

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, 18 ноября 2016 года)

СБОРНИК ТРУДОВ

КАЗАНЬ 2016

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

Составитель:
М.С. Калигин

Под общей редакцией заведующего кафедрой морфологии и общей патологии ИФМиБ К(П)ФУ д.м.н., проф. А.П. Киясова

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, 2015
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

д.м.н. – доктор медицинских наук
к.м.н. – кандидат медицинских наук
к.б.н. – кандидат биологических наук
асс. – ассистент
доц. – доцент
проф. – профессор

ОЦЕНКА РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ МИТОКСИЧНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ У *Vla/J* И *C57Bl/6* МЫШЕЙ

Чернова О.Н., Мавликеев М.О., Титова А.А., Яковлев И.А., Деев Р.В., Киясов А.П.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Научный руководитель: д.м.н., профессор А.П. Киясов

Известно, что существует большое количество факторов, вызывающих повреждение мышечной ткани. В условиях сниженной экспрессии или отсутствия белков сарколеммы, ответственных на регенерацию поврежденных мышечных волокон (МВ), нарушаются процессы репарации. Одним из таких белков является дисферлин, кодируемый геном *DYSF* [1]. Мутации в данном гене клинически проявляются мышечной слабостью и атрофией преимущественно мышц нижних конечностей, а группа таких заболеваний именуется поясно-конечностными мышечными дистрофиями 2В [2,3]. Доклинические исследования генно-клеточных препаратов направлены на восстановление поврежденной сарколеммы и изучаются на мутантных животных с той или иной патологией. *Vla/J* – одна из линий мышей с дисферлинопатией, контрольной группой для которых выступают мыши линии *C57Bl/6*.

Целью данного исследования является оценка репаративной регенерации скелетных мышц в условиях сниженной экспрессии дисферлина.

Материалы и методы. Шести мышам линий *Vla/J* и *C57Bl/6* (по три в каждой группе) вводили 100 мкл 0,5% р-ра новокаина (миотоксический агент) с последующим забором мышц голени на 2, 4 и 10 сутки после инъекции. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, проводили иммуногистохимический анализ с антителами к α -SMA, Ki76 и myogenin.

Результаты. Доля некротизированных МВ достоверно выше у *Vla/J* мышей по сравнению с *C57Bl/6* на 2 и 10 сутки ($40,8 \pm 9,65\%$ и $32,01 \pm 6,03\%$, $p=0,0043$, $12,4 \pm 5,72\%$ и $4,63 \pm 2,01\%$, $p=0,043$, соответственно). Процент центральоядерных МВ к 4 суткам значительно выше у *C57Bl/6* ($33,75 \pm 24,14\%$ и $1,9 \pm 2,61\%$ у *Vla/J*), в то время как к 10 суткам их содержание у *Vla/J*, наоборот, выше ($31,81 \pm 10,7\%$ и $22,55 \pm 4,5\%$, $p=0,043$, у *C57Bl/6*), что свидетельствует об отсроченной регенерации МВ. Содержание Ki67-позитивных ядер максимальное к 4 суткам в обеих группах ($30,23 \pm 3,54\%$ у *Vla/J* и $41,02 \pm 7,99\%$, $p=0,018$, у *C57Bl/6*), к 10 суткам снижается ($18,9 \pm 3,22\%$ и $16,79 \pm 3,71\%$ у *Vla/J* и *C57Bl/6* соответственно). Миогенин-позитивных ядер статистически достоверно

больше в икроножной мышце C57Bl/6 мышей ($4,62 \pm 0,01\%$ и $0,44 \pm 0,62\%$, $p=0,023$), что говорит и более раннем начале регенерации МВ по сравнению с дисферлин-дефицитными мышами. Соотношение сосудов к общему числу МВ максимально у Bla/J на 4 сутки ($14,16 \pm 2,89\%$), у C57Bl/6 на 10 сутки ($15,29 \pm 3,32\%$).

Выводы: Регенерация мышц в условиях дефицита дисферлина протекает медленнее по сравнению со здоровой мышечной тканью. Новокаин оказывает более выраженное миотоксическое действие на мышечной Bla/J по сравнению с C57Bl/6.

Моделирование регенеративных процессов в скелетной мышце со сниженной экспрессией дисферлина – потенциальная точка приложения для генной и клеточной терапии.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ (14-15-00916).

Ссылки на литературные источники:

1. Aoki M. Dysferlinopathy. GeneReviews® 2004; Feb.5.
2. Hornsey M.A., Laval S.H., Barresi R. et al. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models. *Neuromuscular Disorders* 2013; 23(5): 377-387.
3. Amy A. Vincent, Hannah S. Rosa, Charlotte L. Alston et al. Dysferlin mutations and mitochondrial dysfunction. *Neuromuscular Disorders* 2016; Aug. 29.
4. Vainzof M., Ayub-Guerrieri D., Onofre P.C. et al. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. *J. Mol. Neurosci.* 2008; 34: 241–248

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПА ЗВЁЗДЧАТЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO И IN VITRO

Заикина Э.И., Шафигуллина А.К., Титова А.А., Мавликеев М.О., Певнев Г.О., Бурганова
Г.Р.

