

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДЫ КОДИРУЮЩЕЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ
ГЕНЫ VEGF И FGF2 НА ПОСТТРАВМАТИЧЕСКУЮ
РЕГЕНЕРАЦИЮ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ

Работа завершена:

«2» июня 2017 г. [подпись] (Муллахметова А. Ф.)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

д.б.н., доцент

«2» июня 2017 г. [подпись] (Ризванов А.А.)

н.с., к.б.н.

«2» июня 2017 г. [подпись] (Масгутова Г.А.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«2» июня 2017 г. [подпись] (Чернов В.М.)

Казань – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Морфология седалищного нерва и спинального ганглия L5 крысы в норме и при патологии	7
1.1.1 Строение седалищного нерва крысы	7
1.1.2 Патоморфология поврежденного седалищного нерва	9
1.1.3 Реакция нейронов спинального ганглия L5 при повреждении седалищного нерва	11
1.2 Терапевтические гены как стратегия стимулирования посттравматической регенерации	12
1.2.1 Генно-клеточная терапия	12
1.2.2 Терапевтические гены	13
1.3 Семейство генов VEGF и FGF2 и их роль в посттравматических процессах	14
1.3.1 Семейство генов VEGF	14
1.3.2 Роль VEGF в посттравматических процессах	15
1.3.3 Семейство FGF2	16
1.3.4 Участие FGF2 в посттравматической процессах	18
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	18
2.1 Методы работы с генетическими конструкциями	18
2.2 Экспериментальная модель перерезки седалищного нерва	18
2.3 Метод оценки восстановления кровотока в области травмы	19
2.4 Гистологические методы исследования	20
2.4.1 Заливка в спинальных ганглиев в парафин	20
2.4.2 Заливка седалищного нерва в смолу для подсчета количества миелиновых волокон	21
2.5 Функциональный индекс седалищного нерва (ФИСН)	22
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ	25
3.1 Оценка восстановления двигательной функции конечности	25
3.2 Оценка восстановления кровотока в дистальном отрезке нерва	26
3.3 Оценка выживания нейронов спинального ганглия L5	27
3.4 Оценка количества миелиновых волокон седалищного нерва после его перерезки и введения плазмиды	30
ВЫВОДЫ	34
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	35

ВВЕДЕНИЕ

Лечение повреждений периферических нервов является актуальной задачей медицины. Ежегодно в мире проводят более двух миллионов реконструктивных операций с целью восстановления нервных стволов (Sharon, Fishfeld, 2002). Несмотря на широкое применение различных подходов и методов лечения, отсутствует ощутимый прогресс в данной области и сохраняется проблема высокой степени инвалидизации больных (Lee, Wolfe, 2000), по причине гибели чувствительных нейронов спинального ганглия, денервации нервных проводников и атрофии мышц. Терапевтические стратегии стимулирования регенерации периферического нерва после его повреждения получили широкое внимание в клинических исследованиях. Достижения в области фундаментальных исследований в последние годы увеличили понимание анатомии периферических нервов и важность микроокружения. Были разработаны новые методы вмешательства, но с разной эффективностью [Liu, 2015].

Восстановление функций нейронов, при их сохранности после травмы периферических нервов, требует целого ряда внутренних и внешних факторов [Bosse, 2012]. Способ восстановления целостности периферического нерва зависит от особенности повреждения. На сегодняшний день можно выделить несколько видов реконструктивного лечения, такие как сопоставление и сшивание культей пересеченного нерва, использование аутонервной вставки, при отсутствии возможности сопоставить культи нервов без натяжения, а также использование кондуитов, представляющие собой тубулированные структуры для формирования пути прорастающим аксонам. Однако, несмотря на сложные реконструктивные операционные вмешательства, как правило, после травмы, происходит лишь частичное восстановление функции иннервируемой конечности [Lee, 2000]. Ввиду чего наиболее актуальным представляется поиск способов стимуляции регенерации в нервной системе, направленный на поддержание выживания чувствительных нейронов спинального ганглия и восстановления структуры

и функции поврежденного нерва. Наряду с совершенствованием хирургической техники, для достижения успешной нейрорегенерации и более полного восстановления функции предпринят активный поиск эффективных терапевтических стратегий. На сегодняшний день для регенеративной медицины, в частности, для стимулирования нейрорегенерации, наиболее перспективными считаются технологии с применением тканевой инженерии и генно-клеточных подходов направленных на локальную доставку в область повреждения комбинации терапевтических генов нейротрофических и ангиогенных факторов.

Генная терапия - это лечение наследственных, системных, инфекционных и других видов заболеваний с помощью введения генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций [Kwong, 1997].

Генная терапия *in vivo* включает:

- 1) Перенос рекомбинантных терапевтических генов с помощью вирусов: ретровирусов, аденовирусов или адено-ассоциированных вирусов;
- 2) Перенос рекомбинантных терапевтических нуклеиновых кислот с помощью липосом;
- 3) Доставка рекомбинантных генов с помощью плазмидных векторов.

Использование различных нейротрофических и ангиогенных факторов для стимуляции посттравматической регенерации поврежденных нервных волокон считается перспективным направлением во многих странах мира.

С этой целью активно изучаются всевозможные факторы роста направленно действующие на восстановление структуры и васкуляризации органа в целом. Наиболее перспективным способом доставки терапевтических генов являются вектора доставки терапевтических генов - плазмиды, не интегрирующиеся в геном, не обладающие иммуногенными свойствами, обладающие достаточной емкостью и стабильностью [Stoll, *et al.*, 2002]. Среди многочисленных факторов роста перспективным для

стимуляции посттравматической регенерации поврежденных нервных волокон представляется использование ростовых факторов, таких как VEGF и FGF-2 [Guaiquil, 2014]. Для решения проблемы восстановления функции поврежденной конечности совместное использование двухкасетной плазмиды из двух факторов экспрессирующих терапевтические гены сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF2) может оказать более выраженный терапевтический эффект.

Целью работы было оценить влияние двухкасетной плазмиды кодирующей терапевтические гены VEGF и FGF2 на посттравматическую регенерацию седалищного нерва крыс после его пересечения.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

- 1) Смоделировать пересечение седалищного нерва у лабораторных крыс с последующим введением плазмидного препарата кодирующего терапевтические гены VEGF и FGF2.
- 2) Оценить влияние терапевтических генов VEGF и FGF2 на посттравматическую регенерацию седалищного нерва крысы, путем оценки васкуляризации и определения количества миелиновых волокон в дистальном отрезке нерва через 60 суток после перерезки.
- 3) Оценить выживание чувствительных нейронов спинального ганглия L5 в условиях перерезки седалищного нерва и стимуляции регенерации с помощью терапевтических генов VEGF и FGF2.