по клеточному составу: а) центральную — соединительнотканную; б) промежуточную — глио-соединительнотканную по обе стороны от центральной зоны; в) периферическую — глиозно-кистозную. Вокруг шовного материала сформировалась соединительнотканная капсула и клеточная инфильтрация ткани. При гистологическом исследовании седалищных нервов опытной конечности с применением SWNT в проксимальных частях обнаружены по 2–4 нервных пучка диаметром от 966,50±23,56 мкм до 365,00±35,00 мкм. В области шва сформировался глиальный рубец. В дистальных участках нервов опытных конечностей на гистологических срезах видны многочисленные нервные стволы диаметром от 183,00±17,00 мкм до 630,00±100,00 мкм. При электронной микроскопии обнаружены широкие прослойки из волокон между очагами активно пролиферирующих швановских клеток, частично дегранулированные тучные клетки, дистрофия миелина нервных волокон по типу «луковичной шелухи». В эпиневрии встречаются псевдокристаллы после элиминации шовного материала, макрофаги с псевдокристаллами после элиминации шовного материала и тканевым детритом.

Финансирование исследования: *Работа выполнена за счет бюджетного финансирования в соответствии с планом НИР, утвержденным МЗ СО в 2013–2016 гг.*

Новикова Е.А.[1], Сазонов С.В.[1,2], Бриллиант А.А.[2]

[1] *ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»*
[2] *ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»*
prof-ssazonov@yandex.ru

ЭКСПРЕССИЯ ЯДЕРНОГО ФЕРМЕНТА ТОПОИЗОМЕРАЗА II АЛЬФА И РАЗМЕР ПОПУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В модели карциномы молочной железы (КМЖ) изучалась взаимосвязь уровней экспрессии ядерного фермента топоизомеразы-II альфа, состояния пролиферативных процессов и размеров популяции опухолевых стволовых клеток в молекулярно-генетических подтипах карциномы молочной железы. Материалом для исследования послужили ткани опухоли 691 пациентки. Материал исследовался гистологическим, иммуногистохимическим и статистическими методами. При оценке достоверности различия среднего уровня экспрессии топоизомеразы-II альфа (TOP2A) установлено, что в подтипах люминального А, HER-2 позитивного, тройного негативного подтипа (ТН), среднее значение экспрессии достоверно отличается от значения всей выборки (Люминальный А — 6,74%: Т = 8,2 > Ткр (= 1,96, p<0,05), люминальный В (Her-2 негативный) — 19,27%: Т = 1,6<Ткр (1,96, p<0,05), люминальный В (Her-2 позитивный) — 19,46%: Т = 1<Ткр (1,96, p<0,05)), HER-2 позитивный подтип — 21,4%: Т = 2,2 > Ткр (= 1,96, p<0,05), ТН подтип -27,79%: Т = 6,7 > Ткр (1,96, p<0,05)). Полученные закономерности связаны с особенностью коэкспрессии Ki-67 иTOP2A. Ki-67 и TOP2A экспрессируются в одни и те же фазы клеточного цикла (G2, M), экспрессия TOP2A зависит от экспрессии Ki-67 ткани КМЖ. Высокие значения пролиферации и уровня экспресии TOP2A в HER-2 позитивном и ТН подтипах связаны с особенностью нарушения каскадных механизмов регуляции деления клетки. Внутриклеточные сигнальные пути Notch (активируются гены, регулирующие пролиферацию и апоптоз в клетках), Hedgehog (внутриклеточный путь эмбрионального развития, активирующий пролиферацию стволовых опухолевых клеток) и Wnt (внутриклеточный путь, регулирующий самообновление стволовых клеток и сохранение их в недифференцированном состоянии) участвуют в регуляции состояния пролиферативных процессов в тканях, физиологической и репаративной регенерации, играют ключевую роль во время эмбрионального развития тканей, а также причастны к увеличению количества стволовых опухолевых клеток (BCSC). Считается, что дисрегуляция путей Notch и Hedgehog приводит к появлению клеток с фенотипом BCSC. Обнаружено, что в большинстве случаев люминального А, люминального В и гормон-рецептор позитивного HER-2 позитивного подтипов КМЖ при достоверно более низких значениях пролиферации и экспрессии TOP2 не обнаружено опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH1A1 (фермент, появляющийся только в BCSC). При изучении гормон-рецептор негативного HER-2 позитивного и трижды негативного подтипов на фоне достоверного увеличения уровня пролиферации и экспрессии TOP2 в клетках опухоли выявлена экспрессия ALDH1A1 в 42% и 21% случаев КМЖ соответственно.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено в рамках НИР ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий.*

