

- duced changes in the human proteome // *Expert. Rev. Proteomics*. 2017. Vol. 14(1). P. 15–29.
10. *Otsuka K., Cornelissen G., Furukawa S., Kubo Y., Hayashi M., Shibata K., Mizuno K., Aiba T., Ohshima H., Mukai C.* Long-term exposure to space's microgravity alters the time structure of heart rate variability of astronauts // *Heliyon*. 2016. Vol. 2(12). P. e00211.
 11. *Peters A.* The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system // *Front. Neuroanat*. 2009. Vol. 3(11). P. 459–466.
 12. *Petersen N., Lambrecht G., Scott J., Hirsch N., Stokes M., Mester J.* Postflight reconditioning for European Astronauts – A case report of recovery after six months in space // *Musculoskelet. Sci. Pract.* 2017. Vol. 27. P. 23–31.
 13. *Shenkman B. S.* From slow to fast: hypogravity-induced remodeling of muscle fiber myosin phenotype // *Acta. Naturae*. 2016. Vol. 8(4). P. 47–59.
 14. *Shepherd M. N., Pomicter A. D., Velazco C. S., Henderson S. C., Dupree J. L.* Paranodal reorganization results in the depletion of transverse bands in the aged central nervous system // *Neurobiol. Aging*. 2012. Vol. 33(1). P. 203.e13–203.e24.
 15. *Sultemeier D. R., Choy K. R., Schweizer F. E., Hoffman L. F.* Spaceflight-induced synaptic modifications within hair cells of the mammalian utricle // *J. Neurophysiol.* 2017. Vol. 117(6). P. 2163–2178.
 16. *Sugiyama I., Tanaka K., Akita M., Yoshida K., Kawase T., Asou H.* Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old-rats // *J. Neurosci. Res.* 2002. Vol. 70(3). P. 309–317.
 17. *Xie F., Liang P., Fu H., Zhang J. C., Chen J.* Effects of normal aging on myelin sheath ultrastructures in the somatic sensorimotor system of rats // *Mol. Med. Rep.* 2014. Vol. 10(1). P. 459–466.

Шаймарданова Г. Ф.

СТИМУЛИРОВАНИЕ НЕЙРОРЕГЕНЕРАЦИИ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ТРАНСГЕНАМИ VEGF, FGF2, GDNF ПРИ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЕ

*Лаборатория молекулярных основ патогенеза (заведующий – проф. В. М. Чернов)
Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
e-mail: gulnara_kzn@rambler.ru*

Генно-клеточная терапия экспериментальной контузионной травмы спинного мозга (КТСМ) дает неоднозначные результаты. Подходы, направленные на суперэкспрессию определенных генов факторов роста, демонстрируют положительное влияние на нейрорегенерацию, не достигая, однако, полного восстановления функций. Причины ограниченной эффективности генной терапии до конца не выяснены.

Среди экспериментальных подходов стимулирования нейрорегенерации одно из ведущих мест занимает трансплантация соматических и стволовых клеток. Положительная роль трансплантируемых клеток лишь отчасти обусловлена воз-

можностью замещения поврежденных компонентов нервной ткани. Не менее важной является их способность мигрировать в область повреждения и выделять целый ряд факторов, способствующих регенерации нервной ткани и активации эндогенных стволовых клеток. С целью усиления экспрессии ограниченного числа факторов применяется модификация генного аппарата трансплантируемых клеток. Идет активный поиск факторов и их сочетаний, оказывающих наиболее выраженный комплексный эффект, включающий поддержание целостности сосудистой сети и глиального матрикса, сдерживание апоптоза, ремиелинизацию и стимуляцию роста нейронов. Исследования выявили специфичность получаемых результатов, зависящую от типа трансплантируемых клеток [8], природы экспрессируемых факторов и способа доставки модифицирующих генов в область поражения [5, 6].

Цель работы: на модели контузионной травмы оценить влияние на посттравматическую регенерацию спинного мозга крысы генов фактора роста фибробластов (FGF2), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165) и глиального нейротрофического фактора (GDNF) при различных способах их доставки: посредством плазмидного и вирусного векторов либо генетически модифицированных клеток крови пуповины человека (ККП).

Методы исследования. Эксперименты выполнены на половозрелых лабораторных крысах, самках и самцах. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. КТСМ наносили после ламинэктомии на уровне T8–T9 с помощью вертикально падающего с высоты 2,5 см стержня весом 10 г, под наркозом хлоралгидрата внутривентриально (Sigma) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г).

