивільнених стовбурових клітин залишається під питанням.

Під час другого етапу, вже після закінчення дії гіпоксії, через 15 хв істотно і теж короткочасно підвищується кількість ретикулоцитів, що безумовно теж відображає реалізацію якогось незначного кістково-мозкового

резерву — реакції по відношенню до гіпоксичної дії, можливо, більш специфічної, ніж попередня. Всі інші помічені зміни відставлені від вищеназваних, розвиваються наприкінці терміну спостереження через 30 хв після закінчення дії гіпоксії і спрямовані в бік нормалізації рівня базофілів, індукованої та резервної бактерицидності нейтрофілів, а також підвищення кількості $CD4^+$ -клітин. У цей час, мабуть, закінчується період збудження і значення показників повертаються на вихідний рівень, реакція закінчується.

Висновки. Отримані дані свідчать про те, що в результаті адаптації до гострої гіпоксії в периферичній крові відбуваються швидкі поетапні зміни кількості ГСК, а також значень показників систем крові та імунітету.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО РОЗРОБКИ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ОСНОВІ КСЕНОГЕННИХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ БІЛКІВ

Т. В. Симчич, О. М. Караман, Л. П. Дідківська, Г. В. Діденко,
І. М. Воєйкова, Г. П. Потебня

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ

Потреба у розробці малоінвазивних методів ранньої діагностики залишається однією з найактуальніших у сучасній онкології. Останнім часом в літературі все частіше зустрічаються дані щодо можливості створення діагностичних панелей на основі виявлення в сироватках крові онкохворих антитіл проти пухлиноасоційованих антигенів для проведення ранньої або диференційної діагностики злоякісних новоутворень та моніторингу ефективності терапії. Найчастіше такі антитіла взаємодіють із консервативними функціональними доменами білків, тому здатні розпізнавати гомологічні молекули представників інших видів тварин. За даними літератури, ембріональні клітини курки експресують білки, гомологічні до пухлинних антигенів людини та миші.

Мета роботи — дослідити в сироватках крові мишей з різними модельними пухлинами наявність та рівень антитіл, що здатні зв'язуватись із ксеногенними ембріональними протеїнами курки (ЕПК).

Матеріал та методи. Були використані 4 модельні пухлини: карцинома легені Льюїс (КЛЛ), меланома B-16 (перещеплені мишам лінії C57Bl), саркома 37 (S37), рак Ерліха (РЕ) (перещеплені мишам лінії Balb/c). Сироватки крові (СК) отримували на 7, 14, 21 та 28 доби пухлинного росту. Рівень антитіл (Ат) визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА). ЕПК із клітин ембріонів та пухлинні антигени (ПА) отримували шляхом ЕДТА-екстракції.

Результати. Кількість тварин, у СК яких виявили Ат проти “власних” ПА та проти ЕПК, була майже однаковою і не залежала від модельної пухлини (за винятком мишей із S37, в яких частота виявлення Ат проти ЕПК була дещо меншою ($P < 0,1$) порівняно із такою проти “власних” ПА). Ат проти ПА і ЕПК реєстрували на ранніх етапах пухлинного росту (7 доба). Протягом росту пухлини рівень Ат проти ПА залежно від модельної пухлини практично не відрізнявся та істотно не змінювався, за винятком РЕ. У мишей з РЕ рівень Ат проти ПА був найнижчим. Найвищий рівень Ат проти ЕПК був виявлений на 7 добу у мишей з S37, проте до 28 доби він поступово і достовірно знижувався. У мишей з РЕ, навпаки, на 7 добу пухлинного росту рівень Ат проти ЕПК був найнижчим, але достовірно зростав до 28 доби. У мишей з КЛЛ або B-16 рівні Ат проти ЕПК істотно не змінювались протягом часу спостереження. У мишей з РЕ ріст пухлинного вузла супроводжувався збільшенням рівня продукції антитіл як проти ПА ($r = 0,75$, $P < 0,05$), так і проти ЕПК ($r = 0,67$,

$P < 0,05$). У тварин з КЛЛ виявили виражену позитивну ($r = 0,42$, $P < 0,07$), а у мишей з S37 — негативну ($r = -0,48$, $P < 0,07$) кореляцію між розмірами пухлинного вузла та рівнем продукції Ат проти ЕПК. У мишей з меланомою B-16 коефіцієнт кореляції в обох випадках не був достовірним.

Висновки. Враховуючи отримані результати та дані літератури щодо експресії ембріональними клітинами курки білків, гомологічних до пухлинних антигенів людини, доцільно дослідити наявність Ат проти ЕПК у сироватці крові онкохворих. У випадку, коли частота виявлення Ат проти ЕПК виявиться достатньо високою, необхідна подальша робота у зазначеному напрямку з метою створення діагностичної тест-системи на основі ЕПК для виявлення та моніторингу перебігу пухлинного процесу.

КРАТКОСРОЧНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПУТЬ СТАНДАРТИЗАЦИИ И УНИФИКАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

А. Н. Сукач

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

В настоящее время для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний наиболее часто используют нервные клетки (НК), полученные из мозга плодов и некоторых регионов мозга взрослых. Однако такие суспензии НК являются достаточно гетерогенными как по клеточному составу, так и жизнеспособности. Поэтому проблема стандартизации и унификации этих клеток является весьма актуальной.

Материал и методы. НК выделяли из тканей мозга плодов человека 7–12 недель гестации, полученных в результате легальных абортов при соответствующей форме согласия женщин. Жизнеспособность клеток оценивали по исключению 0,4 % трипанового синего. Клетки сеяли в концентрации 1–2 млн./мл и культивировали в обогащенной среде *DMEM/F12* в присутствии или отсутствии 10 % эмбриональной сывороткой телят (ЭСТ). НК культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 /95 % воздуха. Клетки иммуноцитохимически окрашивали на β -тубулин-3.

Результаты. Свежевыделенная суспензия НК представляла собой гетерогенную популяцию клеток, жизнеспособность которых находилась в пределах от 23 до 80 %. В отсутствие ЭСТ и в присутствии *hbFGF* и *hEGF* происходило формирование нейросфер, что указывает на наличие в суспензии НК популяции стволовых/прогениторных клеток, способных пролиферировать и образовывать колонии. Культивирование НК в среде без митогенов, обогащенной ЭСТ, уже через несколько часов приводило к образованию плавающих агрегатов, размеры, структура и количество которых зависели от концентрации посеянных клеток и их исходной жизнеспособности. НК с исходной жизнеспособностью выше 70 % формировали плотно упакованные контрастные агрегаты. НК с жизнеспособностью 50–20 % в основном образовывали агрегаты с рыхлой упаковкой клеток и небольшое количество плотно упакованных. НК с жизнеспособностью ниже 15 % формировали мелкие, рыхло упакованные агрегаты. В процессе дальнейшего культивирования рыхлая структура упаковки некоторых агрегатов изменялась на плотную. При этом плотно упакованные агрегаты увеличивались в размерах и иногда сливались. Морфологически плотно упакованные агрегаты не отличались от нейросфер.

При пересеве в среду без митогенов, содержащую ЭСТ, происходило активное прикрепление как плотно упакованных контрастных агрегатов, так и агрегатов рыхлых. Уже через сутки культивирования клетки агрегатов начи-

нали дифференцироваться и мигрировать. Выраженной зависимости интенсивности прикрепления агрегатов от исходной жизнеспособности НК не наблюдалось. Однако прикрепления мелких рыхло упакованных агрегатов, как правило, не происходило, и в дальнейшем они деградировали.

Иммуноцитохимическое окрашивание прикрепленных агрегатов показало, что после 3 сут культивирования все клетки (по крайней мере наружного слоя) агрегатов и большинство мигрирующих, дифференцированных клеток характеризуются экспрессией β -тубулин III. Подсчет клеток агрегатов показал, что краткосрочное культивирование клеток с исходной жизнеспособностью 20–27 % на протяжении суток приводило к ее увеличению до 74–91 % при незначительном изменении концентрации клеток.

Выводы. Формирование агрегатов НК в процессе их краткосрочного культивирования в присутствии ЭСТ, способствуя удалению окончательно дифференцированных клеток (которые прикрепляются и не входят в состав агрегатов), устранению летально поврежденных клеток и восстановлению нелетальных повреждений клеток, позволяет решить некоторые вопросы унификации и стандартизации НК плодов человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

**Е. К. Топорова, Т. П. Гулько, Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан,
С. П. Шпилевая*, Д. М. Иродов, П. В. Моргунов*, В. А. Кордюм***

ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Сахарный диабет, который сейчас называют неинфекционной эпидемией 21 века, является одной из лидирующих причин смертности населения. Согласно существующим прогнозам, его доля в структуре наследственной патологии будет непрерывно расти. По данным экспертов ВОЗ, к 2025 г. в мире будет насчитываться более 300 млн. больных диабетом, из которых 10 % составят больные диабетом 1 типа (инсулинзависимый сахарный диабет — ИЗСД). Несмотря на то, что ИЗСД — многофакторное заболевание, сегодня не существует иного способа его лечения, чем инсулинотерапия, которая, по сути, не ведет к излечению, а имеет временный заместительный характер. Радикальное лечение можно осуществить с помощью генной терапии — введения больному гена инсулина в составе молекулярной конструкции, которая обеспечит его реализацию в неспецифических здоровых клетках.

Основной проблемой генной терапии является доставка в организм векторов, содержащих целевой ген. Невирусные методы переноса генов наиболее безопасны. Мы оптимизировали систему *in vivo* доставки сконструированного плазмидного вектора, содержащего полноразмерный ген препроинсулина человека, в клетки печени модельных животных, используя полиплексы. Конструкция вектора представляет собой бактериальную плазмиду, содержащую кассету для экспрессии целевого гена, фланкированную инвертированными терминальными повторами аденоассоциированного вируса. Анализ гено- и цитотоксичности трансфекционных препаратов ДНК подтвердил безопасность используемого метода. Модель ИЗСД, индуцированного многократными субдиабетогенными дозами стрептозотоцина, была получена у мышей линии *C57BL/6J*, крыс линии Вистар, свиней породы Ландрас и Вьетнамская карликовая. Препараты ДНК инъецировали в паренхиму печени оперативным путем грызунам и под контролем УЗИ —свиньям.