Казанский (Привожский) федеральный университет, г.Казань

Регенеративная медицина в настоящее время является одной из наиболее бурно развивающихся и многообещающих областей медицины. В её основу заложен принципиально новый подход к восстановлению поврежденного органа путем стимулирования и/или использования для ускорения регенерации стволовых/прогениторных клеток. Чтобы воплощать этот подход в жизнь, необходимо знать, что же представляют собой стволовые клетки, и, в частности, региональные стволовые клетки, каков их фенотип и свойства. Для ряда тканей и органов, таких как эпидермис и скелетная мышца, стволовые клетки уже идентифицированы и описаны их ниши. Однако печень – орган, регенераторные способности которого известны с античных времен, до сих пор не раскрыл своей главной тайны – тайны стволовой клетки.

Звёздчатые клетки печени (ЗКП) – один из самых загадочных клеточных типов печени, являются главным претендентом на роль региональной стволовой клетки печени. На протяжении более 100 лет были изучены и описаны различные их свойства, что нашло отражение в названиях этой популяции непаренхиматозных клеток печени. Так, в литературе можно встретить термин жиронакапливающие клетки, или липоциты печени, ввиду содержания в их цитоплазме капель с витамином А, перисинусоидальные клетки в связи с их локализацией в перисинусоидальном пространстве печени, клетки Ито по имени японского учёного, внёсшего большой вклад в их изучение, перицитами печени из-за их сократительной способности. На сегодняшний день общепринятым является название ЗКП [1, 2].

Однако, несмотря на почти вековую историю изучения этих клеток, вопросов, касающихся их фенотипа и функций, остается намного больше, чем ответов. На сегодняшний день известно, что ЗКП играют ведущую роль в регуляции гомеостаза ретиноидов, продуцируют различные факторы роста и компоненты межклеточного матрикса, а также участвуют в развитии и регенерации печени [3].

Для того, чтобы стало возможным применение клеток Ито в клеточной терапии заболеваний печени необходимо их всестороннее изучение. Поэтому целью нашего исследования стало изучение фенотипа ЗКП в экспериментах *in vitro* (т.е. в условиях

лаборатории) и *in vivo* (т.е. в живом организме-в нашем случае на лабораторных животных).

Методы исследования. Исследование проведено на белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г. ЗКП получали в ходе многоэтапного процесса коллагеназно-пропазовой перфузии с последующим разделением в градиенте плотности гистоденза. Выделенные ЗКП культивировали в стандартных условиях в питательной среде ДМЕМ с содержанием 10% фетальной бычьей сыворотки, L-глутамина, пенициллина, стрептомицина.

С помощью методов иммуоцитохимии мы изучали свойства ЗКП, а также оценивали изменения фенотипа на разных сроках и при различных условиях эксперимента. Проводили окрашивание культуры ЗКП антителами к десмину – маркёру ЗКП, C-kit – маркёру стволовых клеток.

Для изучения процесса регенерации печени и роли, которую играют в этом процессе ЗКП, используются различные модели повреждения печени: хирургические модели (частичная гепатэктомия (ЧГ), перевязка ветвей воротной вены), модели токсического повреждения печени (нитратом свинца, четыреххлористым углеродом, галактозамином и т.д.). Для рассмотрения свойств ЗКП в условиях *in vivo* мы трансплантировали эти клетки в печень крыс-реципиентов, которым была выполнена ЧГ, в ходе которой было удалено 68% массы печени. Предварительно клетки были помечены флуоресцентной меткой (красным флуоресцентным белками (RFP)), чтобы иметь возможность обнаруживать их в ткани печени-реципиента (рис.1). Гистологические срезы печени крыс-реципиентов окрашивали антителами к RFP, десмину и α -ГМА (α -гладкомышечному актину) – маркёру миофибробластов, гладкомышечных клеток.

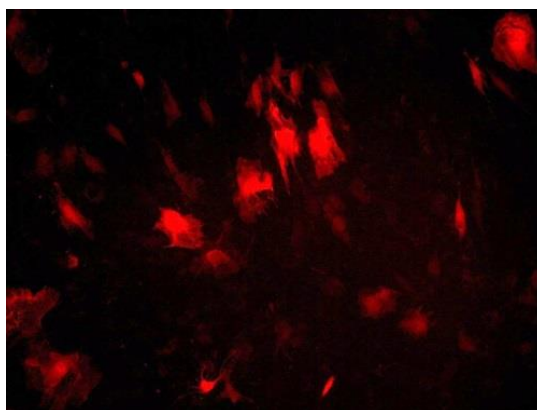


Рисунок 1. Культура ЗКП, меченная с помощью красного флуоресцентного белка RFP. Флуоресцентная микроскопия, x200

Результаты. Свежевыделенные ЗКП *in vitro* имели округлую форму (рис.2). Со 2-3-их суток культивирования приобретали характерную для ЗКП отростчатую звёздчатую форму (рис.3). Позитивное окрашивание культивируемых клеток антителами к десмину подтверждает принадлежность выделенных клеток к ЗКП (рис.4). Выявлена также стабильная экспрессия белка C-kit в культуре клеток Ито (рис.5), что косвенно указывает на принадлежность ЗКП к популяции стволовых клеток.

