

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МОРФОЛОГИИ И ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ

Университетская научная конференция

**«Генные и клеточные технологии
в регенерации органов и тканей»**

(Казань, 23 ноября 2017 года)

СБОРНИК ТРУДОВ

КАЗАНЬ 2017 г.

Сборник трудов университетской научной конференции «Генные и клеточные технологии в регенерации органов и тканей»

Составитель:
К.м.н. доцент М.С. Калигин

Под общей редакцией профессора кафедры морфологии и общей патологии
ИФМиБ К(П)ФУ д.м.н. А.А. Гумеровой

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2015

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

HIF – Hypoxia-Inducible Factor

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

ВЭК – высота ЭК

д.м.н. – доктор медицинских наук

ИП – индекс пролиферации

КИ – клинические исследования

к.м.н. – кандидат медицинских наук

КСПЗ – количество сосудов в поле зрения

МВ – мышечные волокна

ОКФ – октакальциевый фосфат

РМЖ – рак молочной железы

ТСС – толщина сосудистой стенки

ЦЯМВ – центрально-ядерные МВ

ШЭК – ширина ЭК

ЭК – эндотелиальные клетки

СТРОЕНИЕ СТЕНКИ СОСУДОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Никонова Т.Д., Сураев Д.Э., Виноградов И.И.

Рязанский государственный медицинский университет

имени академика И.П. Павлова

Научный руководитель – Деев Р.В.

В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным в мире онкологическим заболеванием среди женщин. Заболеваемость РМЖ в Российской Федерации составляет 382,1 чел. на 100 тыс. населения, при этом абсолютная летальность достигает 22 445 чел. На территории Рязанской области ежегодно выявляются около 500 случаев заболевания. Многочисленными исследованиями показано, что прогрессия злокачественной опухоли выходит на новый уровень после реализации процесса опухолевого ангиогенеза. Кроме того, увеличение объёма первичного опухолевого узла также зависит от процесса опухолевого ангиогенеза, который существенно повышает возможность лимфогенного и гематогенного метастазирования. Несмотря на важность сосудистого компонента опухоли, тонкое строение кровеносных сосудов при этом все ещё остается недостаточно изученным.

Целью данного исследования является определение особенностей строения сосудистой стенки в РМЖ.

Материал и методы. Образцы РМЖ фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, окрашивали гематоксилином и эозином. Изготавливали гистологические препараты для светооптической микроскопии. Проводили иммуногистохимическое исследование с использованием антител к Ki-67 (кроличьи моноклональные, клон SP6). Выполняли морфометрию с последующей статистической обработкой полученных данных. Учёт параметров вели отдельно для двух групп, первая группа – РМЖ с метастазами, вторая – РМЖ без метастазов.

Результаты: при анализе гистологических препаратов группы РМЖ с метастазами выявляются эндотелиальные клетки (ЭК), располагающиеся на базальной мембране. ЭК имеют уплощенную форму, находятся разноудаленно от соседних ЭК, образуя свободные «окна» на базальной мембране, также выявляется миграция ЭК и расслоение сосудистой стенки, наблюдается инвазия опухолевых клеток в стенку сосудов.

При изучении препаратов группы РМЖ без метастазов отмечены изменения, аналогичные выявленным в первой группе. При оценке результатов иммуногистохимического исследования установлено, что индекс пролиферации ЭК (ИПЭК) в группе РМЖ с метастазами значительно превышает ИПЭК в группе РМЖ без метастазов. При морфометрическом анализе гистологических препаратов и результатов иммуногистохимического исследования оценивали следующие параметры: ширина и высота ЭК (ШЭК, ВЭК), толщина сосудистой стенки (ТСС), количество сосудов в поле зрения (КСПЗ) и индекс пролиферации ЭК. КСПЗ первой группы составило $2,09 \pm 0,17$, второй – $2,56 \pm 0,30$; ШЭК первой и второй групп была равна $9,78 \pm 0,30$ мкм и $10,16 \pm 0,25$ мкм соответственно; ВЭК в первом случае равна $3,50 \pm 0,13$ мкм, во втором – $3,40 \pm 0,10$; ТСС группы с метастазами – $8,86 \pm 1,74$ мкм, ТСС группы без метастазов – $6,03 \pm 0,60$ мкм; ИПЭК составляет $36,60 \pm 3,92$ и $24,63 \pm 4,12$ для первой и второй групп соответственно. Статистически достоверно изменяется показатель ИПЭК ($p < 0,05$).

Выводы. Таким образом, в структуре сосудистой стенки при РМЖ наблюдаются следующие изменения, которые могут являться факторами диссеминации РМЖ: расслоение сосудистой стенки; инвазия опухолевых клеток в стенку сосудов; увеличение пролиферации ЭК.

Указанные изменения предположительно являются результатом повышенной активности фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) и его рецепторов (VEGFR-1, VEGFR-2), а также фактора, индуцируемого гипоксией (Hypoxia-Inducible Factor, HIF), в процессе активного опухолевого роста.

Исследование выполнено при поддержке внутривузовского гранта РязГМУ.

Список литературы:

1. И.В. Майбородин, С.Э. Красильников и др. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза, как прогностического фактора развития рака // Новости хирургии. – 2015. – 23(3). – С. 339 – 347.
2. Нефедова Н.А., Давыдова С.Ю. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 51.
3. Filip Roudnicky, Cedric Poyet at al. Endocan Is Upregulated on Tumor Vessels in Invasive Bladder Cancer Where It Mediates VEGF-A-Induced Angiogenesis // Cancer Research. – 2013. – V. 73, № 3. – P. 1097-1106.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ FUSION-ФЕНОМЕНА В КУЛЬТУРЕ МИОГЕННЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Емелин А. М., Буев Д.О.