Получение рекомбинантных аденовирусов Ad5-GDNF и Ad5-EGFP, плазмид pBud-VEGF-FGF2, pBud-EGFP, выделение моноклеарной фракции ККП и их модификацию осуществляли, как описано в [2, 7]. ККП, плазмиду и аденовирус вводили тотчас после травмы в две точки [1, 4]. Через 30 суток после нанесения травмы животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 4 %-ным раствором параформальдегида (4 °C). Фрагмент спинного мозга, включающий зону повреждения, вместе с позвонками помещали в параформальдегид, дофиксировали в 2,5 %-ном глutarовом альдегиде и 1 %-ном растворе OsO₄ на фосфатном буфере с добавлением сахарозы и заливали в Epon 812 (Fluka). Полутонкие поперечные срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB-III. Морфометрические измерения и подсчет изучаемых параметров проводили на полутонких поперечных срезах, окрашенных толуидиновым синим [3].

Просмотр препаратов и оцифровку изображений проводили на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss). Измерение площади полостей на цифровых изображениях проводили с помощью программы Image Tools. Результаты морфометрии обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, ANOVA, программа OriginPro.

Результаты. Варианты генно-клеточной терапии, из числа исследованных нами, неравнозначны по своему сдерживающему влиянию на развитие деструкции ткани спинного мозга. Так, площадь сохраненного вещества к исходу первого месяца после

травмы оказалась наибольшей в условиях инъекции плазмиды с генами факторов VEGF и FGF2. Немного уступает ей по эффективности инъекция аденовируса с геном глиального нейротрофического фактора, как и трансплантация ККП, трансдуцированных этим же вирусом. Клеточно-опосредованные способы введения генов терапевтических факторов, как и чисто клеточная терапия, дали менее выраженный результат (табл. 1). Таким образом, неспецифическая модификация генного аппарата тканей спинного мозга, имеющая место при прямой инъекции указанных векторов, более эффективна в отношении сдерживания воспалительной деструкции ткани, чем опосредованное воздействие генно-модифицированными ККП.

Таблица 1

ПЛОЩАДЬ СОХРАННОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Ген / вектор (усл. обозначения в тексте)	Площадь сохранной ткани СМ, мм ²
ККП	1,0 ± 0,4
ККП + pBud-VEGF-FGF2	2,55 ± 0,1*
pBud-VEGF-FGF2	5,0 ± 0,4**
ККП-Adv-GDNF	3,39 ± 0,2*
Adv-GDNF	2,8 ± 0,2*

1) на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы;

2) * p < 0,05; ** p < 0,005.

Дегенерация нервных волокон в посттравматический период приводит к появлению большого числа мелких полостей. Сравнение двух вариантов прямой генной терапии – инъекции плазмиды pBud-VEGF-FGF2 и инъекции аденовируса с геном GDNF показало, что оба способа содействуют значительному уменьшению суммарной площади патологических полостей, однако каких-либо существенных преимуществ одного перед другим выявить не удалось. Ближе к эпицентру травмы, на расстоянии 3 мм в ростральном направлении, этот показатель несколько больше в опыте с введением Adv-GDNF, чем в опыте с плазмидой pBud-VEGF-FGF2. В то же время трансплантация в зону травмы клеток крови пуповины, трансдуцированных этим же вирусом Adv-GDNF, дала существенно (в 1,5 раза) более слабый положительный эффект по сравнению с непосредственным введением вируса.

Важным параметром, характеризующим поддерживающий и регенеративный потенциал применяемой терапии, является количество миелиновых волокон. Сопоставление применяемых нами способов терапии по этому параметру показало совершенно иную картину распределения результатов. Хотя положительный эффект достигался во всех опытах, однако минимальное превышение над контролем выявлено при непосредственном введении аденовируса Adv-GDNF и плазмиды pBud-VEGF-FGF2 в следующих соотношениях:

– на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы в вентро-медиальной части переднего канатика справа и слева в ростральном направлении на 42 % и 38 %, в каудальном направлении – на 28 % и 30 %, в боковых канатиках в среднем в 2 раза как в ростральном, так и в каудальном направлениях;

– на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы в вентро-медиальной части переднего канатика справа и слева в ростральном фрагменте на 35 %, каудальном – на 30 %; в ростральном фрагменте боковых канатиков на 48 %, в каудальном – на 46 %.

Число миелиновых волокон при введении тех же плазмиды и вируса в составе ККП оказалось в 3–4 раза больше. Вероятно, поддерживающий миелинизацию эффект обусловлен трофическим действием трансплантируемых клеток, поскольку трансплантация даже интактных ККП обеспечивала почти двукратный рост числа миелиновых волокон.