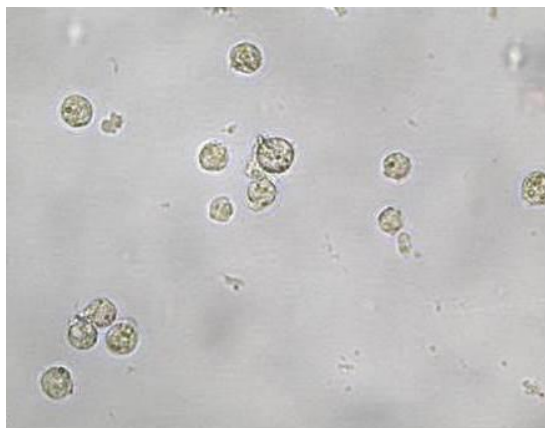


Рисунок 2. ЗКП непосредственно после выделения из печени крысы. Фазово-контрастная микроскопия, x200.

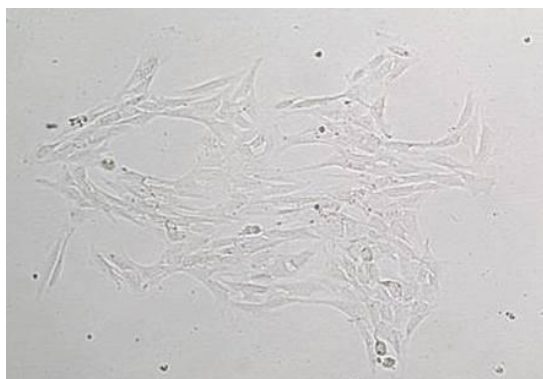


Рисунок 3. ЗКП на 4-й день культивирования. Формирование колоний, x50.

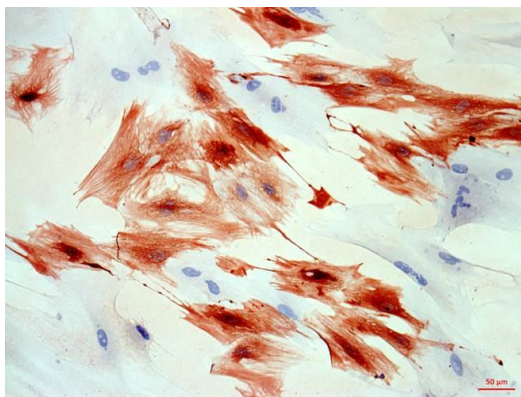


Рисунок 4. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры ЗКП с антителами к десмину, x200.

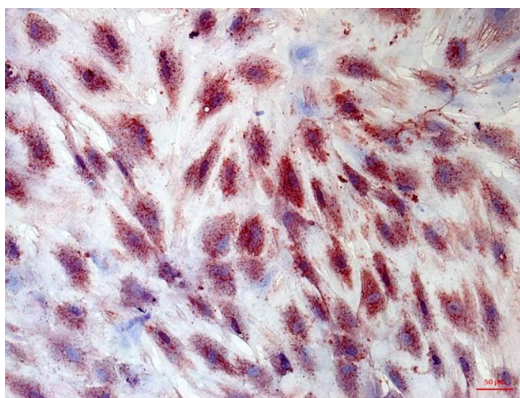


Рисунок 5. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры ЗКП с антителами к C-kit, x200.

После трансплантации ЗКП, в гистологических срезах печени крыс-реципиентов нами были обнаружены многочисленные RFP+ клетки (рис.6). Данный факт свидетельствует о том, что трансплантированные ЗКП сохраняют жизнеспособность и встраиваются в паренхиму печени реципиентов. Наблюдаемое увеличение десмин+ клеток позволяет сделать вывод об интенсивно происходящем процессе регенерации печени после повреждения и с большой долей вероятности предполагать участие ЗКП в этом процессе.

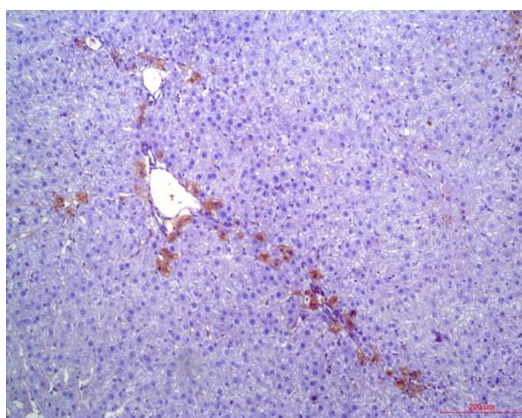


Рисунок 6. Печень крысы после ЧГ и трансплантации ЗКП, реакция с антителами к RFP+. Продукт иммуногистохимической реакции красного цвета, докраска ядер гематоксилином, x 200

Стоит отметить, что ни на одном сроке эксперимента α -SMA+ клетки в паренхиме печени не были обнаружены (рис.7), что свидетельствует о том, что на изучаемых нами сроках ЗКП не трансдифференцируются в миофибробласты, и, следовательно, не вызывают фиброз печени.