Рязанский государственный медицинский университет

имени академика И.П. Павлова

Научный руководитель – Деев Р.В.

Одним из подходов к лечению наследственных мышечных дистрофий является генно-клеточная терапия, целью которой является доставка нормального генетического материала в пораженные мышечные волокна посредством клеток-векторов. К сожалению, имеющиеся кандидаты на роль подобных векторов показывают низкий уровень слияния с мышечными волокнами [1]. Мы предположили, что использование индукторов слияния клеток позволит улучшить эффективность подобного рода терапии. В качестве модели исследования была выбрана культура миобластов, поскольку слияние миобластов с мышечными волокнами происходит в организме в физиологических условиях в больших масштабах [2].

Целью нашей исследовательской группы является: выделение и поддержание культуры миобластов *in vitro*, индукция их слияния и миогенной дифференцировки с помощью различных агентов и их сравнение между собой посредством морфометрического алгоритма.

В качестве среды для культивирования используется смесь из 80 мл DMEM F-12+20 мл FBS+5 мл PenStrep. Данная смесь показала свою пригодность в качестве среды для культивирования миобластов.

Для индукции миогенной дифференцировки клеток слизистой оболочки десны доказана возможность использования смеси, содержащей пониженное количество FBS и лошадиную сыворотку [3]. Однако использование смеси из DMEM F-12 (97 %)+лошадиная сыворотка (2%)+PenStrep(1%) не привело к каким-либо изменениям в культуре

миобластов, многоядерные структуры и мышечные трубочки в культуре не наблюдались. Точно неизвестно, с чем это связано: с репликативным старением клеток или с тем, что стимулы, которые вызывают дифференцировку клеток слизистой оболочки десны, отличаются от таковых для миобластов.

В настоящее время отрабатывается протокол выделения первичной культуры миобластов из четырёхглавой мышцы бедра крысы, производится культивирование мышечных миобластов для отработки алгоритма морфометрической оценки. В дальнейшем для сравнительной оценки планируется использовать индекс слияния, который выражается формулой $I = ((A-B)/(C-1)) * 100 \%$, где А – количество ядер в многоядерных структурах, В – количество многоядерных структур, С – количество ядер в поле зрения. Числитель показывает количество случившихся событий слияния, знаменатель – количество потенциально возможных событий слияний. С помощью этого алгоритма планируется оценить эффективность использования полиэтиленгликоля и ионов кальция [4] как индукторов слияния.

Работа поддержана внутривузовским грантом, осуществляется на базе лаборатории клеточного культивирования РязГМУ им. Павлова

Список литературы:

1. Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я. и др. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса // Гены и клетки. – 2014. – 9(4): С. 6-33.
2. Данилов Р.К. Руководство по гистологии: том 1 // Данилов Р.К. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2011. – 831с.
3. Zorin V.L., Pulin A.A., Eremin I.I. et al. Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cell // Cell Cycle. – 2017. – 16(6). – P. 545-555.
4. Pfannkuche K. Cell Fusion. Overviews and Methods // Pfannkuche K. – Springer, 2015. – 262 с.

МЕХАНИЗМЫ ОСТЕОГЕНЕЗА НА ПРИМЕРЕ ПАРАОССАЛЬНЫХ ГЕМАТОМ

Абызова М.С., Плакса И.Л., Мавликеев М.О., Бозо И.Я.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Научный руководитель – Деев Р.В.

Репаративный остеогистогенез реализуется лишь при оптимальных условиях тканевого и клеточного окружения. Основным лимитирующим фактором остеогистогенеза в параоссальной гематоме является ангиогенез, так как образование новых сосудов обеспечивает оксигенацию, миграцию и хоуминг в области повреждения клеток-предшественниц, способных к остеогенной дифференцировке [1, 2].

Целью исследования являлось выявление процессов, протекающих в параоссальной гематоме, молекулярных и клеточных эффекторов ангиогенеза, что может быть впоследствии использовано при разработке остеопластических материалов, способных создать оптимальные условия для репаративного остеогенеза через индукцию роста и развитие сосудов микроциркуляторного русла.

Материалы и методы. В работе проведено исследование параоссальных гематом, полученных в ходе реконструктивного оперативного лечения от 10 пациентов на 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 и 23-и сутки после перелома кости. Для оценки патоморфологических изменений «грануляционной ткани» были использованы гистологические и иммуногистохимические методы исследования.