В результате однократной процедуры генной терапии наблюдается снижение гипергликемии у всех экспериментальных животных, при этом динамика нормализации гликемии зависит от дозы препаратов ДНК. На модели диабета у грызунов определено оптимальное количество ДНК, которое приводит к полной компенсации диабета. У крупных животных установлен диапазон дозировки ДНК-препарата, т. к. терапевтический эффект значительно варьирует в зависимости от исходного уровня гипергликемии. Максимальная продолжительность экспериментов на мышах составляла 300 сут, на протяжении которых получена регрессия экспериментального диабета, что подтверж-

дено гистологическими исследованиями органов, а также качественным и количественным анализом содержания гликогена в клетках печени, которые показали нормализацию процессов углеводного обмена в гепатоцитах. Показано также снижение до нормы значений показателей системы оксида азота в ткани сердца, почек и печени по сравнению с повышенным уровнем стабильных метаболитов и индуцибельной NO-синтазы у диабетных животных. Максимальная продолжительность экспериментов на свиньях породы Ландрас составляла 1 год, на карликовых свиньях — 1,5 года.

Долговременное поддержание нормогликемии после генной терапии свидетельствует о функциональной активности гена инсулина человека в клетках печени модельных животных и доказывает перспективность разработки данного метода.

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ СПОНТАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

В. В. Турчин, Ю. Хешелер*, А. Г. Попандопуло, В. К. Гринь,
Д. Спитковский*

ГУ “Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака
НАМН Украины”, Донецк

*Институт нейрофизиологии медицинского факультета Кельнского университета,
Кельн, ФРГ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) представляют огромный интерес для регенерационной медицины, являясь потенциальным источником практически всех типов клеток и тканей организма. Кардиотрансплантология является одним из приоритетных направлений применения ЭСК для лечения таких кардиопатологий, как инфаркт миокарда. Немаловажным остается вопрос хранения и транспортировки продуктов кардиодифференцировки ЭСК (с чем связана разработка эффективных протоколов криопрезервации), в частности, насколько эффективно можно замораживать кардиомиоциты (КМ), так как для сохранения их функциональности необходимо сохранить не только их жизнеспособность, но также межклеточные связи и внеклеточный матрикс.

КМ, а также другие специализированные клетки могут быть получены из ЭСК в результате формирования и созревания трехмерных структур, имитирующих развитие эмбриона, так называемых эмбрионидных тел (ЭТ). Для определения влияния замораживания ЭТ на выживаемость и функционирование КМ и их предшественников была использована линия мышинных ЭСК (мЭСК) α PIG44 (генетически модифицированная D3 линия мЭСК), характеризующаяся коэкспрессией зеленого флуоресцентного белка (*GFP*) и фактора устойчивости к пурамицину (*Puromycin^R*), находящегося под контролем промотора гена кардиоспецифического белка тяжелой цепи миозина (α MHC). Для спонтанной дифференцировки мЭСК использовали метод “подвешенной капли”, модифицированный для V-образных 96-луночных плат. ЭТ замораживали непосредственно в платах в среде, содержащей 10 % *DMSO*, 50 % *FBS* и 40 % *IMDM*, используя замораживатель *Planer Cryo 560-16* с программой -1 °C/мин с $+4$ до -70 °C, с последующим помещением и хранением образцов в парах жидкого азота при -196 °C в течение 3 сут. Для замораживания использовали ЭТ 1, 2, 3, 4-суточные (до этапа дифференцировки КМ) и 9-суточные (сокращающиеся КМ). После размораживания оценивали уровень выживаемости клеток, динамику роста ЭТ, способность выживших клеток к кардио-

дифференцировке, а также функциональные показатели КМ по сравнению с контрольной группой в течение 12 и 18 сут (в зависимости от этапа эксперимента) после начала дифференцировки.

Результаты показали, что наилучшая выживаемость при данных экспериментальных условиях была у 1- и 2-суточных ЭТ и очень ограниченной — у 3- и 4-суточных. Динамика роста и эффективность кардиодифференцировки 1- и 2-суточных ЭТ была ниже по сравнению с контролем. У 9-суточных ЭТ рост после размораживания практически отсутствовал, хотя способность к сокращению восстановилась уже на 2-е сут после разморозки. Частота сокращений экспериментальных ЭТ схожа с контрольными (не подвергшихся замораживанию), хотя и значительно варьирует.

В данном эксперименте показана принципиальная возможность замораживания трехмерных клеточных структур с сохранением их жизнеспособности и функциональности, хотя и с ограничениями по размеру/возрасту. Сокращающиеся КМ и их предшественники могут быть успешно криоконсервированы в составе такого многоклеточного комплекса, как ЭТ.

НЕКОТОРЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭМБРИОЛОГИИ И ПЕРИНАТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

Т. В. Харченко, М. А. Мурзакматов*

ГОУДПО “Санкт-Петербургская медицинская академия последиplomного образования”

*Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург

Революционное развитие новых репродуктивных технологий и методов пренатальной диагностики и медицины и перспективы трансплантации эмбриональных клеток порождают множество сложнейших вопросов морально-этического и правового характера. Прежде всего возникают такие вопросы, как правомерность использования человеческих эмбрионов для научно-исследовательских и терапевтических целей, выбор пола плода при риске носительства связанных с полом заболеваний или, по желанию родителей, обоснованность прерывания беременности при выявлении ряда наследственных заболеваний, удаление части эмбрионов при многоплодной беременности.

Научные и медицинские исследования, проводимые на человеческих эмбрионах, прежде всего имеют целью совершенствование методов экстракорпорального оплодотворения, преимплантационной диагностики и репродуктивных технологий в целом, позволяют изучать механизмы оплодотворения и развития эмбриона, генетическую регуляцию эмбрионального развития, и многие другие фундаментальные проблемы современной биологии. В основе всех морально-этических проблем, возникающих при научных, лечебных и диагностических манипуляциях с человеческими эмбрионами, лежит их статус, в частности определение момента, с которого эмбрион следует рассматривать как личность, имеющую право на жизнь и ее защиту в законодательном порядке. Применимы ли к раннему эмбриону биологические критерии или к нему следует относиться с понятиями морали и этики, подходящими к человеческой личности? В самом деле, любые исследования на эмбрионах являются деструктивными и могут рассматриваться как прямое убийство в случае идентификации человеческого эмбриона с личностью. Этическая приемлемость данных исследований тесно связана с проблемой судьбы “лишних” эмбрионов, неизбежно появляющихся в процессе искусственного оплодотворения. Эмбрионы, не использованные для данной супружеской пары, в настоящее время обязательно уничтожаются, это закономерно приводит к вопросу, что является более гуманным: подвергать их разрушению или проводить научные исследования. Говоря о допустимости исследований на эмбрионах, нельзя забывать о таком важном аспекте как коммерциализация, которая будет неизбежно возникать по мере совершенствования технологий и расширения их клинического применения.

Особое место занимает использование донорских гамет, вызывая не только морально-этические, но и ряд юридических вопросов, касающихся прежде

всего родительских прав и обязанностей. Другим аспектом этических проблем, связанных с правами эмбриона, является вопрос о прерывании беременности в случае дородовой диагностики ряда наследственных заболеваний. Наличие тяжелой врожденной патологии, приводящей к ранней инвалидности или ранней смерти ребенка, является абсолютным или почти абсолютным показанием к прерыванию беременности, однако в случаях, когда врожденное или наследственное заболевание является курабельным, вопрос представляется уже не столь ясным.

Развитие современных медицинских технологий сделало возможным вмешательство ученых в самый интимный (казавшийся ранее неприкосновенным) процесс возникновения и развития человеческой жизни. Это неизбежно повлекло за собой проблемы морально-этического характера. Прекратить исследовательскую деятельность, связанную с использованием эмбрионов человека, закрыть пути прогресса в биологии и медицине, связанные с этим фундаментальным открытием, представляется уже абсолютно невозможным. Столь же невозможным является и отказ от пренатальной диагностики наследственных заболеваний. Тем более важной кажется необходимость скорейшего разрешения постоянно возникающих проблем этического характера и выработка единой концепции допустимости исследований в этих, несомненно, имеющих самые широкие перспективы, областях современной медицинской науки.

ІМУНОКОН'ЮГАТИ НА ОСНОВІ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ ТА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ

М. В. Цапенко, О. Б. Горбатюк, Ю. С. Ніколаєв, М. В. Павлова

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

Моноклональні антитіла, кон'юговані з ферментами, є цінними імунологічними реагентами, які широко використовуються в медичній та лабораторній практиці. Кон'югацію антитіл з ферментами традиційно здійснюють шляхом їх хімічного об'єднання. Проте це є тривалим та високотратним процесом, тому такі імунокон'югати мають дуже високу вартість. Сучасні генно-інженерні технології дозволяють створювати генно-інженерні аналоги моноклональних антитіл і проводити їх химеризацію з іншими білками-партнерами на рівні послідовностей ДНК. У подальшому такі химерні білки можуть бути синтезовані в бактеріях із використанням стандартних схем ферментації та недорогих поживних середовищ. Зважаючи на це, привабливою альтернативою існуючому способу одержання імуореагентів є створення генно-інженерних кон'югатів шляхом химеризації рекомбінантних фрагментів антитіл із ферментами. Одним із найбільш перспективних ферментів для химеризації є бактеріальна лужна фосфатаза (*BAP*, *bacterial alkaline phosphatase*), яка має високу стабільність та природну здатність до димеризації. Останнє підвищує авідність імунокон'югатів, створених на її основі.

Метою роботи було створення генно-інженерних імунокон'югатів на основі одержаних нами раніше одностланцюгових антитіл (*scFv*, *single-chain fragment variable*), специфічних до декількох обраних антигенів, та *BAP* з підвищеною ферментативною активністю (*BAP_{mut}*, або *BAP mutated*).

У роботі використано наступні методи: конструювання рекомбінантних ДНК, спрямований мутагенез ДНК, ПЛР, електрофорез ДНК та білків, секвенування ДНК, *ELISA*, імуоблотинг.