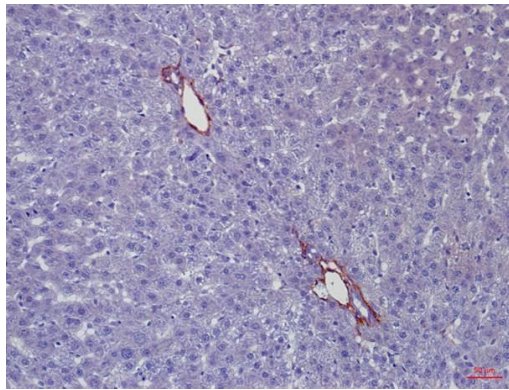


Рисунок 7. Печень крысы после ЧГ и трансплантации ЗКП. α -ГМА+сосуды, миофибробласты в паренхиме печени отсутствуют. Продукт иммуногистохимической реакции красного цвета, докраска ядер гематоксилином, х 200

Заключение. ЗКП являются главными претендентами на роль региональной стволовой клетки печени. Методика выделения ЗКП позволяет получать клетки, которые возможно культивировать *in vitro*. При трансплантации ЗКП мигрируют в печень, сохраняют свою жизнеспособность *in vivo* и участвуют в процессе регенерации печени без риска развития фиброза.

Литературные источники

1. Ramadori G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell / G. Ramadori // *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* – 1991. – V. 61, № 3. – P. 147-158.
2. Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs / K. Wake // *Int Rev Cytol.* – 1980. – V. 66. – P. 303-353.
3. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat / T.H. Kim [et al.] // *Hepatology.* – 1997. – V. 26, № 4. – P. 896-904.

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДЫ pCMV-VEGF165 НА ЗАЖИВЛЕНИЕ КОЖНОЙ РАНЫ У КРЫС С ХИМИЧЕСКИ-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Абызова М.С., Билялов А.И., Трондина А.А., Титова А.А., Мавликеев М.О., Калигин М.С., Ризванов А.А., Киясов А.П., Деев Р.В
ФГАОУ ВО К(П)ФУ ИФМиБ, Казань.
Научный руководитель к.м.н. Деев Р.В.

По данным ВОЗ во всем мире от сахарного диабета страдают более 422 миллионов человек. [1] Гипергликемия оказывает влияние на метаболические процессы в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках сосудов, что ведет к нарушению функции сосудов, развитию периферической артериальной недостаточности. [2, 4] Хронические язвенные поражения кожи являются наиболее грозными осложнениями сахарного диабета, так как нередко ведут к ампутации пораженной конечности и развиваются у 15% больных сахарным диабетом. [3] Ампутации конечности, вызванные синдромом диабетической стопы, составляют примерно 50-70% в структуре всех ампутаций конечностей.[2]. Мы предполагаем, что увеличение количества сосудов в области хронической кожной раны будет способствовать ее заживлению. Целью данного исследования было установить влияние введения плазмиды pCMV-VEGF165 в область кожной раны у крыс с химически-индуцированным сахарным диабетом.

На 21 день с начала развития гипергликемии крысам (самцы, 300-350 г, линия Вистар) была нанесена кожная рана размером 8×8 мм в межлопаточной области. Животным в экспериментальной группе в края раны внутрикожно был введен раствор 60 мкг (группа 1) или 200 мкг (группа 2) плазмиды pCMV-VEGF165 в 200 мкл воды для инъекций или 200 мкл воды для инъекций животным в контрольной группе. Через 10 дней был произведен забой. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином, проводились иммуногистохимические реакции.

В экспериментальных группах наблюдается увеличение частоты эпителизации раны по сравнению с контрольной группой. Количество сосудов в «грануляционной ткани» животных из экспериментальной группы достоверно выше, чем в «грануляционной ткани» животных из контрольной группы. У животных из экспериментальных групп отмечается тенденция к повышению количества нервов в прилегающей интактной ткани.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно заключить, что введение плазмиды pCMV-VEGF165 в область кожной раны у крыс с химически-индуцированным сахарным диабетом ускоряет заживление ткани посредством индукции ангиогенеза.

Литературные источники

1- Global report on diabetes. 1. Diabetes Mellitus – epidemiology. 2. Diabetes Mellitus – prevention and control. 3. Diabetes, Gestational. 4. Chronic Disease. 5. Public Health. I. World Health Organization. ISBN 978 92 4 156525 7 (NLM classification: WK 810)

2- Diabetes and Vascular Disease. Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. Mark A. Creager, Thomas F. Lüscher, prepared with the assistance of, Francesco Cosentino and Joshua A. Beckman. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000091257.27563.32> Circulation. 2003;108:1527-1532. Originally published September 22, 2003

3- Literature review on the management of diabetic foot ulcer

Leila Yazdanpanah, Morteza Nasiri, and Sara Adarvishi World J Diabetes. 2015 Feb 15; 6(1): 37–53. Published online 2015 Feb 15. doi: 10.4239/wjd.v6.i1.37 PMID: PMC4317316

4- Diabetes and Vascular Disease. Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part II. Thomas F. Lüscher, Mark A. Creager, Joshua A. Beckman and Francesco Cosentino <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000089189.70578.E2>. Circulation. 2003;108:1655-1661. Originally published September 29, 2003

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДЫ pCMV-VEGF165 НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ПОЛНОСЛОЙНОГО ДЕФЕКТА КОЖИ У КРЫС ПОСЛЕ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ

Билялов А.И., Абызова М.С., Мавликеев М.О., Деев Р.В.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

Научный руководитель: к.м.н. Деев Роман Вадимович.