Результаты. Гистологическая картина препарата параоссальной гематомы на 1-4-е сутки представлена скоплением эритроцитов, расположенных среди нитей фибрина. Визуализируются сегментоядерные лейкоциты, расположенные в основном единично, реже образуют небольшие скопления, а также макрофаги, что является собой картину асептического

воспаления. На 4-е сутки наблюдается пролиферация различных клеточных типов: индекс пролиферации (ИП) фибробластов $59,50 \pm 15$ %, эндотелиоцитов – $77,53 \pm 20$ %. ИЭ Flk-1 эндотелиоцитов – $92,97 \pm 4$ %, фибробластов – $57,70 \pm 21$ %, макрофагов – $76,54 \pm 14$ %, ИЭ Flt-4 эндотелиоцитов – $88,08 \pm 9$ %, фибробластов – $71,67 \pm 22$ %, макрофагов – $93,86 \pm 6$ %. На 4-е сутки в параоссальной гематоме обнаруживаются кровеносные сосуды $1,9 \pm 2,2$ в поле зрения при увеличении $\times 40$, диаметром $11,75 \pm 3,55$ μm . На 6-8-е сутки в параоссальной гематоме обнаруживается рыхлая соединительная ткань: преобладающий клеточный тип – клетки фибробластического дифферона, окруженные внеклеточным матриксом, представленным неупорядоченными коллагеновыми волокнами. Обнаруживаются мелкие округлые клетки с крупным ядром и узким ободком оксифильной цитоплазмы, «полибласты» по терминологии А.А. Максимова. К 8-м суткам заметно возрастает количество внеклеточного соединительнотканного матрикса: отношение площади коллагена к площади среза возрастает с $36,54 \pm 18$ % на 4-е сутки до $81,91 \pm 14$ % на 8-е сутки. Наблюдается пролиферация различных клеточных элементов: ИП фибробластов на 7-е сутки составляет $60,02 \pm 7$ %, наиболее заметно увеличение ИП эндотелиоцитов до $88,55 \pm 8$ %. На 7-е сутки ИЭ Flk-1 эндотелиоцитов – $86,00 \pm 21$ %, фибробластов – $62,28 \pm 10$ %, макрофагов – $61,61 \pm 18$ %, ИЭ Flt-4 эндотелиоцитов – $78,39 \pm 9$ %, фибробластов – $63,98 \pm 15$ %, макрофагов – $74,60 \pm 16$ %. На данном этапе в параоссальной гематоме наиболее активно протекает ангиогенез. Количество сосудов в поле зрения при увеличении $\times 40$ к 8-м суткам достигает максимума и составляет $5,4 \pm 4,3$. В данный период репаративного остеогистогенеза новообразованные сосуды служат не только источником кислорода и нутриентов для окружающей новообразующейся соединительной ткани, вероятным местом хоуминга макрофагов и клеток-предшественниц, но и продуцентом цитокинов, в частности, основным продуцентом VEGF и рецепторов к нему среди клеточных типов, представленных в параоссальной гематоме. На 10-

12-е сутки гистологическая картина параоссальной гематомы представлена рыхлой соединительной тканью с участками ретикулофиброзной кости, которые представляют собой балки коллагеновых волокон, окруженные крупными полигональными клетками с базофильной цитоплазмой. ИП фибробластов – $73,93 \pm 18$ %, эндотелиоцитов – $57,67 \pm 28$ %, остеобластов $32,64 \pm 9$ %. ИЭ рецепторов к VEGF максимален в популяции фибробластов и составляет $95,87 \pm 1$ % для Flk-1 и $97,45 \pm 1$ % для Flt-4 на 10-е сутки. Данный факт свидетельствует о том, что VEGF регулирует рапаративный остеогистогенез не только косвенно, посредством индукции ангиогенеза, но и посредством влияния на остеобласты, вероятно, индуцируя их пролиферацию и дифференцировку. На 23-и сутки обнаруживаются участки формирования пластинчатой костной ткани.

Выводы: VEGF-VEGFR ось регулирует ангиогенез и остеогенез в параоссальной гематоме, что может быть использовано при создании новых способов терапевтической коррекции нарушений консолидации перелома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а № 16-34-00440.

Ссылки на литературные источники:

1. Gololobov V.G., Deev R.V. Stromal stem cells and osteoblastic cellular differon // Morfologiya. 2003. – V. 123(1). – P. 9-19.
2. Maximow A.A. Uber undifferenzierte Blutzellen und mesenchymale Keimlagerim erwachsenen Organismus //Klin. Wochenschr. – 1926. – V. 47. – P. 2193-2228.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ

Билялов А.И., Абызова М.С., Титова А.А.,

Мавликеев М.О., Бозо И.Я.

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Научный руководитель – Деев Р.В.

Помимо травм, дефекты кожи являются частыми проявлениями таких распространенных заболеваний, как сахарный диабет, варикозная болезнь вен нижних конечностей, ожоги. Так, суммарное количество пациентов, страдающих данной патологией в РФ на 2014 г., составляет почти 500 тыс. человек, в мире – около 21 млн. человек [1, 2].

Эффективность большинства стандартных методов лечения дефектов кожи ограничена биологическим потенциалом тканей к восстановлению, снижением регенеративных и репаративных свойств самой кожи. Одним из методов стимуляции регенерации является терапия ростовыми факторами либо генно-клеточными конструкциями, кодирующими и несущими данные ростовые факторы. Клинические исследования (КИ) лекарственных препаратов и медицинских изделий в рамках именно этих трендов, способны значительно улучшить качество лечения пациентов с повреждениями кожи.

Поиск протоколов КИ проводился в базе данных clinicaltrials.gov по ключевым словам «skin ulcer», «skin burn».

Одним из медицинских изделий, одобренных FDA (2000 г.) для лечения диабетических и хронических язв, является Apligraf компании Organogenesis, США [3]. Изделие состоит из живых клеток и структурных белков, полученных из крайней плоти новорожденных. Основной дермальный слой представлен фибробластами и бычьим коллагеном 1 типа, верхний слой – кератиноцитами [4].