Таким образом, введение генов *vegf*, *fgf2*, *gdnf* посредством плазмидного или вирусного векторов эффективно сдерживает деструкцию тканей спинного мозга и дегенерацию аксонов в посттравматический период. Применение клеток крови пуповины, генетически модифицированных этими же векторами, положительно влияет на миелинизацию и ограничивает дегенерацию нервных волокон. Результаты исследования указывают на важность правильного выбора клеток-мишеней при генной терапии путем сочетанного применения различных способов доставки векторов и с учетом специфики действия экспрессируемых факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мухамедшина Я. О., Шаймарданова Г. Ф., Салафутдинов И. И., Ризванов А. А., Повышева Т. В., Масгутова Г. А., Нигметзянова М. В., Чельшев Ю. А. Доставка рекомбинантного аденовируса с клонированным геном GDNF в область травмы спинного мозга при помощи клеток крови пуповины человека стимулирует восстановление двигательной функции и поддерживает популяцию глиальных клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 3. С. 129–132.
2. Черенкова Е. Е., Федотова В. Ю., Борисов М. А., Исламов Р. Р., Ризванов А. А. Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway // КТТИ. 2012. Т. 7, № 3. С. 164–168.
3. Шаймарданова Г. Ф., Мухамедшина Я. О., Архипова С. С., Салафутдинов И. И., Ризванов А. А., Чельшев Ю. А. Посттравматические изменения структуры спинного мозга крысы при трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных генами *vegf* и *fgf2* // Морфология. 2011. № 6. С. 36–42.
4. Шаймарданова Г. Ф., Мухамедшина Я. О., Ризванов А. А., Салафутдинов И. И., Чельшев Ю. А. Эффект трансплантации в область травматического повреждения спинного мозга крысы мононуклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующих рекомбинантные гены VEGF и FGF2 // Морфология. 2012. Т. 142, № 4. С. 31–36.
5. Franz S., Weidner N., Blesch A. Gene therapy approaches to enhancing plasticity and regeneration after spinal cord injury // Experimental Neurology. 2012. Vol. 235. P. 62–69.

6. Jain K. K. Regenerative Therapy for Central Nervous System Trauma / In: Steinhoff G. (eds) Regenerative Medicine – from Protocol to Patient. Springer, Cham, 2016.
7. Rizyanov A. A., Guseva D. S., Salafutdinov I. I., Kudryashova N. V., Bashirov F. V., Kiyasov A. P., Yalvaç M. E., Gazizov I. M., Kaligin M. S., Sahin F., Mukhamedyarov M. A., Palotás A., Islamov R. R. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice // Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 236. P. 91–98.
8. Wagih A., Elhawary S., Ellessy R. M., Esam B., Tarek I., Aamer M. Stem Cells for Neuro-regeneration: State of the Art // Am. J. of Bioscience and Bioengineering. 2015. Vol. 3(4–1). P. 56–70.

*Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А.,
Барановский Ю. Г., Харченко С. В., Юнси Г. А.*

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ КООПЕРАЦИИ И КОЛЛАГЕНООБРАЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАЦИОННОМ ГИСТИОНЕ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАНЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ АУТО- И ГЕТЕРОФИБРОБЛАСТОВ И ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА

*Кафедра гистологии и эмбриологии (заведующая – проф. Е. Ю. Шаповалова)
Медицинской академии имени С. И. Георгиевского
ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского», Симферополь,
e-mail: Shapovalova_L@mail.ru*

Работами современных исследователей показано, что раневой процесс в тканях кожи включает в себя сменяющие друг друга по времени фазы, однако межклеточные и межтканевые корреляции в каждой фазе, в зависимости от повреждающего агента, изучены недостаточно [4]. Гистионы представляют собой динамические клеточные кооперации, состав которых закономерно изменяется в зависимости от фазы раневого процесса [5]. В период фазы регенерации клеточный состав регенерационного гистиона тоже меняется во времени, но сведения о его клеточном составе после дополнительного введения ключевых клеток данного гистиона – фибробластов – малочисленны и отрывочны [3, 6].

Цель исследования – проанализировать клеточную кооперацию регенерационного гистиона и коллагенообразования в биоптатах грануляционной ткани в модельной ишемизированной ране на 12-е сутки после введения ауто- и гетерофибробластов, а также после трансплантации дермального эквивалента с гетерофибробластами.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 28 белых половозрелых мышах линии C57/B1 в возрасте до 1 года. Животные были разделены на контрольную группу (7 особей) и три экспериментальные группы (по 7 особей в каждой). Эксперименты проводили со следованием всем принципам гуманности,