Целью исследования является в изучение влияния генной терапии (pCMV-VEGF165) на заживление дефекта кожи после аутодермопластики.

Под эфирным наркозом на предварительно выбритом участке межлопаточной области у крыс (самцы линии Wistar, вес 250-300г) выполняли отсепарирование полнослойного кожного лоскута размерами 2×2 см, который подвергался ортотопической пересадке и фиксировался по периметру узловыми швами. Четверым животным производилась внутрикожная инъекция 1 мл раствора, содержащего 0,3 мг сверхскрученной плазмиды pCMV-VEGF165, сразу после операции. Контрольной группе животных (n=7) производилось внутрикожная инъекция 1 мл физраствора. Результаты оценивали через 3, 6, 9, 12, 18 сут. при помощи: макроскопической оценки состояния лоскута, лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), гистологических, морфометрических и иммуногистохимических (αГМА) методов.

В экспериментальной группе макроскопически полная гибель лоскута отмечается на 6 сут., что на 3 дня позже, чем в контроле.

Данные ЛДФ экспериментальной группы схожи с данными, полученными при измерении в контроле. Процессы ангиогенеза наиболее интенсивно происходят под лоскутом, преимущественно в краевых зонах, однако различия с кровообращением в центральных участках статистически не значимы. Так, сразу после операции кровообращение под ним редуцировано до 70,53%±9,5 (за 100% принято кровообращение в неповрежденном участке кожи); через 3 сут. - 38,0%±5,9; через 6 - 59%±5,9%; на 9 сут. - 56,9±5,9%; на 12 сут. – 59,9%±4,5%, на 18 сут. 88%±3,5%.

Значимым гистологическим отличием от контроля было то, что в эксперименте кожная мышца аутотрансплантата сохраняла свою жизнеспособность. Морфометрически установлено, что размеры раневого дефекта в экспериментальной группе на 12 сут. составляют 1,7±1,7 мм, в контроле - 11,28±0,5 мм, а на 18 сут. 5,83 ±1,73 мм, в контроле - 8,29±0,5 мм.

Количество сосудов, проросших в грануляционную ткань к 18 суткам, находящуюся в центре под лоскутом составляет - 26±2,9, находящуюся по периферии -

27±3,4 (при стандартном увеличении ×200), в кожную мышцу - 21,2±3,9 (при стандартном увеличении ×400), что значительно больше по сравнению с контрольной группой и имеет статистическую значимость различий ($p < 0,05$). В контрольной группе количество сосудов под лоскутом составляет - 20±8, на периферии – 12,1±3,9, в кожной мышце – 12,4±3,6.

Прямая генная терапия плазмидой pCMV-VEGF165 положительно влияет на заживление дефекта кожи после аутодермопластики. Происходит ускорение реэпитализации раны и увеличение прорастания сосудов в аутотрансплантат. Дальнейшие исследования в данной области могут способствовать решению проблем, возникающих при аутодермопластике полнослойного кожного лоскута.

ДИАГНОСТИКА РЕДКИХ ФОРМ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ: ОТ КЛИНИКИ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКЕ И ПАТОГИСТОЛОГИИ И ОБРАТНО

Мавликеев М.О., Бардаков С.Н., Федотов В.П., Коновалов Ф.А., Умаханова З.Р.,

Чекмарева И.А., Далгатова Г.Д., Деев Р.В., Исаев А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Научный руководитель: д.м.н., проф. Киясов Андрей Павлович

Плектинопатии относятся к орфанным заболеваниям, вызываемым мутациями в гене плектина. Плектин является белком цитоскелета и связывает его компоненты друг с другом в различных тканях. Плектинопатии отличаются полиморфизмом симптомов с преимущественным поражением кожи и скелетных мышц. Нами описан пациент с пояснично-конечностной мышечной дистрофией тип 2Q (ПКМД2Q), у которого обнаружена новая гомозиготная мутация chr8: 145047583C>A, Glu20ter в гене PLEC, изоформа 1f. У пациента был взят биоптат латеральной бедренной мышцы. Цель исследования – патогистологический анализ биоптата скелетной мышцы пациента с ПКМД2Q.