Компания Reaplix (Дания) разработала медицинскую технологию (ЗСР™) по получению раневого покрытия с аутогенными факторами роста, LEUCOPATCH®, с использованием оригинальных центрифуги и расходных материалов. На первом этапе получают кровь пациента, затем её центрифугируют при определённых параметрах в аппарате LEUCOPATCH®. На третьем этапе активируют полученный материал, состоящий из 3-х слоёв (полимеризованный фибрин, тромбоциты, лейкоциты), и наносят на хронические диабетические язвы [5].

Единственным геннотерапевтическим препаратом, находящемся на 3-й фазе КИ и показанным для лечения дефектов кожи диабетического генеза, является VM202 (ViroMed, Корея). Действующим веществом препарата является плазмидная ДНК, кодирующая фактор роста гепатоцитов (HGF), используется в виде инъекции [6].

Целью нашего научного проекта стала оценка влияния однократной генной терапии pCMV-VEGFA на заживление дефекта кожи у крыс после проведения аутодермопластики.

Под эфирным наркозом на предварительно выбритом участке межлопаточной области у крыс (n=16) выполняли отсепаровку полнослойного кожного лоскута размерами 2×2 см, который реплантировали и фиксировали по периметру узловыми швами (викрил 4/0). Животным экспериментальной группы внутрикожно вводили 1 мл раствора, содержащего 0,3 мг сверхскрученной плазмиды pCMV-VEGF165, животным контрольной группы вводили 1 мл воды для инъекций.

В одном случае из восьми в экспериментальной группе наблюдали полное приживание аутотрансплантата, в контроле – его гибель во всех случаях. Морфометрически установлено, что размеры раневого дефекта в экспериментальной группе на 12-е сутки составляли $5,52 \pm 4,80$ мм, в контроле – $12,45 \pm 0,82$ мм ($p=0,03$), на 18-е сутки – $2,53 \pm 2,94$ мм, в контроле – $4,23 \pm 3,5$ мм ($p>0,05$).

В экспериментальной группе количество сосудов грануляционной ткани в центре к 18-м суткам было статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой и составляло под лоскутом $26 \pm 2,9$, тогда как в контроле 20 ± 8 , по периферии – $27 \pm 3,4$ и $12,1 \pm 3,9$ соответственно, в кожной мышце – $21,2 \pm 3,9$ и $12,4 \pm 3,6$ ($p < 0,05$) соответственно.

Таким образом, клинические исследования медицинских изделий, биофармацевтических препаратов и медицинских услуг в рамках основных трендов регенеративной медицины многочисленны и применимы в практической деятельности. Результаты нашей работы также имеют положительный результат, наблюдается ускорение заживления кожного дефекта.

Список литературы:

1. Alexandrov G. A., Polikarpov A., Golubev N. The incidence of russian adult population in 2015 // Stat. Vestnik. Minzdrav. 2015. – P. 27-29.
2. World Health Organization [CHE]. Global report on diabetes. Geneva: WHO; 2016.
3. http://www.apligraf.com/professional/support_and_resources/regulatoryDocumentation.html.
4. What is Apligraf?
http://www.apligraf.com/professional/what_is_apligraf/index.html.
5. Reaplix company. Product. <http://reaplix.com/product/leucopatch>.
6. ViroMed company. Products and technologies.
http://viromed.co.kr/main/sub02_01_1.html

ДИСФЕРЛИН: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БЕЛКА, РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Файзрахманова Ф.А., Зейналова А.К.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Научный руководитель – Чернова О.Н.

Дисферлин представляет собой цитоплазматический белок из семейства ферлинов, молекулярная масса которого составляет 230 кДа. Белок был впервые описан в 1998 году. Дисферлин является трансмембранным белком, который локализуется как на цитоплазматической мембране, так и на мембране эндоплазматического ретикулума, а также на Т-трубочках. Он состоит из 2080 аминокислотных остатков, включенных в семь С2 доменов, которые взаимодействуют с кальцием, фосфолипидами и партнерскими белками, такими как аннексин, кальпаин-3, и caveolin-3. Дисферлин играет важную роль в процессе регуляции слияния мембран и в восстановлении клеток. Мутация в некоторых С2 доменах дисферлина (С2А, В, D, Е и G) может привести к развитию мышечных заболеваний, именуемых дисферлинопатиями [1].

Максимальная экспрессия гена, кодирующего дисферлин, обнаружена в скелетной и сердечной мускулатуре, а также в ряде немышечных органов, включая лёгкие, почки, плаценту, сосуды, печень и головной мозг. Дисферлин имеет важное значение в развитии и функционировании скелетной мышечной ткани. Белок участвует в миогенезе, слиянии одноядерных миобластов и формировании многоядерного мышечного волокна [2].

Как было указано выше, белок закреплен к мембране с помощью его трансмембранного домена, причем его амино-конец обращен в просвет Т-трубочки [2]. В непосредственной близости от дисферлина находятся партнерские белки, Ca²⁺ канал L-типа (DHPR) – в Т-трубочке, и

рианодиновый рецептор (RyR) – в саркоплазматическом ретикулуме. Кроме того, с *dysf* связываются кавеолин 3 (Cav3) и Bin1, которые также важны для развития Т-трубочек. Также было выявлено, что дефекты сарколеммы приводят к внутриклеточному накоплению ионов кальция. В норме дисферлин связывается с кальцием своим С2А доменом. При отсутствии дисферлина концентрация ионов возрастает, что приводит к активации протеолитических ферментов. Таким образом, усиливается процесс воспаления и последующий некроз мышечных волокон [1].