Для одержання *BAP_{mut}* її нуклеотидну послідовність було ампліфіковано із хромосомної ДНК *E. coli* та проведено спрямований мутагенез із замінами *D153G*, *D330N*. Проведено інтерактивний дизайн та створено рекомбінантні плазмідні вектори, які використано для продукування *scFv-BAP_{mut}* у бактеріях *E. coli*. Встановлено, що накопичення химерного білка відбувається у периплазмі клітин *E. coli* та культуральній рідині. Показано функціональну активність обох компонентів *scFv-BAP_{mut}*.

ЗАСТОСУВАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ВІКОВИХ ЗМІН ШКІРИ ОБЛИЧЧЯ

В. О. Цепколенко, О. Л. Холодкова, Н. В. Нескоромна, О. В. Єрофєєва

Одеський державний медичний університет МОЗ України

Останнім часом косметологи багатьох країн світу з успіхом почали застосовувати аутологічний продукт — збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП), відому як *platelet-rich plasma (PRP)*, для корекції вікових змін шкіри. У нашій країні технологія плазмоліфтингу за допомогою ЗТП ще не набула широкого розповсюдження. Припускають, що ЗТП підсилює вихід з депо, проліферацію та диференціацію клітин, залучених у процес регенерації тканин.

Мета дослідження — вивчення ефективності використання ЗТП для проведення естетичних маніпуляцій з корекції вікових змін шкіри обличчя.

Обстежувані та методи. Обстежено 23 пацієнтки, середній вік яких становив 35,4 років, з ознаками мімічних та статичних зморшок різних ступенів вираженості та різноманітними змінами текстури шкіри. Після обробки шкіри антисептичним розчином із передпліччя пацієнта знеплідненим шприцом проводився забір венозної крові об'ємом 15–20 мл. Приготування ЗТП здійснювали за допомогою апарату *Harvest Smart (Harvest Inc.)*, після чого кількість тромбоцитів у плазмі зростала у 2–5 разів у порівнянні з їх концентрацією у вихідному зразку крові. Ін'єкції плазмогелю проводили за принципом контурної пластики для розгладжування мімічних та статичних зморшок, а також активації авторезервних механізмів відновлення пружності шкіри. Кількість та частоту процедур призначали індивідуально, згідно зі ступенем вираженості дегенеративних змін шкіри, а також вже досягнутим у процесі терапії результатом. У середньому кожний пацієнт отримав 3–5 процедур. Результати оцінювали за допомогою ультразвукового дослідження шкіри у динаміці.

Результати. Аналіз отриманих даних показав значне покращення кольору обличчя (здоровий рожевий відтінок шкіри), підвищення загального тонушу шкіри та зменшення поверхневих мімічних зморшок вже через 2 тижні після першої ін'єкції. Також спостерігалось реконструювання контурів обличчя, усі пацієнти підкреслювали значну підтягнутість та наявне покращення тургору шкіри. Через 4 тижні після першої процедури мімічні та поверхневі статичні зморшки зменшились, а також істотно покращилась текстура шкіри (вона стала більш гладкою та рівною). Через 1,5–2 міс, вже навіть після 1 процедури, зменшилась глибина носо-губних складок та складок “маріонеток” (за віком пацієнта), відбулась фізіологічна ревіталізація та природне омолодження. ЗТП покращує та підсилює відновлювальні процеси у шкірі вірогідно за рахунок “запуску” різних чинників росту та цитокінів, які

секретуються з α -гранул тромбоцитів. Основні цитокіни, виявлені у тромбоцитах, відіграють важливу роль у процесах клітинної проліферації, хемотаксису, диференціації та автогенезу.

Висновки. Отримані дані дають підставу вважати, що використання методу плазмоліфтинга для корекції вікових змін шкіри обличчя є доцільним, ефективним та безпечним, а також суб'єктивно високо оцінюється пацієнтами. Внаслідок біодоступності плазмоліфтинг ЗТП може застосовуватись для широкого кола пацієнтів. Доцільно продовжити подальші пошуки щодо широкого використання даної процедури у клінічній практиці дерматокосметологів.

ИЗУЧЕНИЕ *IN VITRO* ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ПИЛОЦИТАРНОЙ АСТРОЦИТОМЫ И МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ И ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ

А. Н. Чернов, М. В. Талабаев*, Д. Г. Григорьев**, В. Н. Калюнов,
В. А. Кульчицкий

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

*Городская больница скорой медицинской помощи, Минск

**Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Проблема индивидуальных особенностей и общих закономерностей онкопатологии развития клеток в разные периоды онтогенеза как в норме, так и при патологии (онкогенез) остается одной из самых актуальных в фундаментальном и прикладном аспектах.

Цель работы — установить *in vitro* эффективность действия ряда широко применяемых химиотерапевтических препаратов и фактора роста нервов (ФРН) в отношении клеток медуллобластомы и пилоцитарной астроцитомы, полученных после удаления опухолей в процессе нейрохирургической операции от 7 детей в возрасте 1–15 лет.

Результаты, полученные на клетках пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы, суммированы в таблице. Для каждой серии $n = 3$.

Влияние химиопрепаратов и ФРН на процент гибели клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы

Серия	Доза препарата, мкг/чашка	Гибель клеток, %	
		пилоцитарная астроцитома	медуллобластома
Контроль	нет	11,1 ± 2,33	26,6 ± 1,25
Цисплатин	1	71,3 ± 15,32*	35,7 ± 8,06
Этопозид	1	44,6 ± 7,06*	26,8 ± 8,63
Карбоплатин	4	60,3 ± 10,56*	24,1 ± 6,11
Циклофосфан	8	43,2 ± 4,10*	54,0 ± 16,21
Цитарабин	1	41,1 ± 9,34*	21,4 ± 7,55
Метатрексат	50	47,4 ± 7,44*	37,3 ± 2,40
Гемцитабин	2	35,2 ± 9,12	31,1 ± 3,40
β-фактор роста нервов	100 нг/мл	53,8 ± 5,52*	43,9 ± 1,00

Примечание: * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из таблицы, все испытываемые реагенты продемонстрировали эффективность в плане подавления выживаемости культивируемых клеток пилоцитарной астроцитомы, причем особенно выраженной она оказалась у цисплатина. В то же время, ни один из них не достиг статистически значимо-

го токсического влияния на клетки медуллоластомы, но наибольшую тенденцию к этому продемонстрировал циклофосфан.

Таким образом, при выборе максимально действенных химиотерапевтических средств для тех или иных видов неоплазий целесообразно предварительное их испытание на клеточных культурах, причем индивидуально для каждого пациента.

ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Е. Р. Черных, Е. Я. Шевела, Л. В. Сахно, М. А. Тихонова, Н. М.
Старостина, А. А. Останин

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Любые повреждения в центральной нервной системе (ЦНС) сопровождаются накоплением в патологическом очаге иммунокомпетентных клеток (ИКК). Долгое время считалось, что клетки иммунной системы обладают исключительно повреждающим действием на нервную ткань. Однако недавние исследования позволили сформировать новые представления, согласно которым иммунный ответ может благоприятствовать и быть необходимым для запуска репаративных процессов в ЦНС. Позитивные эффекты макрофагов и клеток микроглии могут быть обусловлены фагоцитозом, удалением клеточного детрита и ингибиторных молекул, ограничением глутаматиндуцированной токсичности и продукцией факторов с нейропротективной и регенераторной активностью. Стимулирующее влияние *T*-клеток может быть связано с их способностью к продукции нейротрофических факторов (фактора роста нервов, нейротрофического фактора головного мозга и нейротрофинов 3 и 4/5), с регулирующим влиянием на клетки микроглии и рекрутированием/активацией нейрональных предшественников. В отличие от большинства тканей человеческого организма, включая периферическую нервную систему, ЦНС обладает ограниченной способностью к регенерации, что объясняется ингибирующим эффектом протеогликанов и миелина. Недостаточность иммунного ответа в силу иммунологически привилегированного статуса ЦНС и, как следствие, дефицит ростовых и нейротрофических факторов может являться другой возможной причиной низкой регенеративной способности ЦНС. Соответственно, модулируя иммунные реакции или трансплантируя ИКК, можно в определенной степени управлять репаративными процессами в нервной ткани.

Исследования последних лет показали, что направленность эффектов иммунной системы на ЦНС во многом определяется силой, продолжительностью, временем развертывания и самое главное типом иммунного ответа. Наиболее выраженные нейропротективные и регенераторные свойства ИКК ассоциированы с противовоспалительными макрофагами и *Th2*-клетками. Причем, если учесть что противовоспалительные макрофаги активируют преимущественно *Th2*-ответ, эти клетки представляются весьма перспективными в плане стимуляции нейрорегенеративных процессов. У человека культивирование моноцитов с *GM-CSF* приводит к генерации провоспалительных *M1*-макрофагов, тогда как культивирование с *M-CSF* индуцирует генерацию

противовоспалительных M2-клеток. Кроме того, противовоспалительная активность макрофагов может индуцироваться после фагоцитоза апоптотических клеток.

В поисках оптимальных подходов к генерации M2-макрофагов с регенераторной активностью мы предположили, что дефицит ростовых факторов может приводить к развитию депривационного апоптоза, а поглощение апоптотических клеток — индуцировать переключение на противовоспалительную активность макрофагов. Действительно, проведенные исследования показали, что генерация макрофагов в условиях дефицита ростовых факторов позволяет получить популяцию клеток, которые по своим свойствам схожи с M2-противовоспалительными макрофагами (экспрессируют низкий уровень костимуляторных молекул, обладают низкой антигенпрезентирующей функцией, продуцируют существенно более низкий уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов, но более высокий уровень *IL-10* по сравнению с M1-макрофагами) и при этом характеризуются высокой продукцией ростовых факторов с нейропротективными и регенеративными свойствами (*IGF-I*, *bFGF*, *EGF*, *EPO*, *VEGF*). Данный тип макрофагов может быть перспективным в комплексном лечении пациентов с повреждениями и заболеваниями ЦНС.