Тонкие срезы биоптата окрашивали гематоксилин-эозином (ГЭ), по Маллори, иммуногистохимически с антителами к десмину, CD34, ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA), тяжелым цепям быстрого и медленного миозина (MHCfast и MHCslow), Pax7 (маркер покоящихся миосателлитоцитов), Myf5 и myogenin (фактор дифференцировки и маркер терминальной дифференцировки миосателлитоцитов соответственно). В качестве контроля была взята икроножная мышца здорового человека. На срезах, окрашенных ГЭ, обнаруживались мышечные волокна (МВ) различной формы и размеров (межквартильный размах площади поперечного сечения МВ – 2430,2 против 788,3 мкм² в контроле). При этом обнаруживались многочисленные мышечные трубочки (МТ) (39,37±7,76%, в норме – единичные на срез), лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации не обнаружено. Окрашивание по Маллори выявило умеренный эндомизиальный фиброз (17,58±0,01% против 1,64±0,38% в контроле). Выявлено неравномерное распределение десмина в МВ с его аккумуляцией по периферии, что указывает на дезорганизацию цитоскелета вследствие потери плектина. Обнаружены многочисленные пролиферирующие фибробласты, скопления по 5-6 МТ с PCNA+ ядрами, а также PCNA+ ядра на периферии МВ. Наблюдалось примерно равное содержание быстрых и медленных МВ в исследуемом биоптате (52,03% и 47,97% соответственно), при этом по данным M.A. Johnson et al., 1973 в норме их 67.3% и 37.8% соответственно. Обнаруживались многочисленные Myf5+ ядра в МТ и единственное МВ с myogenin+

ядрами, что свидетельствует об активированном, но незавершенном рабдомиогенезе. Окрашивание с антителами к Pax7 и CD34 не выявило значимых различий от здоровой мышцы.

Таким образом, патогистологический анализ биоптата выявил атрофию с дезорганизацией цитоскелета МВ, активным, но не завершенным репаративным рабдомиогенезом, умеренный эндомизиальный фиброз и нарушение соотношения быстрых/медленных МВ.

ЭКСПРЕССИЯ ИНСУЛИНА И ГЛЮКАГОНА В ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС НА ФОНЕ МЕДЬ-ДЕФИЦИТНОЙ ДИЕТЫ

Сайфуллина К.Н., Абдулхакова А.Р., Певнев Г.О., Мавликеев М.О., Гумерова А.А.,
Киясов А.П.

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, г.Казань
научный руководитель – к.м.н., доц. Абдулхаков С.Р.

Одной из моделей для изучения регенерации поджелудочной железы является повреждение органа на фоне медь-дефицитной диеты, при которой происходит деструкция паренхимы поджелудочной железы, сопутствующее повреждение печени и регенерация этих органов на фоне сбалансированного рациона питания. Целью нашего исследования стало изучение уровня экспрессии инсулина и глюкагона в ткани поджелудочной железы и печени на фоне медь-дефицитной диеты.

Материалы и методы. Исследование проведено на 24 белых лабораторных крысах-самцах линии Вистар весом 80-100 г. Животные получали медь-дефицитную диету (MP Biomedicals, США) с добавлением медь-связывающего нетоксичного вещества - триэтилететрамина тетрагидрохлорида в концентрации 0,6 % и имели свободный доступ к воде в течение 8 недель. Затем животные были переведены на сбалансированный корм для грызунов, которые они принимали в течение 8 недель. Контрольные животные находились на сбалансированном рационе для грызунов в течение всего срока эксперимента. Животных выводили из эксперимента на 4, 6, 8 неделях диеты и через 4, 6, 8 недель после перехода на стандартный рацион питания. Парафиновые срезы печени окрашивали иммуногистохимически с использованием моноклональных антител против инсулина и глюкагона. Также было измерено содержание этих гормонов в венозной крови крыс.

Результаты. Начиная с 4 недели медь-дефицитной диеты, наряду с позитивным окрашиванием антителами к глюкагону периферических клеток островков поджелудочной железы, наблюдали появление отдельных глюкагон-позитивных клеток и скопления глюкагон-позитивных клеток, напоминающих вновь формирующиеся островки. При этом глюкагон-позитивные клетки занимали большую центральную часть новообразованных островков. Наибольшая экспрессия глюкагона в поджелудочной железе наблюдалась через 8 недель диеты, а также через 2 и 4 недели отмены диеты (Рис. 1).

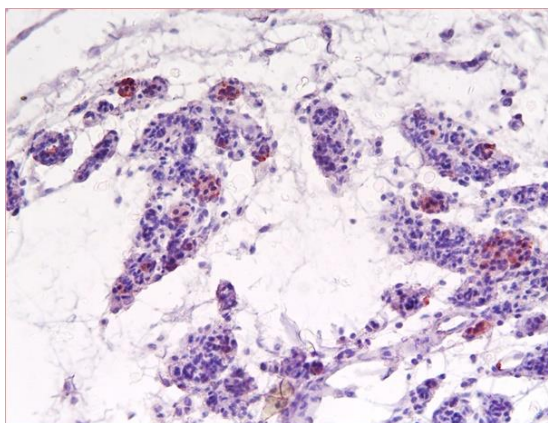


Рис. 1. Поджелудочная железа крысы. 8 недель медь-дефицитной диеты. Иммуногистохимическая реакция с антителами к глюкагону: продукт реакции красного цвета, докраска гематоксилином. Ув. x200

В печени на протяжении всего эксперимента обнаруживаются скопления глюкагон-позитивных клеток в перицентральных областях, а также напоминающих по форме гепатоциты, единичные клетки в паренхиме печени. Пик экспрессии глюкагона клетками печени приходится на 2 неделю сбалансированного питания крыс (Рис. 2).