При повреждениях сарколеммы до 30-50 нм репарация мембраны происходит путём формирования т.н. «мембранного пэчча» («заплатки»), дисферлин вместе с внутриклеточными везикулами обеспечивает данный механизм путём кальций-инициируемого везикулярного экзоцитоза. При ультраструктурном исследовании мышечных волокон у пациентов с дисферлинопатией было выявлено множественное субсарколеммное скопление везикул. Также в самой сарколемме наблюдалось большое количество обрывков и неровностей. Некоторые исследования показали, что митсугумин 53 (MG-53) взаимодействует с дисферлином и кавеолином-3 и играет важную роль в облегчении перемещения везикул. Таким образом, существует гипотеза о том, что *DYSF* взаимодействует с MG53, аннексинами и другими партнерскими белками в скоплении везикул в месте повреждения [3].

Дисферлинопатии — группа миопатий аутосомно-рецессивного типа наследования. При данном виде заболеваний происходит нарушение функций дисферлина в скелетной мышечной ткани, что обусловлено мутациями в гене *DYSF*. Частота заболевания 1:200000 новорожденных. К дисферлинопатиям относят четыре основные фенотипические формы: дистальная миопатия Миоши — наиболее распространённый фенотип с преимущественным поражением мышц голеней и стоп, пояснично-конечностная мышечная дистрофия типа 2В (LGMD 2В) – более редкий фенотип, характеризующийся преимущественным поражением тазового

пояса, дистальная миопатия с первичным поражением передней группы мышц голени (DMAT), которая проявляется в виде свисающей стопы и степпажа, дегенеративных изменений в задней группе мышц голени и проксимально-дистальные формы — промежуточные формы между дистальной и проксимальной [4].

Значение и функции самого белка являются не до конца исследованными и требуют дальнейшего изучения.

Список литературы:

1. Старостина И.Г., Соловьева В.В., Деев Р.В. и др. Создание рекомбинантного аденовируса, кодирующего кодон-оптимизированный ген дисферлина, и анализ экспрессии рекомбинантного белка в культуре клеток *in vitro* // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 3 – С. 25-28.

2. Anderson L.V., Davison K., Moss J.A. et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development // Hum. Mol. Genet. – 1999. – 8(5). – P. 855-861.

3. Gushchina L.V., Bhattacharya S., McElhanon K.E. Treatment with Recombinant Human MG53 Protein Increases Membrane Integrity in a Mouse Model of Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B // Mol. Ther. – 2017. – 25(10). – P. 2360-2371.

4. Aoki M. Dysferlinopathy // GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. 2004 Feb 5.

МИКРО- И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫСЫ ПРИЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Сулейманова Д.М., Титова А.А., Мавликеев М.О.,

Калигин М.С., Киясов А.П., Деев Р.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Научный руководитель – Титова А.А.

Для разработки новых методов лечения диабета и его осложнений используют экспериментальные модели с использованием лабораторных животных. Для моделирования сахарного диабета в основном используют фармакологическую модель (уничтожаются бета клетки путём введения химических веществ), генную инженерию (проводят выключение гена инсулина), хирургические модели. В большинстве исследований используют модель химически индуцированного сахарного диабета, которая воспроизводится путём введения аллоксана. Аллоксановая модель сахарного диабета является одной из самых распространенных и удобных в воспроизведении.

Цель нашего исследования – описание ранних микро- и ультраструктурных изменений, происходящих в поджелудочной железе при введении аллоксана.

Эксперимент был проведен на крысах-самцах линии Wistar. Аллоксан вводили внутривентриально в дозе 180 мг/кг. Животные были выведены из эксперимента на 12, 24 и 48 час после введение препарата. Материалы для электронной микроскопии и патогистологического анализа забирали через 12, 24 и 48 ч. после введения аллоксана. Материал для гистологии фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Для электронной микроскопии материал фиксировали в 2,5 % глутаровом альдегиде и заливали в эпоксидные смолы.

Результаты: Патогистологический анализ островков при помощи световой микроскопии показал, что площадь островков увеличивается по мере развития повреждения с $11558,04 \pm 7393,26$ мкм² в норме до $19475,19 \pm 9436,94$ мкм² через 12 часов, $21184,411 \pm 6645,78$ мкм² через 24 часа, $223376,04 \pm 14094,38$ мкм² через 48 часов ($P < 0,05$), что можно объяснить отёком в результате гибели эндокриноцитов и выхода их содержимого наружу.

Ультраструктурные изменения в эндокриноцитах: через 12 часов в центральных клетка ядра отсутствуют или имеются из остатки, выявлены полости, заполненные жидкостью, в ядрах краевых клеток больше гетерохроматина с тенденцией к краевому стоянию, цитоплазма клеток заполнена мелкими прозрачными полостями (создается вид вспененной цитоплазмы). Через 24 часа после введения аллоксана в наиболее сохранных островках выявлена картина, напоминающая таковую через 12 часов: чётких границ между клетками нет, выявлены безъядерные клетки и признаки разрушения ядра, заполненные жидкостью полости, мелкие вакуоли в цитоплазме. Большая часть островков имели гомогенную структуру, ядра расположены неупорядоченно, в «бульоне клеток» могут быть обнаружены гранулы экзокриноцитов.