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ФОЛАТНОГО ОБМІНУ ТА ГЕМОСТАЗУ ПРИ МУЛЬТИФАКТОРНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ЛЮДИНИ

Л. Б. Чорна¹, Г. Р. Акоюн^{1,2}, Г. В. Макух^{1,2}, О. І. Могиляк³,
Е. Й. Пацкун⁴, О. Я. Заверуха², І. М. Федорик¹, Д. В. Заставна¹

¹ДУ “Інститут спадкової патології НАМН України”, Львів

²Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького МОЗ України

³Західно-Український спеціалізований дитячий медичний центр, Львів

⁴Закарпатський медико-генетичний кабінет, Ужгород

Для розвитку клінічного фенотипу мультифакторних захворювань людини необхідна несприятлива взаємодія генетичних та середовищних чинників, а за умови відсутності одного із згаданих елементів розвиток захворювання не відбуватиметься. Вчасно визначивши наявність генетичного компонента мультифакторного захворювання та уникнувши дії несприятливих зовнішніх чинників (професійні шкідливості, фармакологічні препарати, екологічні фактори), можна ефективно уникнути розвитку хвороби або запобігти її тяжкому перебігу.

Матеріал та методи. Для дослідження обрано генетичні маркери спадкових тромбофілій мутації G1691A-гена фактора V (*Leiden*) та G20210A-гена фактора II (протромбін) згортання крові, які визначають неспецифічну схильність до тромбофілії у пацієнтів з будь-якою патологією та поліморфні варіанти генів *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, які через регуляцію обміну фолієвої кислоти забезпечують процеси метилювання ДНК і підтримку балансу метіонін — гомоцистеїн в організмі. Виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові проводили методом висолювання. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції. Мутації та поліморфні варіанти генів досліджували за допомогою рестрикційного аналізу та електрофорезу в агарозному гелі. Проведено молекулярно-генетичний аналіз розподілу алелів поліморфних локусів 677CT та 1298AC гена *MTHFR*, 2756 AG гена *MTR* та 66AG гена *MTRR* у пацієнтів зі щілинами верхньої губи і/або піднебіння (ЩВГП) ($n = 31$), матерів дітей із ЩВГП ($n = 27$), матерів дітей з вадами невральної трубки ($n = 75$), жінок із навиковим невиношуванням вагітності ($n = 65$), пацієнтів з атипичним перебігом пневмонії ($n = 15$), здорових осіб із західноукраїнської популяції ($n = 107$).

Результати. При дослідженні розподілу генотипів поліморфного локусу С677Т гена *MTHFR* встановлено вищу частоту виявлення генотипу ТТ у всіх групах у порівнянні з контрольною, проте статистично вірогідних відмінностей не виявлено. Гомозиготи за алелем *MTHFR* 677Т мають більший ніж у 3

рази ризик виникнення ЩВГП, ніж гомозиготи за алелем *MTHFR* 677C ($OR = 3,3$), а для матерів з генотипом *MTHFR* 677TT ризик народити уражену дитину зростає майже у 2 рази. Частота виявлення генотипу 66GG гена *MTRR* була вірогідно нижчою серед пацієнтів із ВЩГП та їх матерів, ніж серед осіб контрольної групи. Гетерозиготний генотип 66AG гена *MTRR* збільшує ризик виникнення ЩВГП у плодів більше ніж у 5 разів ($OR = 5,56$), а у матерів таких дітей — у 2,6 рази ($OR = 2,6$). Частота гетерозиготного носійства мутації G1691A гена фактора V згортання крові у групі жінок із навиковим невиношуванням в анамнезі становила 14,28 % (у контрольної — 4,6 %). Виявлено два випадки гетерозиготного носійства мутації G20210A гена фактора II згортання крові у жінок із навиковим невиношуванням в анамнезі (3,0 %), у контрольній групі дану мутацію не виявлено.

В усіх досліджуваних групах частота виявлення 66G алеля гена *MTRR* була більшою, ніж *MTRR* 66A алеля (*wild type*), а його роль у схильності до розвитку мультифакторної патології має бути встановлена в подальших дослідженнях.

ФОРМУВАННЯ СЕРЕД ВАГІТНИХ ГРУПИ РИЗИКУ НАРОДЖЕННЯ ДИТИНИ ІЗ ВРОДЖЕНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

В. М. Шапошнікова

ДУ “Науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

Вроджені аномалії є досить поширеним та актуальним питанням як у медицині зокрема, так і в суспільстві в цілому. За даними ВООЗ, в усьому світі біля 7 % всіх випадків неонатальної смерті були викликані вродженими вадами розвитку (ВВР), а в Європейському регіоні — до 25 %. ВВР є головною причиною дитячої захворюваності та тривалої інвалідності (доповідь секретаріату ВООЗ, 2009). В Україні проблема ВВР постала особливо актуально після Чорнобильської катастрофи у зв'язку з радіаційним забрудненням довкілля. Щорічно у 4–5 % новонароджених діагностують вроджені аномалії. Більшість вроджених вад є спорадичними, тому специфічних профілактичних заходів не існує.

Найбільш дієвим засобом у профілактиці вродженої патології є комплексна пренатальна діагностика, одним із основних методів якої є ультразвукове обстеження вагітних, однак вроджена патологія не завжди виявляється при цьому обстеженні. Відомо, що аналіз хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові є базовим методом оцінки мутаційних ефектів у популяції (рекомендації ВООЗ). У процесі роботи в медико-генетичних консультаціях використовуються цитогенетичні дослідження, які здійснюються за світовими стандартами та нормами.

Мета дослідження — оцінка значимості різних чинників ризику народження дитини зі вродженою вадою розвитку. Обстеженню підлягали вагітні, що проживають на території Черкаської області з різними рівнями забруднення регіону, які народили дітей з ВВР, та жінки, вагітність яких закінчилась народженням дитини без ВВР. Для виявлення ступеня ушкодження хромосомного апарату було розраховано сумарні цитогенетичні порушення за типами та в цілому.

Виявлено, що обмінні хроматидні аберації виникають переважно під впливом зовнішньої дії мутагенів, у той час як делеції значною мірою можуть бути наслідком відновлення одниткових розривів ДНК, котрі з'являються при функціонуванні геному. Комплекс негативних чинників аварії на ЧАЕС призводить до пригнічення репаративних систем геному. Виявлено також, що вік до 18 та понад 35 років, попередні викидні в анамнезі жінки, ускладнення перебігу вагітності в I триместрі, забрудненість навколишнього середовища є значущими чинниками ризику народження дитини з ВВР. У формуванні групи високого ризику виникнення ВВР велике значення має також зміна рівня альфафетопротейну, хоріонічного гонадотропіну, естріолу, гемодинамічні порушення. Раціональне формування груп ризику дозволить підвищити рівень виявлення ВВР та знизити рівень дитячої смертності, захворюваності та інвалідності.

ОРГАНІЗАЦІЯ БЕЗПЕРЕРВНОГО ПРОФЕСІЙНОГО НАВЧАННЯ ФАХІВЦІВ ІЗ ЛАБОРАТОРНОЇ ГЕНЕТИКИ

Л. П. Шейко, С. В. Подольська, Л. І. Брішевац, О. Г. Євсєєнкова,
Н. Г. Горovenко

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика
МОЗ України, Київ

Першочергове завдання системи післядипломної освіти — безперервний професійний розвиток фахівця, який передбачає підтримання та підвищення професійної компетентності, що гарантує надання медичної допомоги населенню відповідно до стрімкого розвитку науки та новітніх медичних технологій. Підготовка фахівця з лабораторної генетики в сучасних умовах достеменно відрізняється від того часу, коли в Україні з’явився сам фах “лабораторна генетика” (1989 р.). Бурхливий розвиток молекулярної біології, генетики, цитогенетики, генної інженерії породжує нові знання, а саме: розроблено нову методологію досліджень, спрямовану на розуміння молекулярної природи багатьох генетичних порушень з різноманітними клінічними проявами. Завдяки молекулярно-цитогенетичним методам дослідження активно продовжують діагностуватись хромосомні синдроми та хвороби геномного імпринтингу. Виявлена генетична мультифакторна детермінованість і гетерогенність багатьох поширених захворювань: серцево-судинних, аутоімунних, ендокринних, метаболічних, нервових, психічних, онкологічних. З’являються нові перспективи діагностики та лікування хвороб, які раніше вважалися сублетальними. Це група метаболічних захворювань: мукополісахаридоз I типу, хвороби Гоше, Помпе, Фабрі. Отже, впровадження новітніх методологій у практику сучасного лаборанта-генетика підвищує якість обстеження пацієнтів зі спадковою, вродженою та мультифакторною патологією, але виконання досліджень на високому технічному рівні потребує постійного навчання, підвищення майстерності обізнаності в останніх досягненнях теоретичної і практичної науки.

На кафедрі медичної та лабораторної генетики НМАПО ім. П. Л. Шупика вже більш ніж 20 років проходять всі етапи підготовки фахівця зі спеціальності “лабораторна генетика” на післядипломному етапі навчання. За цей час підготовлено більш ніж 200 лікарів-лаборантів-генетиків та спеціалістів з вищою немедичною освітою, які успішно працюють в медичних закладах України та за її межами.

В Україні впроваджена ступенева система післядипломної освіти, яка передбачає первинну спеціалізацію, набуття фаху та безперервне вдосконалення професійної підготовки з проходженням передатестаційних циклів із подальшою атестацією на відповідну кваліфікаційну категорію. Можливе продовження навчання в магістратурі, клінічній ординатурі, аспірантурі та обов’язкове постійне підвищення кваліфікації на циклах тематичного удо-

сконалення. Щодо інтернатури, то на кафедрах біології та генетики університетів, звідки, як правило, приходять на навчання майбутні лаборанти-генетики, інтернатура взагалі відсутня, а за Наказом МОЗ України № 82 від 23.05.2005 р., на жаль, також скасовано інтернатуру з медичної генетики. Процес навчання на всіх рівнях орієнтований на кінцеву мету — підготовку кваліфікованого, конкурентоздатного лікаря-лаборанта-генетика або спеціаліста з вищою немедичною освітою, враховуючи постійно зростаючі вимоги до якості фахової підготовки. Вхідження України до міжнародного медичного простору потребує зближення міжнародних стандартів освіти, які дозволяють істотно спростити завдання підготовки фахівців на міжнародному етапі.

