

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**Оценка экспрессии мРНК VEGF и FGF в седалищном
нерве крысы при локальном введении плазмидной
конструкции pBud-VEGF-FGF2**

Работа завершена:

"05" 06 2019 г. ЖН (Зейналова А.К.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
доктор биологических наук,

профессор, доцент кафедры генетики

"06" 06 2019 г. А.А.Ризванов (Ризванов А.А.)

Заведующий кафедрой
доктор биологических наук

"07" 06 2019 г. В.М.Чернов (Чернов В.М.)

Казань-2019

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Повреждения периферической нервной системы.....	9
1.2 Морфологические изменения при повреждениях периферических нервов	10
1.2.1 Строение периферической нервной системы.....	10
1.2.2 Проксимальный участок от места повреждения и тела нейронов	10
1.2.3 Дистальный участок от места повреждения.....	12
1.2.4 Посттравматическая регенерация периферической нервной системы.....	12
1.3 Связь регенерации нерва и ангиогенеза	14
1.4 Участие факторов роста VEGF-A и FGF2 в посттравматической регенерации периферических нервов	17
1.4.1 Фактор роста эндотелия сосудов	18
1.4.2 Фактор роста фибробластов	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	21
2.1 Эксперименты на животных	21
2.2 Введение плазмида и забор материала	21
2.3 Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).....	22
2.4 Оценка морфологии седалищного нерва.....	24
2.5 Иммуногистохимический анализ.....	24
2.6 Статистическая обработка результатов.....	25
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ	26
3.1 Оценка транскрипционной активности.....	26
3.2 Морфология нерва.....	28
3.3 Иммуногистохимический анализ.....	30

3.3.1 VEGF-A.....	30
3.3.2 FGF2	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	34
ВЫВОДЫ	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	36

ВВЕДЕНИЕ

Регенерация периферической нервной системы (ПНС) – комплексный процесс, опосредуемый активацией клеток различного происхождения, которые проходят дифференцировку для обеспечения успешной регенерации. Критически важное значение для восстановления ПНС имеют иммунная и кровеносная системы организма и строма самого нерва. Они обеспечивают плотный каркас для поддержания структуры нерва и его защиты, оксигенацию, клиренс клеточного детрита, поступление необходимых химических факторов и помочь в направленном росте новых аксонов [Caillaud *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017]. Тем не менее конкретные процессы, происходящие при участии этих систем слабо описаны. Считается, что реваскуляризация является ключевым фактором восстановления тканей во многих других органах [Ferretti *et al.*, 2003]. Однако мало что известно о роли этого процесса в восстановлении именно ПНС.

Повреждение ПНС приводит к развитию периферических нейропатий различных степеней тяжести. На сегодняшний день периферические нейропатии довольно распространены, что связано с физиологическим расположением периферических нервов, часто подвергающихся травматизации вследствие дорожно-транспортных происшествий, бытовых и спортивных травм. Немалую долю периферических нейропатий вызывают системные заболевания периферических нервов, вызывающих серьезные деструктивные изменения с ярко выраженным болевым синдромом, существенно снижающие качество жизни пациентов. В связи с этим существует множество исследований, посвящённых изучению патофизиологии структурно повреждённых периферических нервов и механизмов, участвующих в спонтанной регенерации. Несмотря на большое количество научных работ, сведения о молекулярных механизмах патологических процессов часто оказываются неполными или противоречивыми [Valat *et al.*, 2010; Geyik *et al.*, 2016; Tracy, Dyck, 2010; Lehmann *et al.*, 2019].

В то же время, несмотря на большое количество пациентов с патологическими процессами в периферических нервах, не существует лечения, которое было бы универсальным, значительно улучшающим результаты посттравматической

регенерации. Терапия травматически поврежденных периферических нервов, в большинстве случаев, связана с хирургическим восстановлением целостности поврежденного нерва, при этом, при наличии дефекта, непозволяющего сопоставить концы нерва без натяжения, требуется заместительная хирургическая процедура по имплантации аутотрансплантата с использованием сегмента нерва из донорского участка [Berger, Millesi, 1978; Manske *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019]. Другим возможным методом восстановления структуры нерва, в случае наличия диастаза между концами нерва, является имплантация трубчатой реконструкции с использованием биологических и/или синтетических материалов (кремний, поли- ϵ -капролактон, хитозан) [Stöbel *et al.*, 2018; Johansson, Dahlin, 2014; Reid *et al.*, 2013; Haastert-Talini *et al.*, 2013]. Высокий процент травматизации периферических нервов обусловил наличие большого количества экспериментальных исследований на лабораторных животных с воспроизведением клинических моделей травм и различными способами стимуляции посттравматической регенерации [Masgutov *et al.*, 2019; Cavanaugh *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2019; Lackington *et al.*, 2019; Schilling *et al.*, 2019]. Наиболее актуальными, на сегодняшний день, считаются способы стимуляции посттравматической регенерации с помощью генной и клеточной терапии, применяемые как сочетанно, так и обособленно друг от друга и оказывающими внушительный терапевтический эффект [Busuttil *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2017; Dang *et al.*, 2019].