Иммуногистохимический анализ. Окрашивание с антителами к инсулину показало снижение количества инсулин⁺ клеток по сравнению с нормой. Отношение количества инсулин⁺ клеток к общему количеству клеток в островке в норме соответствовало $77,23 \pm 07,71$ %, через 12 часов – $57,61 \pm 09,20$ %, через 24 часа – $57,17 \pm 18,16$ %, через 48 часов – $7,04 \pm 7,13$ % ($P < 0,05$). При этом снижение количества инсулин⁺ клеток происходит как за счёт гибели клеток, так и за счёт их дегрануляции.

Описанные микроструктурные изменения свидетельствуют о гибели эндокриноцитов при повреждении аллоксаном. Кроме того, нами впервые описаны сопутствующие повреждения ультраструктур эндокринной части поджелудочной железы.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ДИСФЕРЛИН- ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Зейналова А. К., Чернова О.Н., Титова А.А., Мавликеев М.О.,
Файзрахманова Ф.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
Научный руководитель – Чернова О.Н.

Для полноценного понимания механизмов возникновения и развития дисферлинопатий важен целесообразный выбор модельного объекта, патогенез которого наиболее схож с развитием этой патологии у человека.

Ортологи к человеческому гену дисферлина существуют у 193 организмов. Практически во всех дисферлин так или иначе участвует в процессе слияния мембран. Наиболее интересен домен дрозофилы *DysF* в последовательности CG6468, который гомологичен двум доменам гена *DYSF* человека, причём один домен вложен в другой, что является очень редким случаем в эволюции генов [1].

Мышиный и человеческий дисферлин идентичны по аминокислотному составу на 94 %. Существуют две мышинные дисферлин-дефицитные линии, полученные в результате естественного мутагенеза: SJL/J и A/J [2]. Использование линий модельных животных, полученных путём естественного мутагенеза, является нецелесообразным, так как не гарантирует получение достоверных результатов. Таким образом, путём искусственного мутагенеза был выведен ряд дисферлин-дефицитных линий мышей, включая нокаутную линию *Vla/J* [3]. При проведении экспериментов на данной линии использование мышей линии *C57Bl/6* в качестве контрольной может быть дополнительно оправдано тем, что она является родительской линией.

Целью нашего эксперимента была оценка состояния икроножной мышцы в процессе прогрессирования дисферлинопатии.

Материалы и методы. Был проведён забор мышц голени мышей *Vla/J* и *C57Bl/6* на разных этапах постнатального онтогенеза (1, 10, 20 дней, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 18 месяцев). Парафиновые срезы голени были окрашены гематоксилином-эозином (по ним определяли площадь поперечного сечения мышечных волокон (МВ), доля центральоядерных МВ (ЦЯМВ) и доля некротизированных МВ); был проведён иммуногистохимический анализ с антителами против *myogenin* (доля миобластов на поздней стадии дифференцировки).

Результаты. У нокаутных по *DYSF* мышей происходит стремительное увеличение площади МВ вплоть до 5-го месяца (среднее значение = $1693 \mu\text{m}^2$), затем наблюдается редукция, в то время как у здоровых мышей происходит только рост данного показателя (максимально достигнутое значение на момент проведения эксперимента $1264 \mu\text{m}^2$ – 15 месяцев). С первого месяца начинается достоверный рост доли некротизированных волокон у *Vla/J* мышей (максимально достигнутое значение на момент проведения эксперимента 0,246), доля ЦЯМВ с 4-го месяца становится значительно выше, чем в контроле, и достигает своего максимума в 12 месяцев (0,517). Момент роста количества ЦЯМВ приходится на дебют заболевания. Относительно доли миогенин-позитивных ядер достоверных отличий между двумя линиями в возрасте 2-12 месяцев выявлено не было.

Выводы. По мере прогрессирования заболевания у мышей линии *Vla/J* наблюдаются некроз, гипертрофия и атрофия мышечных волокон икроножной мышцы, при этом процессы регенерации протекают замедленно.

Список литературы:

1. Ponting C.P., Mott R., Bork P., Copley R.R. Novel Protein Domains and Repeats in *Drosophila melanogaster*: Insights into Structure, Function, and Evolution // *Genome Res.* 2001. – 11(12). – P. 1996-2008.
2. Ho M., Post C.M., Donahue L.R. et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency // *Human Molecular Genetics.* – 2004. – V. 13. – P. 1999-2010.

3. Lostal W., Bartoli M., Bourg N. et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer // Hum Mol Genet. – 2010. – 19(10). – P. 1897-1907.

ОЦЕНКА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ
ОКТАКАЛЬЦИЕВОФОСФАТНЫХ БЛОКОВ:
РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Пресняков Е.В., Бозо И.Я., Комлев В.С., Деев Р.В.

Рязанский государственный медицинский университет

имени академика И.П. Павлова

ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека»

Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна

Научный руководитель – Деев Р.В.

Актуальность исследования определяется проблемой, которую принято определять, как «остеогенная недостаточность» (В.Г. Гололобов, 2011) – состояние обусловленное низкой активностью остеоиндуцирующих факторов системного или локального уровней регуляции и/или малым количеством камбиальных клеток в области повреждения кости, при котором естественный ход репаративного остеогенеза не способен обеспечить полного её гисто- и органотипического восстановления. Именно в таких случаях необходимо применение активированных остеопластических материалов, способных восполнить утраченные камбиальные резервы и/или остеоиндуцирующие факторы.

Цель исследования: оценить особенности остеointegrации персонализированных блоков, состоящих из октакальциевого фосфата (ОКФ) и плазмидной ДНК, несущей ген сосудистого эндотелиального фактора роста.