Таким чином, вдосконалення безперервного професійного розвитку лікарів-лаборантів-генетиків та підвищення якості підготовки фахівців сприятиме покращенню надання медичної допомоги родинам зі вродженою, спадковою та мультифакторною патологією, поліпшенню демографічної ситуації та зміцненню здоров'я населення України.

ВИВЧЕННЯ РОЗПОВСЮДЖЕНОСТІ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ОБМІНУ ХОЛЕСТЕРИНУ В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ

О. А. Шликова, О. В. Ізмайлова, І. П. Кайдашев

НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики
при ВДНЗ “Українська медична стоматологічна академія”, Полтава

В останні роки дослідження в галузі молекулярної біології показали, що генетичним чинникам належить провідна роль у розвитку багатьох хвороб, у тому числі атеросклерозу. Тому все більше досліджень зосереджено на пошуку структурних варіантів генів, що беруть участь в метаболізмі, дефекти яких лежать в основі розвитку атеросклеротичного процесу та метаболічного синдрому. Одними з них є гени, що відіграють центральну роль в ліпідному метаболізмі. Проведені генетичні дослідження деяких поліморфізмів свідчать про їх значні міжпопуляційні та міжетнічні відмінності, що відображає своєрідність умов проживання, харчування та образу життя населення у різних регіонах світу. Тому актуальним є вивчення розповсюдження однонуклеотидних поліморфізмів у різних популяційних та етнічних групах.

Мета дослідження — вивчення розповсюженості поліморфізмів генів 7-дегідрохолестеролредуктази (*DHCR7*), ліпопротеїніліпази (*LPL*) та рецептора ліпопротеїнів низької густини (ЛПНГ) в українській популяції ($n = 190$).

Матеріал та методи. Ампліфікацію поліморфної ділянки кожного гена проводили методом полімеразної ланцюгової реакції на ампліфікаторі “Терцик” (Росія). Використовували специфічні олігонуклеотидні праймери для визначення поліморфізмів *DHCR7* (*IVS8-1 G → C exon 8*), *LPL* (*C → T intron 6*) та ЛПНГ (*C → T intron 15*). ПЛР-продукти кожного з генів, які містилися в собі однонуклеотидні заміни, що вивчалися, піддавали рестрикційному аналізу зі специфічними ензимами рестрикції для *DHCR7* з *AlwN1*, для *LPL* та ЛПНГ з *PvuII*. Розщеплений ПЛР-продукт аналізували в 1,5 % агарозному гелі, забарвленому етідіумом бромідом, з наступною візуалізацією в ультрафіолетовому світлі.

Результати. Показано відсутність мутантного алеля гена *DHCR7* в дослідженій групі, який пов’язаний з розвитком *Smith-Lemli-Opitz*-синдрому, — аутосомно-рецесивного захворювання, що характеризується наявністю багатьох вад розвитку, синдромом затримки психічного розвитку та зустрічається від 1/10000 до 1/60000 (*Correa-Cerro L. S. et al.*, 2006). Встановлено розподіл частот виявлення генотипів гена *LPL* (*C → T intron 6*): *CC* — 30,0 %, *TC* — 53,2 %, *TT* — 16,8 %. Розподіл же генотипів *CC*, *CT*, *TT* гена *LDLR* (*C → T intron 15*) становив 57,9 %, 38,4 %, 3,7 %, відповідно. Відзначено значно низький рівень зустрічаємості алеля *T* гена *LDLR* (22,9 %) на відміну від алеля *C*, що зустрічався в 77,1 % випадків.

Висновки. Проведені дослідження показали необхідність подальшого вивчення розповсюженості даних поліморфізмів у пацієнтів із дисліпідеміями та виявлення їх гаплотипних варіантів для встановлення асоціативного зв’язку з порушеннями ліпідного обміну.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С. П. Шпилевая, В. И. Андриенко, Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада,
Е. Г. Дерябина

ГУ “Інститут генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) привлекают пристальное внимание и получают широкое использование благодаря своей способности дифференцироваться в различного рода типы клеток — фибробласты, хондроциты, остеобласты, миобласты и адипоциты. Это их свойство позволяет рассматривать МСК в качестве потенциального материала для целей регенеративной медицины.

МСК получали из Вартонового геля стенки пуповины. Микроскопические исследования препаратов проведены на конфокальном микроскопе AXIOSKOP-2 ZEISS с лазерной программой LSM 5 PASCAL (Zeiss, Jena, Германия) и на люминесцентном микроскопе ЛМ-2 (ЛОМО, Россия). Для окрашивания ядерной ДНК использовали реагенты-интеркаляторы: этидиум бромид (возбуждение — 488 нм, эмиссия — 560 нм), DAPI (возбуждение — 350 нм, эмиссия — 470 нм), Hoechst 33342 (возбуждение — 350 нм, эмиссия — 470 нм). Для подкраски белков цитоплазмы использовали Thiazin red и Fluorescein. Цейтраферную микрофотосъемку проводили на поляризационно-интерференционном микроскопе Biolar (Польша) с частотой съемки 1 кадр в 5 с с последующей трансформацией отснятых кадров в видеофильм. Для микрофотосъемки МСК использовали специально сконструированные камеры объемом 2 и 4 мл среды и объективы $\times 10$ и $\times 20$. Съемку проводили в течение 3–4 ч.

МСК при их исследовании на разных пассажах методом цейтраферной микрофотосъемки выявляли большую подвижность и практически постоянно находились в состоянии движения, перемещаясь по стеклу камеры наблюдения. Во время перемещений они заметно изменяли свою форму и объем — от очень сильно вытянутых, с воланоподобными тонкими цитоплазматическими выступами вдоль длинной оси клетки, которые все время находились в волнообразном движении, до треугольных, округлых или имели неправильную форму. Поэтому нам кажется, что нет обоснованной причины выделять какие-то константные фенотипы МСК, поскольку похоже, что любая наблюдаемая нами на фиксированном материале форма клеток может оказаться отражением определенного момента ее функционирования — перемещения или взаимодействия с соседними клетками. Скорее всего, форму МСК в каждый отдельный отрезок времени следует рассматривать как вероятностно-динамическое состояние клетки в данных условиях. В своем активном движении МСК перемещались не только по свободному пространству камеры, но могли активно контактировать поверхностями с соседними

МСК или обмениваться с ними небольшими фрагментами цитоплазматического содержимого, переползать по их поверхности на соседние участки стекла.

На первом и втором пассажах МСК на фиксированных препаратах наиболее часто имели сильно удлинённую, фибробластоподобную, игольчатую форму. Их цитоплазма тонким слоем располагается по поверхности стекла и выпуклое округлое ядро при наблюдении клетки в профиль (при построении 3D-конфигурации) сильно выступает наружу. На более поздних пассажах клетки с характерной узкой, вытянутой формой наблюдаются в меньшем количестве, и основной их массив представлен клетками с большим количеством цитоплазмы и меньшим ядерно-цитоплазматическим отношением. *Karahuseyinoglu et al. (2007)* описывают два типа МСК, различающихся фенотипически. Редко встречались МСК, в которых кариокинез не сопровождался цитокинезом, и в огромных (по сравнению с окружающими) клетках с сильно вакуолизированной по периферии цитоплазмой находилось несколько крупных интерфазных ядер. Проведение специфичной для липидов окраски МСК *Nile red* не выявляло в их цитоплазме на первых трех пассажах накопления веществ липидной природы.

КУЛЬТИВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОГО КАНАТИКА ЛЮДИНИ ПРИ ЗНИЖЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ КИСНЮ

Н. С. Шувалова, О. Г. Дерябіна*, С. М. Жукова**, М. П. Сорока*

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

* ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

** Пологовий будинок № 5, Київ

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) на даний момент вважають дієвим інструментом клітинної терапії. В останнє десятиріччя стало ясно, що для досягнення успіхів у культивуванні МСК слід мінімізувати пошкоджуючий вплив чинників зовнішнього середовища. У цьому ключі класичний підхід, при якому МСК культують традиційно (за атмосферних концентраціях кисню), видається необґрунтованим. Фізіологічні концентрації кисню, притаманні природним місцям локалізації МСК, набагато нижчі, і знижені концентрації кисню можуть бути фактором, що підтримує їх у недиференційованому стані. Наприклад, вміст кисню у стромі кісткового мозку, який є одним з основних джерел МСК дорослого організму, дорівнює 1–2 %. Подібні умови існування *in vivo* притаманні також МСК жирової тканини.

За даними літератури, застосування знижених концентрацій кисню для культивування МСК є однією зі стратегій збереження їх мультипотентності. Крім того, МСК, культивовані за низького вмісту O_2 (за даними літератури, 2–5 %) разом зі збереженням потенціалу диференціації мали вищі рівні проліферації та кращий колонієформуючий потенціал. Є дані про вплив знижених концентрацій кисню на паракринну активність МСК та активацію антиапоптотичних каскадів за умов помірної гіпоксії. Вирощування МСК у середовищі низького вмісту O_2 таким чином покращує виживання клітин, введених в місце ураження, при яких часто спостерігається ішемія. Умови помірної гіпоксії також сприяють захисту клітин від пошкоджень, пов’язаних з оксидативним стресом.

У відділі генних технологій ІГРМ НАМН України проводяться дослідження з розробки технології культивування МСК пуповинного канатика при знижених концентраціях кисню. Співробітниками відділу було сконструйовано обладнання, що дозволяє створювати газові суміші з різним відсотком кисню для культивування МСК. Були проведені дослідження з культивування клітин в атмосфері з 2 % кисню протягом 3 пасажів. Було показано, що такі умови підвищують інтенсивність проліферації МСК, що відповідає даним літератури. Клітини в умовах 2 % O_2 у порівнянні з такими, що культивувались за атмосферної концентрації кисню, мали відмінності у морфології: були дрібнішого розміру та частіше зберігали веретеноподібну форму. Характер формування моношару для культур з різним відсотковим вмістом кисню відрізнявся: при 2 % O_2 клітини розміщувались менш щільно, не прилягаючи одна до одної.