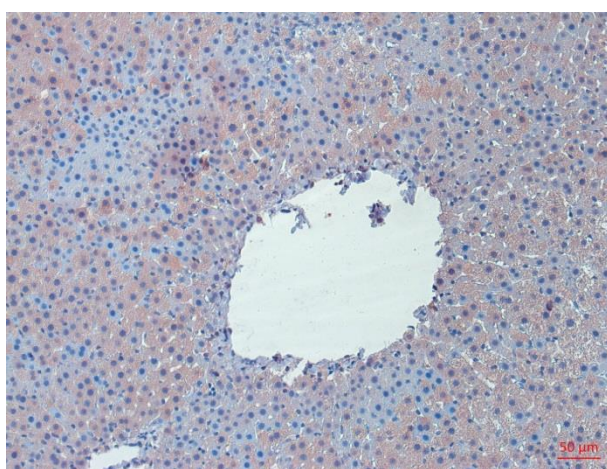


Рис. 2. Печень крысы. 2 недели отмены медь-дефицитной диеты. Иммуногистохимическая реакция с антителами к глюкагону: продукт реакции красного цвета, докраска гематоксилином. Ув. x200

Через 6 и 8 недель перехода на сбалансированный корм в поджелудочной железе позитивное окрашивание антителами к глюкагону выявлялось только по периферии островков. В печени на 4 и 6 неделях перехода на стандартный рацион питания количество позитивных клеток существенно уменьшилось, окрашенные клетки располагались перицентрально.

При окрашивании поджелудочной железы антителами против инсулина наблюдали позитивное окрашивание клеток в центральной части островков в течение всего эксперимента (Рис. 3).

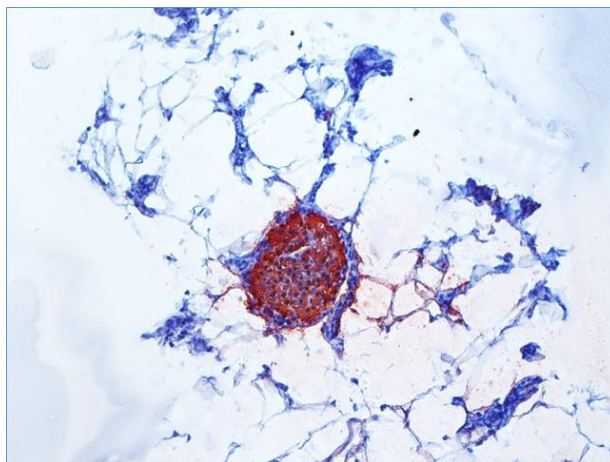


Рис. 3. Поджелудочная железа крысы. 4 недели отмены медь-дефицитной диеты. Иммуногистохимическая реакция с антителами к инсулину: продукт реакции красного цвета, докраска гематоксилином. Ув. x200

С 4 по 6 недели диеты в паренхиме печени и периферически обнаруживали инсулин-позитивные гепатоцит-подобные клетки, с максимальным количеством клеток на 6 неделе эксперимента (Рис. 4). На сроках 4-8 недель медь-дефицитной диеты выявлялись инсулин-позитивные овальной формы клетки вокруг центральных вен, с наибольшим количеством клеток на 8 неделе диеты.

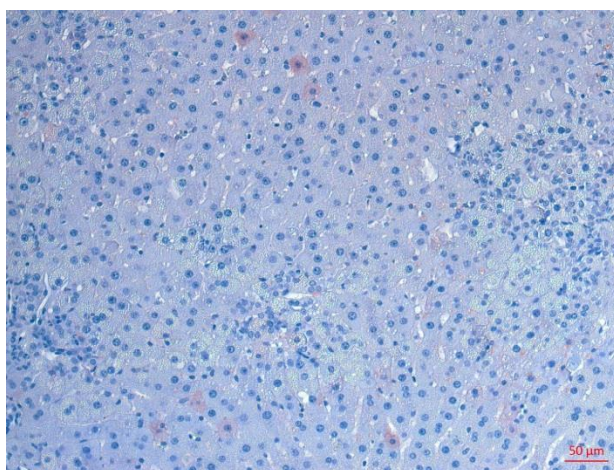


Рис. 4. Печень крысы. 6 недель медь-дефицитной диеты. Иммуногистохимическая реакция с антителами к инсулину: продукт реакции красного цвета, докраска гематоксилином. Ув. x200

Появление инсулина в гепатоцитах сопровождается повышением уровня инсулина в крови, причем пик экспрессии инсулина в печени совпадает с пиком инсулинемии на 6 неделе диеты.

На 2 неделе рационального питания крыс в печени обнаруживаются единичные инсулин-позитивные овальные клетки. На более поздних сроках позитивных клеток не выявлено.

Вывод. Глюкагон-позитивные клетки островков поджелудочной железы, возможно, являются источником регенеративного потенциала органа при медь-дефицитной диете. Появление глюкагон- и инсулин-позитивных клеток в печени может быть ответной реакцией на повреждение ткани поджелудочной железы, что объясняется наличием общего источника развития этих органов.

Список литературы:

1. Scarpelli D.G., Rao M.S. Differentiation of regenerating pancreatic cells into hepatocyte-like cells. PNAS USA. 1981; 78: 2577-81
2. M.S.Pao, R.S. Dwivedi, A.V. Yelandi et al. Role of periductal and ductular epithelial cells of the adult rat pancreas in pancreatic hepatocyte lineage. Am. J. Pathol. 1989; 143 (5): 1069-86

ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ

Хамидуллина Алина

МБОУ лицей №116

научный руководитель – Хайруллина Г. Х.