Материалы и методы. Работа выполнена на свиньях-самцах средней массой 50 ± 2 кг ($n = 4$). Каждому животному по данным мультиспиральной компьютерной томографии планировали дефекты большеберцовых костей правых задних конечностей с полным прерыванием и тела нижней челюсти в области углов с обеих сторон с сохранением непрерывности кости. Т-

образные дефекты длинных трубчатых костей имели общую протяженность 30 мм, центральная часть которых длиной 10 мм соответствовала диаметру кости (циркулярный дефект), а две периферические размерами 10×5×5 мм формировали краевые дефекты. Дефекты нижней челюсти имели размеры 30×15×10 мм, а по ширине соответствовали кости. На основе ОКФ были изготовлены матриксы-носители с использованием технологии трёхмерной печати, точно соответствующие по форме и размерам запланированным дефектам. Затем блоки из ОКФ совмещали с биологически активными нуклеиновыми кислотами по оригинальной технологии. Полученные персонализированные блоки ген-активированных материалов использовали для реконструкции большеберцовой кости и нижней челюсти, в качестве контроля в последнем случае служили блоки из ОКФ без плазмидной ДНК. В ходе имплантации изделий выполняли остеосинтез с использованием реконструктивной пластины для большеберцовой кости и минипластин для нижней челюсти. Свиньи были выведены из эксперимента через 3 и 6 месяцев после операции. Результаты оценивали с использованием компьютерной томографии и гистологических методов исследования.

Результаты. У трёх из четырёх животных заживление послеоперационных ран протекало без особенностей, однако у одного имел место локальный воспалительный процесс, вероятно обусловленный инфицированием послеоперационных ран. При этом полная опороспособность конечностей была восстановлена у всех животных уже через 2 недели после операции. По данным компьютерной томографии, на всех сроках наблюдения костные дефекты не выявлены, были заполнены регенератом высокой плотности и интегрированными с костными стенками имплантатами. На всех сроках наблюдения как по данным компьютерной томографии, так и гистологического исследования персонализированные имплантаты были полностью интегрированы с реконструированными костями. В контрольной группе материал был также полностью интегрирован.

Вывод. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности разработанных персонализированных имплантатов в замещении костных дефектов различных размеров, однако требуются дополнительные исследования и оптимизация производства.

ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КАК МЕТОД ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Индейкин Ф.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Научный руководитель – Мавликеев М.О.

Регенеративная медицина на сегодняшний день считается одной из наиболее прогрессивных и перспективных областей медицины. Её главной особенностью является стимуляция регенеративных процессов путём использования генной и клеточной терапии, а также тканевой инженерии. Основная область применения генной терапии – наследственные заболевания, причина которых корректируется с использованием функционально полноценных генов, компенсирующих дефектные гены клетки. Тканевая инженерия позволяет создавать трансплантаты тканей и органов по своей гистоархитектонике максимально приближенных к естественным, а потому способным в более полной мере заместить поврежденные ткани и органы. Клеточная терапия основана на применении стволовых клеток, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке, что позволяет использовать их в качестве источника клеток для регенерации.

Наиболее эффективны с позиции максимальных потенциалов к развитию плюрипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов. Однако их получение сопряжено с рядом препятствий, включающих этические аспекты, ввиду того, что источником плюрипотентных стволовых клеток является бластоциста. Использование мультипотентных стволовых, присутствующих во взрослом организме, также имеет ряд ограничений, связанных главным образом с их крайне низким содержанием в тканях.

Подход к решению проблемы источника стволовых клеток предложил С. Яманака, продемонстрировав возможность возвращения специализированных соматических клеток к плюрипотентному состоянию путём воздействия на них транскрипционными факторами, функционирующими в эмбриональных стволовых клетках. Полученные клетки обладали способностью теоретически неограниченному делению и дальнейшей дифференцировке, что позволяло рассматривать их использование как наиболее перспективный метод. Однако использование вирусов в процессе индукции плюрипотентности и неограниченная способность к делению, создающая риск развития опухоли, делают небезопасным их применение в терапевтической практике и оставляют открытым вопрос об источнике клеток для восстановления тканей.

Наиболее многообещающим подходом к получению клеток для тканевой репарации на сегодняшний день является метод трансдифференцировки, при котором одна дифференцированная соматическая клетка превращается в другую дифференцированную клетку без прохождения плюрипотентной стадии. Это достигается путём активации линиеспецифичных генов, либо их эктопической оверэкспрессии. Ключевой теоретической задачей, стоящей перед исследователями, является подбор факторов трансдифференцировки, способных к максимально полному перепрограммированию клеток. Определённого успеха в этом отношении достигли исследования по преобразованию фибробластов в кардиомиоциты, миоциты и нейроны и др. Несомненными преимуществами данного метода являются отсутствие технических препятствий, связанных с источником исходных клеток, отсутствие туморогенности и возможность осуществления трансдифференцировки *in situ*. Это позволит заменить соединительнотканый участок, образовавшийся в участке повреждения на функционально полноценный клеточный репертуар, характерный для этой ткани.

Однако несмотря на теоретическую обоснованность и успех экспериментальных работ, до внедрения его в практику необходимо решить ряд практических задач, связанных с повышением эффективности и подтверждением безопасности, что и является основным направлением дальнейших исследований.