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ АМНІОТИЧНОЇ ОБОЛОНКИ ЯК МЕТОД СТИМУЛЯЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ЗВИРАЗКУВАНЬ РОГІВКИ ПІСЛЯ ТЯЖКИХ ОПІКІВ ОЧЕЙ

С. А. Якименко, О. І. Бузник

ДУ “Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України”, Одеса

В останні роки внаслідок властивостей амніотичної оболонки (АО) стимулювати регенерацію, інгібувати колагеноліз та через дефіцит донорської рогівки для відновлення очної поверхні після опіків ока застосовується трансплантація амніотичної оболонки (ТАО). Натомість, роботи по застосуванню ТАО в лікуванні опіків очей тяжких та дуже тяжких ступенів поодинокі; результати, що наводяться, неоднозначні, а її ефективність мало вивчена.

Мета роботи — проаналізувати результати ТАО в лікуванні звиразкувань рогівки, що утворюються після тяжких опіків очей.

Обстежувані та методи. Проведений ретроспективний аналіз 55 ТАО за розробленими нами методиками у 53 пацієнтів (53 ока) із звиразкуваннями рогівки та лімбальною недостатністю 180–360° окружності лімбу, що утворилися після опіків очей ІІІБ–ІVAB ступенів (за класифікацією С. А. Якименка, 2001). Статистичні дані подано як $M \pm SD$. Середні терміни операції становили $(46,1 \pm 46,4)$ діб після опіку (від 8 до 181 доби). Передопераційна гострота зору не перевищувала 0,01 у 33 з 53 пацієнтів (62,3 %). Показанням до ТАО вважалася наявність звиразкування рогівки, яке не поглиблювалося та площа якого не зменшувалася від медикаментозного лікування протягом 7–14 діб. Протипоказанням до ТАО були глибокі прогресуючі звиразкування рогівки. Середній термін спостережень у післяопераційному періоді становив $(8,8 \pm 10,1)$ міс (від 1,5 до 46 міс).

Результати. Подальше звиразкування рогівки було призупинено в 54 із 55 випадків (98,1 %), епітелізація рогівки після ТАО досягнута у 42 із 55 випадків (76,3 %). Середні терміни епітелізації становили $(24,2 \pm 26,7)$ діб (від 6 до 123 діб). Рецидив дефекту рогівки трапився у 3 із 42 успішних випадків (7,1 %). Гострота зору вище 0,01 (від 0,01 до 1,0) отримана у 23 із 42 пацієнтів (54,8 %), у яких відбулася епітелізація рогівки після ТАО. Гострота зору у віддалені терміни спостережень підвищилася порівняно з передопераційною у 15 з 42 пацієнтів з епітелізацією рогівки (35,7 %), не змінилася — у 18 з 42 успішних пацієнтів (42,9 %), погіршилася — у 9 з 42 пацієнтів (26,2 %).

Висновки. ТАО сприяє зупинці звиразкування та стимулює епітелізацію рогівки у пацієнтів з тяжкими опіками очей у випадку вчасного застосування операції та адекватній фіксації АО.

ИНТЕРЛЕЙКИН-18 И ИНТЕРЛЕЙКИН-18-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ТЕСТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO* (ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ)

Е. В. Якушенко, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников, В. А. Козлов

НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

В настоящее время одним из перспективных направлений в области иммунофармакологии является цитокиноterapia. ИЛ-18 — это плеiotропный, конститутивно экспрессирующийся цитокин, продуцирующийся многими типами клеток, главным образом активированными моноцитами и дендритными клетками. Основные эффекты ИЛ-18 направлены на стимуляцию продукции таких цитокинов, как ИФН γ , ФНО α , ИЛ-1 β , а также молекул адгезии и факторов, стимулирующих апоптоз. Таким образом, ИЛ-18, с одной стороны, участвует в противоинфекционной и противоопухолевой защите организма, а с другой, в некоторых случаях является патогенетическим фактором формирования хронического воспаления и метастатической болезни. Интерлейкин-18-связывающий белок (ИЛ-18СБ) является циркулирующим антагонистом ИЛ-18 и блокирует его путем формирования высокоаффинного комплекса, тем самым нейтрализуя эффекторные функции ИЛ-18.

Целью данной работы было исследование биологической активности и противоопухолевых свойств рекомбинантных человеческих белков ИЛ-18 и ИЛ-18СБ.

В результате проведенных исследований было показано, что рИЛ-18 стимулирует выработку ФНО α и ИФН γ мононуклеарными клетками периферической крови человека; при этом ИЛ-18СБ отменяет данный эффект, снижая продукцию до спонтанного уровня. Для исследования противоопухолевой активности рИЛ-18 использовали мышиную модель подкожного введения клеток меланомы B16. Показано, что рИЛ-18, введенный внутривенно в дозе 1 мкг/мышь на 3, 6, 8-е сут после инъекции опухолевых клеток (200 тыс./мышь), тормозит рост солидной опухоли. Также отмечалось достоверное увеличение продолжительности жизни животных, обработанных рИЛ-18. Однако в гематогенной модели меланомы B16 (внутривенное введение клеток B16) введение рИЛ-18 приводит к значительному увеличению количества метастазов в легких экспериментальных животных. При этом введение рИЛ-18СБ (п/к или в/в) приводит к статистически значимому снижению количества и размера метастазов. Кроме того, ИЛ-18СБ (5 мг/кг, в/б) полностью отменяет ЛПС-индуцированную летальность (10 мг/кг, LD 70) мышей, что свидетельствует о его противовоспалительной активности.

Таким образом, использование ИЛ-18 с целью стимуляции клеточного иммунного ответа для терапии иммунопатологических состояний, сопряженных с недостаточной функцией T χ 1 и соответственно сниженной продукцией провоспалительных цитокинов, является эффективным, однако, в случае лечения опухолевых заболеваний в связи с риском индукции метастазирования следует разрабатывать критерии индивидуального подхода к этой терапии. ИЛ-18СБ может использоваться в практике антицитокиновой терапии с целью подавления патологического воспаления и метастазирования злокачественных клеток.

STEM CELL THERAPY FOR EVERYONE: VISION OR ILLUSION?

A. Bader

University of Leipzig, 04103 Leipzig, FRG

Tissue regeneration in bone and cartilage defects has become a clinical reality. Apart from these areas other tissues including skin, liver and cardiac are on the verge to become a mainstream clinical therapy option as well. The unifying bionic concept of our group presented for these therapies integrates fundamental mechanisms of tissue repair and trauma. Stem cells are the basis for regeneration and bioreactors are the instruments that make the respective biological technologies available for clinical therapy. The presentation discusses integration strategies from basic biology, to materials for remodelling to production processes. The teaching goal is to deepen the understanding of the role of the cellular microenvironments, co culture requirements, cell-cell and cell – matrix interactions. In addition the role of biomechanics and biokinetics is discussed for the field. The integration of these technologies focuses on the development of bioreactors that introduce such possibilities within a dynamic environment.

The presentation bridges from stem cell based bone, cartilage, skin, nervous, liver generation basic biology results, to preclinical animal trials to early clinical examples.

Apart from such basic science considerations the clinical application possibilities are becoming more evident in many fields. Going from “Tissue Engineering” to “Tissue Regeneration” is the driving concept behind these developments. This includes the integration and *in vivo* remodelling of the implants or direct *in vivo* regeneration technologies.

The long-term goal of this new field is to create a systematized knowledge of individualized therapy from non-biological organ replacement, through hybridized systems, to fully biological implants and finally to human regenerative systems *in vivo*. All of these aspects are discussed with concrete examples.

The concept of tissue specific bioreactors following bionic principles has been pursued by our group. Models in field of bone, cartilage, liver, skin, stem cells and neuronal tissue will be presented.

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS

S. Copray

University Medical Centre Groningen, The Netherlands

Pluripotent stem cells are basic cells with an indefinite self-renewal capacity and the potential to generate all the cell types of the three germinal layers. So far, the major source for pluripotent stem cells is the inner cell mass of the blastocysts: embryonic stem (ES) cells. Potential clinical application of ES cells is faced with many practical and ethical concerns. So, a major breakthrough was achieved in 2006, when it was shown that pluripotent stem cells could be obtained by transducing mouse embryonic and adult fibroblasts with a limited set of defined transcription factors. These reprogrammed cells, named induced pluripotent stem (iPS) cells, resembled ES cells in many of their characteristics. Since this initial study, iPS cell research has taken an incredible flight, and to date iPS cells have been generated from cells from several species using different sets of reprogramming factors. Given the potential to generate patient-specific cell populations without the need for human embryonic cells, iPS cell technology has been received with great excitement by research and medical communities. However, many questions regarding the actual molecular process of induced reprogramming remain unanswered and need to be addressed before iPS cells can go to the clinic.

In this review, I will start by summarizing recent advances in iPS cell research and inventory the hurdles that still need to be taken before safe clinical application. Moreover, I will report on present research regarding the use of iPS cells as sources for cell replacement therapy for MS.

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF BONE MARROW CELLS IN MICE AFTER TRANSPLANTATION OF MONONUCLEAR CELLS FRACTION OR *Lin*(-)*Sca-1*(+)*c-kit*(+) HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM BONE MARROW AND FETAL LIVER

V. Kyryk, A. Rodnichenko, O. Kuchuk

State Institution “Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine”, Kyiv

Source of hematopoietic stem cells (HSC) for transplantation might be bone marrow, peripheral blood, fetal liver and others. The total fraction of mononuclear cells of these tissues contains many groups of stem and progenitor cells that may have different transplantation potential. In particular, HSC, that do not express markers of linearity group *Lin* (-), express stem cell antigen *Sca-1* (+) and stem cell growth factor receptor *c-kit* (+) named as LSK-cells.

Objectives. To compare proliferative activity of bone marrow cells in recipients of unsorted or sorted stem cells from bone marrow and fetal liver.

Material and methods. Our experiments were performed on FVB mice. Recipients of cells were FVB (wt) mice aged 3 months. Donors of bone marrow cells were FVB-Cg-Tg (GFPU) 5Nagy/J mice (transgenic for green fluorescent protein) aged 3 months, kindly provided by the European Molecular Biological Laboratory (Monterotondo, Italy). Donors of fetal liver mononuclear cells or HSC were GFP+ mice embryos 13,5 dpc.