Гаранина Е.Е.[1], Гатина Д.З.[1], Мартынова Е.В.[1], Хайбуллина С.Ф.[2], Ризванов А.А.[1], Салафутдинов И.И.[1]

[1] *Казанский (Приволжский) федеральный университет*
[2] *Университет штата Невада*
sal.ilnur@gmail.com

ИЗМЕНЕНИЕ СЕКРЕТОМА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА НА ФОНЕ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

В последнее десятилетие показано, что мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека могут быть использованы при терапии широкого круга заболеваний. При этом известно, что МККП человека представляют собой неоднородную гетерогенную популяцию клеток, включающую в себя лимфоциты, моноциты, стволовые клетки и ряд других клеточных типов. МККП человека способны дифференцироваться в различные клеточные типы, а также секретировать широкий диапазон ростовых и трофических факторов. Согласно последним данным, именно факторы, секретируемые трансплантируемыми клетками обуславливают их терапевтическое воздействие за счет различных паракринных эффектов и активации естественных механизмов регенерации тканей. Кроме того, остается возможность in vitro дифференцировки трансплантируемых МККП в различные клетки организма за счет эффектов окружения и внутреннего клеточного потенциала. С целью повышения терапевтического эффекта трансплантируемых клеток предлагается их генетическая модификация различными генно-терапевтическими конструкциями. В данной работе мы прово-

дили оценку влияния трансдукции рекомбинантными аденовирусами на секрецию МККП человека цитокинов, хемокинов и факторов роста. С помощью градиентного центрифугирования из пуповинной крови человека были выделаны мононуклеарные клетки. Проведена трансдукция МККП человека аденовирусами, экспрессирующими ген сосудистого эндотелиального фактора роста человека (Ad5-VEGF) или усиленного зеленого флуоресцентного белка (Ad5-EGFP). Валидацию биосинтеза мРНК рекомбинантных генов VEGF и EGFP модифицированными МККП человека проводили с использованием ген специфических праймеров и проб TaqMan®. Анализ содержания 48 аналитов в кондиционной среде, собранной с генетически модифицированных клеток, осуществляли с применением наборов Bio-PlexPro™ HumanCytokine 21- и 27-plexAssay (BioRad) по технологии Luminex®xMAP. В ходе количественной ПЦР было установлено, что МККП, трансдуцированные Ad5-VEGF или Ad5-EGFP, повышают уровень экспрессии целевых генов в 1600 (VEGF) и 1000 (EGFP) раз, по сравнению с контролем (нативные клетки). При оценке секретомного профиля МККП было выявлено, что нативные клетки и клетки, трансдуцированные Ad-EGFP, имеют схожий профиль секреции анализируемых факторов. Клетки секретировали: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, Eotaxin, FGF-2, G-CSF,GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, PDGF-bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF, IL-1a, IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-16, IL-18, CTACK, GROa, HGF, IFN-a2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, b-NGF, SCF, SCGF-b, SDF-1a, TNF-b, TRAIL. В то же время, как и ожидалось, клетки, трансдцуированные Ad-VEGF, имели повышенный уровень секреции VEGF, а также IL-8, IL-12, FGF-2, GM-CSF, IP-10, IL-2Ra, IL-3, IL-16, IL-18, CTACK, GROa, IFN-a2, LIF, MCP-3, MIF, b-NGF, TRAIL по сравнению с контролями. Таким образом, мы предполагаем, что используя различные гены и их комбинации можно целенаправленно модулировать секретомный профиль клеток, задавая им необходимый терапевтический потенциал.