Список литературы:

1. Chen O., Qian L. Direct cardiac reprogramming: advances in cardiac regeneration // *BioMed research international*. – 2015. – Т. 2015. - Article ID 580406. - 8 p.
2. Prasad A. et al. Direct Conversion Through Trans-Differentiation: Efficacy and Safety // *Stem cells and development*. – 2017. – Т. 26. – №. 3. – С. 154-165.
3. Boularaoui S. M. et al. Efficient transdifferentiation of human dermal fibroblasts into skeletal muscle // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2017. - doi: 10.1002/term.2415 (Epub ahead of print)

СЛУЧАЙ СИНДРОМА КАРОЛИ: КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Мавликеев М.О., Титова А.А., Чебочакова А.Т.,

Киясов А.П., Деев Р.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Научный руководитель – Киясов А.П.

Синдром Кароли – редкое (частота 1:1000000) аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся кистозным расширением внутripечёчных желчных протоков в сочетании с портальным фиброзом, ведущими к портальной гипертензии. Данное заболевание обусловлено мутацией в гене PKHD1, кодирующем белок фиброцистин – компонент первичных ресничек эпителия, в результате чего нарушается формирование желчных протоков. Патоморфогенез синдрома Кароли остаётся недостаточно изученным. Нами описан клинический случай с подробным патогистологическим анализом.

Пациент в возрасте тридцати семи лет, с детства страдавший циррозом печени неясной этиологии, поступил в ГАУЗ «МКДЦ» (г. Казань) в мае 2016 года с жалобами на сильную боль в правом эпигастрии, желтуху и рвоту. При обследовании обнаружена выраженная гепатоспленомегалия. Была произведена ЭРХПГ с одновременной литотрипсией и последующей установкой назобилиарного дренажа, при фистулографии обнаружены множественные кистозные расширения внутripечёчных желчных протоков. В ходе 25-дневной госпитализации пациенту проводили повторные сеансы плазмафереза с целью детоксикации, ЭРХПГ и санации общего желчного протока, с отрицательной динамикой состояния пациента в виде нарастания уровня прямого билирубина, появления и неуклонного прогрессирования дисметаболической энцефалопатии, переходом в состояние комы и последующей смертью.

В ходе патологоанатомического вскрытия обнаружено: печень плотная, бугристая, зелено-коричневого цвета, увеличена в размерах до 30,0×19,0×23,0×12,0 см. На разрезе ткань печени узловатая, с широкими волокнистыми прослойками желто-серого цвета, расширенными внутрипечёночными желчными протоками и множественными многокамерными кистами 0,5-7,5 см в диаметре с плотными стенками толщиной 0,1-0,5 см, заполненными замазкообразной коричневой желчью и местами бело-желтым гноем. Желчные протоки значительно расширены, левый печёночный проток обтурирован. В расширенных портальной и селезёночной венах обнаружены пристеночные тромбы. Выявлено варикозное расширение вен нижней трети пищевода, размеры селезёнки увеличены до 27,0×12,0×6,0 см.

Образцы внутренних органов были зафиксированы в 10 % нейтральном формалине и залиты в парафин по стандартной методике, гистологические срезы были окрашены гематоксилином и эозином, срезы печени также были окрашены по Маллори, альциановым синим, импрегнированы серебром по Футу, а также иммуногистохимически с антителами к Ki-67, цитокератинам 7, 8, 19, CD34, CD4, CD8, CD45, CD68, десмину, каспазе 3, bcl-2, α -фетопротейну. В качестве контроля были взяты образцы печени пациента в возрасте тридцати лет, умершего от разрыва аневризмы мозговой артерии.

При патогистологическом анализе срезов внутренних органов обнаружены: перицеллюлярный отек и сморщивание нейронов коры головного мозга, полнокровие сосудов и склероз межальвеолярных перегородок в легких, венозное полнокровие мозгового вещества почек и гиалиново-капельная дистрофия нефроцитов, атрофия белой и красной пульпы селезенки с выраженным фиброзом ретикулярной стромы.

При патогистологическом анализе срезов печени обнаружены широкие прослойки фиброзной ткани, между которыми замурованы псевдоузлы печёночной паренхимы различной формы и размеров.

Печёночные балки дисконплексованы, синусоиды расширены, отдельные гепатоциты некротизированы. В фиброзных полях обнаружено увеличенное количество желчных протоков различного калибра, протоки расширены, с разрывами стенки, имели причудливую форму, содержали желчные камни и гной. Выстилка протоков либо псевдомногослойная, с гиперплазированными холангиоцитами, переполненными кислыми мукополисахаридами, либо атрофичная. Наблюдается лимфогистиоцитарная инфильтрация слизистой протоков. Фиброзные поля и стенки кист различных размеров и форм инфильтрированы CD8⁺ лимфоцитами. Окрашивание с антителами к CD68 выявило увеличенные в численности и размерах клетки Купфера, фагоцитирующие желчь. Также были обнаружены циткератин 7-позитивные гепатоциты.

Таким образом, патогистологический анализ печени пациента с синдромом Кароли выявил кистозное расширение внутрпечёночных желчных протоков, гнойный холангит и, как следствие, билиарный цирроз печени. При этом важными патоморфогенетическими компонентами синдрома являются тяжелый портальный фиброз с обширной лимфоцитарной инфильтрацией, выраженная дуктулярная реакция с дисплазией холангиоцитов и нарушение дифференцировки общей клетки-предшественницы холангиоцитов и гепатоцитов.