The fraction of mononuclear cells from bone marrow and fetal liver was isolated on the gradient of Ficoll-Paque 1,077 (Sigma). Phenotyping and sorting of LSK cells from bone marrow and fetal liver by flow cytometry was made on the cell sorter BD FACSAria (Becton Dickinson). Cells for transplantation ($1 \cdot 10^7$ total mononuclear bone marrow cells, or $0,8 \cdot 10^7$ mononuclear fetal liver cells, which corresponds to transplantation $2 \cdot 10^4$ sorted LSK cells) were injected into the mice tail vein.

Results. In young recipients of unsorted bone marrow mononuclear cells in 4 weeks after transplantation relative number of bone marrow granulocyte-macrophage progenitors increased by 36% and in recipients of fetal liver mononuclear cells – by 40,1 %, compared with the control group ($P < 0,05$). Comparing the ratio CFU-F/CFU-GM, it was found a tendency to redistribution of subpopulations progenitor cells toward more pronounced increasing of the CFU-GM, with less dynamic growth of CFU-F (in recipients of fetal liver cells), or their decrease — in recipients of bone marrow cells.

In 9-day CFU-GM cultures in recipients of unsorted bone marrow cells, the number of GFP-positive granulocyte-macrophage colony was $2,7 \pm 0,5$ per 10^6 of bone marrow cells and in recipients of fetal liver cells — $1,5 \pm 0,3$ per 10^6 cells amounted to 7,1 % and 4,9 % of total colonies, respectively.

In recipients that received sorted LSK cells the quantity of GFP-positive colo-

nies CFU-GM was higher comparing to quantity of the same colonies in previous group: after transplantation of sorted bone marrow cells was 12,3 % of total colonies and from fetal liver — 9,6 % ($P < 0.05$). It was marked predominance of medium and large-sized colonies in cell cultures in recipients of bone marrow cells whereas in recipients of fetal liver cells — small and medium-sized colonies.

In mice that received sorted LSK cells the GFP-positive colonies of fibroblasts were not found, confirming that LSK cells function as the true properties of hematopoietic cells without stromal stem cell potential. This also confirms high sorting purity of population for transplantation.

Conclusion. It was performed the activation of proliferative processes and changes of the ratio of basic classes of progenitor cells in bone marrow of HSC recipients in early periods after transplantation. This might be determined by the source of graft and of its purity.

POLYMORPHISM OF METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE AND THIOL STATUS IN HUMAN PLACENTA AFTER PREGNANCY WITH PREECLAMPSIA

O. P. Martseniuk, C. Mislanová*, M. Yu. Obolenskaia

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine, Kyiv

*Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an important folate metabolizing enzyme that catalyzes the irreversible conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate, which is the methyl donor for remethylation of homocysteine (Hcy) to methionine (Met). C677T polymorphism is associated with hyperhomocysteinemia. Elevated level of Hcy increases the risk of placenta-mediated diseases, such as preeclampsia, spontaneous abortion. In our study we estimated the interrelation of folate content, aminothiols concentration and contribution of *MTHFR* genotype in human placenta after pregnancies with preeclampsia.

Methods. PCR, SNP analysis, HPLC.

Results. The study was conducted on placental samples after uncomplicated (n=40) and complicated with preeclampsia pregnancies (n=28). C677T and T677T genotypes of *MTHFR* are represented more frequently in the placenta samples from the pregnancies complicated with preeclampsia. The further results of folate and aminothiols content were analyzed after categorization of all the samples according to *MTHFR* genotype and uncomplicated or complicated with preeclampsia pregnancies. The lower content of folate and Met and the highest content of Hcy were detected in the samples from preeclampsia pregnancies with C677T *MTHFR* genotype. We have conducted correlation analysis between investigated levels of total folate and aminothiols. We have revealed the tight correlation between investigated parameters in the samples from preeclamptic pregnancies with C/T *MTHFR* genotype. There were tight ($r_s > 0.5$) positive correlations between the levels of Hcy and cysteine (Cys), Hcy and Met, folate and glutathione (GSH) and tight ($r_s > 0.5$) negative correlations between folate and Hcy, folate and Cys, Hcy and GSH, Cys and GSH, Met and GSH.

Discussion. It was shown that C677T and T677T genotypes of *MTHFR* are represented more frequently in the placenta samples from pregnancies with preeclampsia. Folate deficiency in combination with mutated *MTHFR* genotype leads to the more pronounced changes in the folate-related metabolism of aminothiols. The combination of heterozygous *MTHFR* genotype in the samples from preeclamptic pregnancies with folate deficiency is characterized by substantial modulation of aminothiols level.

IN SILICO SEARCH OF POTENTIAL FUNCTIONAL SITES WITHIN THE *MUS MUSCULUS* O⁶-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTERS

I. O. Samoilenko, A. P. Yatsyshyna*, O. V. Pidpala*, L. L. Lukash*

National Pedagogical Dragomanov University, Kyiv

*Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine, Kyiv

O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT, is the DNA repair protein that plays an important role in protecting cells against alkylation of DNA, but this enzyme can provide resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents. Modulation of expression and activity of MGMT in tumors and normal tissues is currently being investigated as possible strategies for improving cancer therapy. At present little is known about organization and expression of the mouse *Mgmt* gene. It has been shown that the promoter region of this gene is GC-rich, contains Sp1, Ap1, E2F-like and yeast URS elements, but it lacks typical TATA and CCAAT boxes (Iwakuma et al., 1996). A suitable model for the study of the mechanism of the regulation of housekeeping genes, which are TATA-less and GC-rich, is the mouse *Mgmt* gene. The aim of our work was to search potential regulatory sequences within the promoters of the mouse *Mgmt* gene from the TRED database.

Sequences of the mouse *Mgmt* gene promoters were taken from the database TRED (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED>). Identification of functional sites was performed by using program TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

There are 3 promoters of mouse *Mgmt* gene in TRED database: ID 77428 — known, 77429 — refseq, predicted, 77430 — refseq. The protein coding transcript is expressed from known promoter, while a functional importance of rest promoters is still unclear. In sequences of given promoters we found homology with functional sites for 15, 9 and 19 transcription factors (TF) respectively. Common for all promoters were such TFs: Nkx-2.5, Gata-1, SRY, and USF, which are possibly important for the ensuring of the basal level of gene expression. In the known promoter 77428, except characterized by others AP-1 and E2F TFs, we also detected binding sites (BS) for such TFs: CRE-BP, CREB, C/EBP, SRF, Oct-1, Tst-1, NF-E2, Lyf-1, c-Myc. Such exclusivity of revealed sites for given promoter can be an evidence of tissue specificity of the *Mgmt* expression regulation. Found BSs for Tst-1, involved in early embryogenesis, epidermal differentiation and neural morphogenesis, and c-Myc, implicated in regulating cell growth, apoptosis, differentiation and stem cell self-renewal, are inquisitive. The refseq, predicted promoter 77429 contains functional sites for such TFs: Lyf-1, HSF2, c-Ets-1, C/EBP β , Ik-2, except common TFs for all studied promoters. Only within this promoter we detected a BS for HSF2, which activates the transcription of genes that help cells to survive in a con-

dition of heat shock. In the refseq promoter sequence we revealed unique BSs for TFs: CRE-BP, CREB, C/EBP, AP-1, c-Ets-1, Ik-2, Oct-1, YY1, Sox-5, TATA, STATx, c-Rel, Ik-1, NF- κ B, N-Myc, overwhelming majority of which is implicated in the cell cycle regulation and oncogenesis.

Thereby, by using *in silico* analysis of three promoters of the mouse *Mgmt* gene we revealed within each promoter individual functional sites, that can be associated with the tissuespecific regulation of the *Mgmt* expression, except sites for common TFs which could play a key role in regulation of this gene.

GENETIC ALTERATIONS IN CULTURED POPULATIONS OF MOUSE EMBRYONIC GERM CELLS

A. P. Yatsyshyna, V. O. Kushniruk*, O. A. Grypych,
O. V. Pidpala, L. L. Lukash**

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine, Kyiv

*National Taras Shevchenko University, Kyiv

**National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”, Kyiv

Embryonic germ cells (EGCs) are an alternative source of pluripotent stem cells. Pluripotent stem cells have been extensively studied and gained wide popularity due to their therapeutic potential. EGCs and their progenies are highly valuable not only for regenerative medicine, but also as tools to study development and pathologies or for *in vitro* drug metabolism studies. Widespread provision of EGCs for these applications will require cell lines sustainable over long periods in culture. Ensuring their genomic integrity is one important prerequisite for both research and therapeutic applications.

In the past years, several laboratories have reported about the genomic instability of cultured pluripotent stem cells, in particular embryonic stem cells. Intense studies on the stability of different human and murine embryonic stem cells demonstrated that, irrespective of their origin, long-term *in vitro* cultures lead to the accumulation of chromosomal and gene mutations as well as epigenetic changes which have been associated with oncogenic transformation of cells. However, little is known about genomic stability of EGCs *in vitro*.

We have obtained original cell lines (G1, G4, G6, G7) derived from embryonic germ cells isolated from gonadal ridges of 12,5-dpc BALB/c mouse embryos. The main aim of the study presented was the analysis of aberrant mitoses in populations of mouse EGCs *in vitro*.

In this study, we used cell culture methods, the micronucleus test modified for cell lines, the statistical analysis, and found that murine EGCs displayed the chromosomal instability in long-term culture. A successful adaptation of G1, G4 and G6 lines towards a decreased dependence on extracellular matrix for *in vitro* survival was paralleled with chromosomal changes in cells. The cell population of G7 line cultured on feeder cell layer had the lowest frequency of micronucleate cells, in contrast to G1, G4 and G6 lines that were grown directly onto a plastic or glass surface and had the increased frequencies of aberrant mitoses.

Our results show that all mEGC lines examined possessed a certain degree of genetic instability, despite differences in culture conditions.