Финансирование исследования: *Данная работа выполнена при поддержке РФФИ 16-04-01567А.*

Салафутдинов И.И.[1], Журавлева М.Н.[1], Гаранина Е.Е.[1], Исламов Р.Р.[2], Масгутов Р.Ф.[3], Хайбуллина С.Ф.[4], Ризванов А.А.[1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2] Казанский государственный медицинский университет
[3] ГАУЗ «Республиканская клиническая больница»
[4] Университет штата Невада
sal.ilnur@gmail.com

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ VEGF И FGF2, НА СЕКРЕТОМ КЛЕТОК И ИНДУКЦИЮ АНГИОГЕНЕЗА

В последние годы в повседневную медицинскую практику активно внедряются передовые методы лечения широкого круга заболеваний человека с применением различных генно-инженерных систем. На данный момент официально зарегистрирован ряд гено-терапевтических препаратов, которые нашли применение в клинической практике. Среди них препараты на основе плазмидных конструкции могут рассматриваться как наиболее безопасные, простые в производстве и использовании. Нами на протяжении длительного времени проводятся работы по созданию тестированию, внедрению и оптимизации рекомбинантных двухкасетных плазмидных конструкций для стимуляции естественных процессов ангиогенеза и нейропротекции. В частности, нами созданы двухкассетные плазмидные вектора (pBud-VEGF165-FGF2) одновременно и независимо экспрессирующие два гена с выраженным приоангиогенным потенциалом: сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165) и основного фактора роста фибробластов человека (FGF2). В представленном исследовании, с использованием технологии Luminex®xMAP и набора Bio-PlexPro™ HumanCytokine 27-plexAssay (BioRad) было показано, что генетически модифицированные клетки линии HEK293 и стволовые клетки из жировой ткани (СКЖТ) человека, как и ожидалось, по сравнению с нативными клетками, сверх-экспрессируют VEGF и FGF2. Кроме того, имеют повышенный профиль секреции противовоспалительных цитокинов (IL-1ra, IL-10), провосполительных цитокинов (IL-12(p70), IFN-g, TNF-a), хемокинов (IL-8, IP-10, MCP-1) и факторов роста (GM-CSF, PDGF-bb). При моделировании ангиогенеза у крыс in vivo генетически модифицированные клетки в составе Матригеля (внеклеточный матрикс) на седьмой день после подкожного введения формировали зону с повышенной васкуляризацией по сравнению с контролем — нативными клетками. При этом была выявлена повышенная плотность сосудов окружающих тканей, развивающиеся сосуды имели более крупные размеры по сравнению с контролем. Кроме того, степень терапевтического воздействия рекомбинантной конструкции оценивали с помощью аппарата допплеровской лазерной диагностики EasyLDIMicrocirculationCamera на модели субкомпенсированного кровоснабжения при регенерации кожно-фасциального лоскута. Непосредственное введение плазмиды pBud-VEGF165-FGF2 по всей длине лоскута приводила к более ранней компенсации кровоснабжения, которая составила 55% по отношению к интактной коже. В то же время, в контрольной группе происходила декомпенсация микроциркуляции, составившая 10% по отношению к интактной коже. Таким образом, проведенные исследования позволяют говорить о том, что одновременная сверх-экспрессия клетками VEGF и FGF2 in vitro изменяет профиль секреции целого ряда цитокинов, хемокинов и факторов роста. Рекомбинантная плазмидная конструкция способна участвовать в индукции ангиогенеза и оказывать выраженное стимулирующее влияние на процессы васкуляризации декомпенсированного кожно-фасциального лоскута, что может быть использовано при лечении длительно незаживающих ран различного генеза.

Финансирование исследования: *Данная работа частично поддержана грантом РФФИ 16-04-01567.*