Введение. В экспериментальных условиях доказана техническая возможность трансплантации почти всех органов и тканей. А уже в 2017 году пройдет первая в мире операция по пересадке головы, что не оставила меня без интереса.

Создание трансплантологии стало одним из величайших научно-технических достижений последней трети XX в. Вместе с тем пересадка органов и тканей от одного человека порождает немало сложнейших этических и правовых проблем. Главной причиной большинства таких проблем является острая нехватка донорских органов. В мире проводится ежегодно около 70 тыс. пересадок цельных органов (из них 50 тыс. — почки) и миллионы пересадок тканей; тем не менее спрос на донорские органы и ткани значительно превышает предложение.

В нашей стране в трансплантации органов нуждаются тысячи людей, но в год в России проводится не более 1,5 тысяч таких операций. В трансплантации нуждаются и взрослые и дети, простые обычные люди, которые живут рядом с нами. Многие кому нужна операция по пересадке органов умирают, так и не дождавшись ее. Еще одна из причин такого низкого количества операций является отрицательное отношение общества к трансплантации.

Цель работы изучить особенности трансплантации органов у человека, а особенно пересадка головы.

Пять проблем, с которыми придется столкнуться при пересадке головы человека.

Прежде чем можно будет успешно пересадить голову, от одного человека другому, должны быть решены пять различных комплекса проблем.

1) Голова не может оставаться живой сама по себе.

Решение этой проблемы - использование искусственных нагнетателей крови, похожих на аппарат искусственного поддержания жизни.

2) Иммунную систему надо убедить принять чужеродную голову.

Решение проблемы - использование иммуно-супрессоров, лекарств подавляющих иммунную систему. Обязательным остается проведение массивной иммуносупрессии – введение препаратов, подавляющих иммунитет, для блокирования реакции отторжения трансплантата. Поскольку при этом резко возрастает чувствительность пациента к любым инфекциям, он может быть временно помещен в полностью стерильный бокс и переведен на питание простерилизованными продуктами. Сегодня используются современные иммуно-супрессоры, которые действуют целенаправленно на ту область организма, куда был пересажен орган.

3) Операция должна пройти меньше чем за час.

Для того чтобы все действия были организованы правильно хирурги проводят репетиции предстоящей операции.

4) Спинной мозг довольно сложно соединить - этого раньше еще не делали.

Для того чтобы избежать последствий искусственной комы, пациенту будут вводиться антибиотики и тромболитические препараты.

5) Процедура должна пройти успешно у животных, перед тем как провести ее на людях.

Пока нет доказательств того, что это скоро произойдет, то есть, возможно, такого рода операции можно ожидать только через несколько десятилетий.

Теперь, когда мы рассмотрели все проблемы и трудности связанные с трансплантацией головы, можно проследить, как осуществляется его пересадка.

Идея Канаверо заключается в том, что голову живого человека, чья нервно- или нейромышечная система организма оказалась парализована или повреждена, пересадить на здоровое тело неживого человека.

На сегодняшний день известны подробности операции. Голову пациента и донорское тело охлаждают до 15°C — такая мера необходима для сохранения тканей организма в условиях отсутствия кислорода. Спинальный мозг иссекают специальным образом и «срастят» особым материалом — полиэтиленгликолем — это вещество должно вызвать бурный рост нервных окончаний. На полиэтиленгликоль собственного производства Серхио Канаверо возлагает особые надежды. Параллельно будут сшиты кровеносные сосуды и мышцы, скрепят позвоночник — головы и тела. Риск на всех этапах операции крайне велик.

После операции Валерия Спиридонова поместят искусственно в кому, не приводя в сознание. Порядка 30 суток тело будет полностью обездвижено, в это время специальные электроды будут стимулировать спинной мозг нового человека.

Канаверо говорит, что все технологии, которые ему нужны, уже существуют, и оценивает, что процедура займет 36 часов и потребует помощи 150 медицинских работников. Он оценивает шансы на успех в 90% и еще в 90% — шансы на то, что пациент встанет и пойдет через несколько месяцев после операции.

Заключение. В данной работе была описана история трансплантации органов и особенности пересадки головы. Это актуальная и необходимая для человечества проблема занимает умы многих выдающихся учёных и до окончательного его решения пройдет ещё немало времени. Тем не менее, какая-то часть пути уже преодолена, уже приоткрыт занавес тайн человеческого организма, уже есть удачные попытки пересадки головы и различных органов, но их не так много как хотелось бы и, возможно, в будущем они приобретут более массовый характер.

Одним из самых интересных разделов трансплантологии является трансплантация мозга. Сегодня она находится в стадии эксперимента и изучена очень мало. Все опыты проводились, пока что, только на животных, но, судя по удачным результатам, можно предположить, что эту методика, в ближайшем будущем, будет применяться на людях. На сегодняшний день не произведено не одной подобной операции.

Мы знаем, что пересадка головы-наисложнейшая операция, успеха в которой помогут добиться достижения современной науки и регенеративной медицины.