Авторський покажчик

- Акопян Г. Р., 11, 22, 183
Аксенова Е. А., 13, 14
Алиева Т. Д., 41
Андриєнко В. И., 46, 52, 189
Ахметов И. И., 16
- Базалий А. В., 159
Балашенко Н. А., 75
Бараш А. А., 18, 24
Бєбешко В. Г., 19
Бєлоглазова К. В., 21
Бєркало Л. В., 74
Бєлевич О. Б., 22
Бєлошицька А. В., 148
Бєлько Д. І., 24, 26
Бєлько Н. М., 24, 26
Блох К., 143
Боброва Н. А., 27
Богашова Л. Я., 27
Бойченко Ю. В., 48
Болтіна І. В., 29
Борбуляк І. З., 26
Брїшевац Л. І., 186
Бузник О. І., 192
Бутенко Г. М., 100
Буше В. В., 152, 153
- Вавіліна І. В., 11
Вайсерман А. М., 31, 86
Варди П., 143
Василевич І. Б., 108
Василівська С. В., 26
Васильєв Р. Г., 32, 98
Васильєва І. Ю., 34
Величко С. П., 155
Веропотвєлян Н. П., 36
Веснина Л. Э., 74
Викторова Т. В., 112
Вишнякова І. В., 117
Воейкова І. М., 166
Волкова Н. А., 141, 145
Вотякова І. Л., 81
Вязова Л. В., 14
- Галицька С. Н., 126, 136, 163, 164
Гилєп А. А., 157
Гилєп І. Л., 70
Глотов О. С., 34
Голоєнко І. М., 104
Горбась І. М., 74
Горбатюк О. Б., 37, 125, 176
Горностаї К. П., 38, 98
Горєвєнко Н. Г., 40, 55, 79, 105, 131, 133, 186
Грєчанина Ю. Б., 41
Григорьєв Д. Г., 179
Гридіна Н. Я., 29
- Гринь В. К., 43, 63, 172
Грищенко О. М., 131
Гуляєк Н. Л., 11
Гульєко Т. П., 45, 46, 48, 83, 170
- Давьденко О. Г., 50
Даниленко Н. Г., 13, 14, 104
Даниленко П. Г., 50
Дєнісова Е. М., 43
Дєрябина Е. Г., 46, 52, 107, 119, 189, 191
Джоган М. Ю., 29
Дідєнко Г. В., 166
Дідківська Л. П., 166
Дмитренко Е. А., 19, 123
Дмитренко І. В., 19, 53
Довженко С. П., 55
Долженко М. М., 40
Досєнко В. Е., 68
Дроздовская С. Б., 65, 68
Дромашко С. Е., 75
Дударєва Н. И., 14
Дятіль І. С., 53, 123
- Євсєєнкова О. Г., 186
Єрофєєва О. В., 177
- Жукова С. М., 52, 119, 191
- Забаровская З. В., 14
Забаровская О., 14
Заверуха О. Я., 183
Задорожна В. І., 57
Запорожан В. М., 59
Заставна Д. В., 183
Зубов Д. О., 60, 126, 136
- Іванов Р. В., 141
Іванова Н. Н., 62
Іванюк Д. И., 63
Ільїн В. Н., 65, 68
Ільютик А. В., 70
Іродов Д. М., 129, 159, 170
Ищук В. А., 163, 164
Іванова Т. П., 131
Ізмаїлова О. В., 72, 188
- Кайдашев І. П., 27, 72, 74, 188
Калюнов В. Н., 179
Караман О. М., 166
Квитко О. В., 75
Кєнс О. В., 22
Кир'яченко С. П., 79, 133
Кирик В. М., 32, 77, 96, 98, 100, 163, 164
Климова Е. М., 81
Ковальчук М. В., 83
Кодунов Л. А., 36
Козлов В. А., 84, 193

- Коляда О. К., 86
 Конева И. И., 75
 Константинова Г. О., 129
 Кордюм В. А., 48, 52, 87, 107, 119, 129, 159, 170
 Коробейников Г. В., 89
 Короткий О. Г., 135
 Костицкая О. М., 117
 Кочетова О. В., 112
 Кравченко Т. В., 43
 Кульчицкий В. А., 179
 Куценко К. Ю., 86
 Куценко Л. А., 74
 Куценко Н. Л., 27
 Кучер Е. В., 19
 Кучук О. В., 32, 38, 77, 90, 94, 96, 98, 100
 Лабунець І. Ф., 38, 90, 92, 94, 96, 98, 100
 Лагун М., 14
 Лебединский А. С., 102, 137
 Левая-Смоляк А. М., 50
 Левданский О. Д., 104
 Левкович Н. М., 40, 105
 Лисица Н. А., 126, 136
 Лисяный Н. И., 106
 Лихачева Л. И., 45, 46, 107
 Літошенко З. Л., 98
 Лобанок Е. С., 108
 Лозинский В. И., 141
 Лопатникова Ю. А., 193
 Лукаш Л. Л., 11, 110, 114
 Лукманова Л. И., 112
 Лыло В. В., 114
 Ляшенко Т. Д., 115
 Мазур С. П., 143
 Макух Г. В., 183
 Макух Г. В., 22
 Малышкина С. В., 117
 Маслова О. А., 46, 52, 119
 Меркулова Е. П., 50
 Микитенко Д. О., 121
 Минченко Ж. Н., 19, 53, 123
 Михайловская А., 14
 Михеев А. А., 157
 Мовчан О. С., 60
 Могиляк О. І., 183
 Мойсеева Г. В., 57
 Мокрик И. Ю., 154
 Моргунов П. В., 170
 Мрих Н. М., 148
 Муравський А. В., 127
 Мурзакматов М. А., 174
 Настояща Н. І., 161
 Наумович Н. И., 13
 Недобой А. М., 131
 Нескоромна Н. В., 177
 Никольская В. В., 163
 Никольский И. С., 163
 Никольченко О. А., 117
 Ніколаєв Ю. С., 125, 176
 Нікольська В. В., 126, 135, 136, 164
 Нікольський І. С., 126, 135, 136, 164
 Новикова С. М., 127
 Оберемко А. В., 152, 153
 Обьедков В. Г., 104
 Оксимец В. М., 152, 153
 Окунев О. В., 129
 Олейник О. А., 50
 Ольхович Н. В., 131, 133
 Останин А. А., 84, 181
 Остапченко Л. І., 135, 136
 Оченашко О. А., 102
 Оченашко О. В., 137
 Павлова М. В., 139, 176
 Паляница С. С., 150
 Пацкун Е. Й., 183
 Петренко А. Ю., 102, 137, 141, 143, 145
 Петренко Ю. А., 141, 143, 145
 Петрова М. В., 154
 Петровский Я. Л., 84
 Пилипенко С. В., 135
 Пишель І. М., 127
 Півнева Т. А., 100
 Підпала О. В., 11
 Піскун І. І., 146
 Піскун Р. П., 148
 Пічкур Н. О., 131, 133
 Побережний П. А., 98
 Подольська С. В., 40, 55, 133, 186
 Под'яченко О. В., 98
 Поляченко Ю. В., 150
 Попандопуло А. Г., 43, 63, 152, 153, 154, 172
 Потебня Г. П., 166
 Похолоенко Я. О., 129, 155
 Правдюк А. И., 141
 Рачкова Л. Т., 155
 Ревенко Е. Б., 145
 Резнік О. Ю., 98
 Родніченко А. Є., 77, 94, 96, 98
 Романенко О. П., 34
 Россоха З. І., 40, 79, 105, 133
 Рубан Т. А., 46, 52, 107, 155, 159, 170, 189
 Рубан Т. П., 11
 Рубченя И. Н., 70
 Рыбина И. Л., 157
 Рымарь С. Е., 46, 159
 Салахова А. М., 154
 Салютін Р. В., 150
 Сапун А. С., 75
 Сарич Т., 63
 Сахно Л. В., 181
 Сахнюк О. М., 161
 Семенова Я.-М. О., 126, 136

- Сенников С. В., 193
 Сергиенко Н. В., 43
 Серебровская Т. В., 163, 164
 Сильванович А., 14
 Симчич Т. В., 166
 Синявская М. Г., 50, 104
 Скибо Г. Г., 100
 Скоробогатова Н. Г., 141
 Скоробогатова Н. Н., 145
 Скрипников П. Н., 27
 Смирнова И. П., 74
 Снарская М. В., 41
 Солнцева А. В., 13, 14
 Солохина И. Л., 74
 Сорока М. П., 191
 Спитковский Д., 172
 Старостина Н. М., 181
 Стратийчук Т. Р., 98
 Сукало А. В., 13
 Сукач А. Н., 102, 115, 168
 Сукач А. С., 137
 Сухорада Е. М., 46, 52, 107, 155, 159, 170, 189
- Талабаев М. В., 179
 Тарануха Л. И., 126, 136, 163, 164
 Тимченко О. І., 121
 Тихонова М. А., 181
 Толерова О. Ю., 126
 Топорова Е. К., 48, 170
 Тронь Р. А., 89
 Турчин В. В., 172
- Федоренко В. Г., 53
 Федорик І. М., 183
 Федорчук О. Г., 126
 Фролов А. Ф., 57
- Харченко Т. В., 174
 Хешелер Ю., 63, 172
 Хилбок І. Ю., 86
 Хиль В. Ю., 29
 Холодкова О. Л., 59, 177
 Хоменко В. І., 123
- Цапенко М. В., 37, 176
 Цепколенко В. О., 177
 Цупиков О. М., 98, 100
- Чернов А. Н., 179
 Черных Е. Р., 84, 181
 Чорна Л. Б., 183
- Шакина Л. А., 81
 Шапошник Л. А., 114
 Шапошнікова В. М., 185
 Шевела Е. Я., 84, 181
 Шевченко М. В., 115
 Шейко Л. П., 186
 Шейко Я. И., 75
 Шликова О. А., 72, 74, 188
 Шляхтиченко Т. Ю., 123
 Шпилевая С. П., 48, 52, 155, 170, 189
 Шувалова Н. С., 52, 191
 Эстрин С. И., 43
- Якименко С. А., 192
 Якушенко Е. В., 193
 Ярынич-Бучинская Н. П., 27
 Яцишина А. П., 11
- Bader A., 194
 Copray S., 195
- Grynych O. A., 201
- Kuchuk O., 196
 Kushniruk V. O., 201
 Kyryk V., 196
- Lukash L. L., 199, 201
- Martseniuk O. P., 198
 Mislanová C., 198
- Obolenskaia M. Yu., 198
- Pidpala O. V., 199, 201
- Rodnichenko A., 196
- Samoilenko I. O., 199
- Yatsyshyna A. P., 199, 201