Также развитие научных исследований последних десятилетий позволило существенно расширить возможности стволовых клеток путем придания им дополнительных свойств методами генетической модификации. Модифицированные с помощью трансфекции стволовые клетки, исследуют в качестве эффективных транспортеров терапевтических белков при тканеинженерной заместительной терапии [McGinley *et al.*, 2011; Payne *et al.*, 2012; Treacy *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Sullivan *et al.*, 2016]. Однако и самостоятельное применение белковых молекул терапевтических генов в качестве стимуляторов регенерации широко распространено, несмотря на их быстрый

распад *in vivo* [Giannaccini *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2018]. При этом данные о терапевтических свойствах белковых молекул, транспортируемых к области травмы с помощью вирусных и невирусных конструкций весьма противоречивы. Ряд авторов описывают побочные эффекты из-за иммунных реакций организма, в результате ошибочной генетической модификации клеток других тканей, не являющихся мишениями для генной терапии, и некорректного выбора генетического вектора [Bessis *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2008]. Другие авторы описывают значительный терапевтический эффект в случае прямого введения генов в вирусном векторе [Park J.S. *et al.*, 2013].

Применительно к периферической нервной системе, наиболее часто в литературе описывают различные генетические векторы, кодирующие факторы роста, характерные для сосудов и фибробластов, а именно, белки семейств VEGF и FGF [Boldyreva *et al.*, 2018; Zor *et al.*, 2014; de Winter *et al.*, 2013; Allodi *et al.*, 2014]

VEGF-A и FGF2 являются мощными ангиогенными факторами, они синтезируются различными клетками во всём организме и активно используются для устранения гипоксии и ускорения регенерации различных тканей. На сегодняшний день есть несколько исследований, посвящённых действию этих факторов на повреждённые периферические нервы по отдельности. Все они имеют положительные результаты и показали, что применения VEGF-A и FGF2 при нейропатиях являются перспективными [Fukuda *et al.*, 2018; Kaneko *et al.*, 2018; Xia и Lv, 2018]. Данные ростовые факторы синтезируются одними типами клеток и часто делят одни и те же пути регуляции. Эти свойства обусловили научный интерес сочетанного применения данных факторов в составе генетической плазмидной конструкции при травматических повреждениях в периферической нервной системе [Masgutov *et al.*, 2019; Николаев с соавт., 2013].

Показано, что экспрессия генов, кодирующих VEGF-A и FGF2, повышается после повреждения в нейронах, фибробластах стромы, шванновских клетках, эндотелиальных клетках сосудов и активированных иммунных клетках [Cattin *et al.*, 2015; Ornitz, Itoh, 2001]. Кроме того, известно, что введение данных факторов

ростов в качестве стимуляторов посттравматической регенерации оказывает выраженный терапевтический эффект. Однако, в литературе нет данных о экспрессии собственных и трансплантированных генов VEGF-A и FGF2 при введении генетической конструкции в седалищный нерв в нативных условиях. Это делает невозможным полное обособление эффектов, обусловленных именно действием геннотерапевтического препарата, так как при сопоставлении концов повреждённого нерва регенерация аксонов происходит спонтанно.

Таким образом, **целью** работы было провести оценку экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные человеческие VEGF-A и FGF2, в составе плазмида при локальном введении в интактный крысиный нерв и определить наличие действия соответствующих белков на морфологию и структуру седалищного нерва.

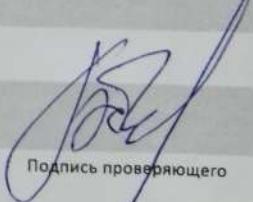
В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить экспрессию генов, входящих в состав исследуемой плазмида, и соответствующих крысиных генов;
2. Определить наличие транспорта транскриптов;
3. Оценить морфологию нерва после применения плазмида и определить наличие и расположение в ткани VEGF и FGF.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Зейналова Алина Казымовна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	BKP Зейналова Алина антиплагиат.docx
Название файла	BKP Зейналова Алина антиплагиат.docx
Процент заимствования	2,99%
Процент цитирования	0,59%
Процент оригинальности	96,42%
Дата проверки	09:57:19 03 июня 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего	
Дата подписи	03.06.19
	 Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.