

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.832-001-089.843:611.018.5:599.323.4

Г. Ф. Шаймарданова¹, Я. О. Мухамедшина², А. А. Ризванов^{3, 4, 5}, И. И. Салафутдинов^{4, 5}
и Ю. А. Чельшев²

ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ОБЛАСТЬ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГЕНЫ *VEGF* И *FGF2*

¹ Лаборатория молекулярных основ патогенеза (зав. — проф. В. М. Чернов), Учреждение Российской академии наук «Казанский институт биохимии и биофизики», Казанский научный центр РАН; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. Ю. А. Чельшев), ³ центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — С. Р. Абдулхаков), Казанский государственный медицинский университет; ⁴ кафедра генетики (зав. — проф. Б. И. Барабанщиков), Казанский (Приволжский) федеральный университет; ⁵ ГУЗ «Республиканская клиническая больница» МЗ РТ, г. Казань

На модели дозированной контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне T_{VIII} исследовано влияние немедленной однократной трансплантации в область повреждения мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных рекомбинантными генами нейротрофических факторов — сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGF*) и фактора роста фибробластов 2 (*FGF2*). Животным другой группы в аналогичных условиях вводили те же клетки, трансфицированные плазмидой pEGFP-N2. Присутствие меченых EGFP клеток прослежено в белом веществе в течение 21 сут после трансплантации на расстоянии не менее 10 мм в ростральном и каудальном направлении от ближайшей точки введения. К 30-м суткам после трансплантации клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, площадь сохраненного серого вещества на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы увеличивается более чем на 60%. К этому сроку у животных этой группы в наружных зонах белого вещества на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы количество периваскулярных клеток, экспрессирующих бета рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β), возрастает в среднем на 30%. Доставка в область повреждения терапевтических генов *VEGF* и *FGF2* и их экспрессия в клеточных носителях стимулирует васкуляризацию и посттравматическую регенерацию спинного мозга.

Ключевые слова: спинной мозг, регенерация, клетки крови пуповины, *VEGF*, *FGF2*

Доставка в область повреждения терапевтических генов считается одним из перспективных направлений для стимулирования нейрорегенерации. С этой целью применяют дифференцированные, стволовые, индуцированные плюрипотентные стволовые и прогениторные клетки [1, 4, 13]. Достаточно перспективными представляются клетки крови пуповины, что связано с их низкой иммуногенностью, доступностью, простотой и безопасностью получения, способностью выдерживать длительное хранение. Эти клетки интенсивно исследуют как источник стволовых и прогениторных клеток для трансплантации при травмах и ишемии мозга, а также для лечения нейродегенеративных заболеваний [12, 15]. Исследования эффективности доставки генов нейротрофических факторов при помощи клеточных носителей

практически только начинаются. Для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга мы выбрали комбинацию генов сосудистого эндотелиального фактора роста (Vascular endothelial growth factor, *VEGF*) и фактора роста фибробластов основного (Fibroblast growth factor *FGF2*). Обе молекулярные детерминанты принадлежат к семейству нейротрофических факторов, а *VEGF* поддерживает неоваскуляризацию. Влияние данной комбинации генов на процессы нейрорегенерации не изучены. С этой целью нами впервые сконструирована двухкассетная плазида pBud-VEGF-FGF2, экспрессирующая одновременно оба гена [3]. Она использована для трансфекции мононуклеарных клеток крови пуповины человека [12]. Цель настоящей работы — на модели дозированной контузионной травмы спинного мозга

Сведения об авторах:

Шаймарданова Гульнара Фердинантовна (e-mail: gulnara_kzn@rambler.ru), лаборатория молекулярных основ патогенеза, Учреждение Российской академии наук «Казанский институт биохимии и биофизики» Казанский Научный Центр РАН, 420111 Казань, а/я 30

Мухамедшина Яна Олеговна (e-mail: Yanakazmedhist1@rambler.ru), Чельшев Юрий Александрович (e-mail: chelyshev-kzn@yandex.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Казанский государственный медицинский университет

Ризванов Альберт Анатольевич (e-mail: rizvanov@gmail.com), Салафутдинов Ильнур Ильдусович (e-mail: sal.ilnur@gmail.com), кафедра генетики, Казанский (Приволжский) федеральный университет

крысы изучить эффекты немедленного однократного введения в область повреждения мононуклеарных клеток крови пуповины человека, генетически модифицированных плазмидным вектором, экспрессирующим два рекомбинантных гена нейротрофических факторов человека VEGF и FGF2.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 25 белых лабораторных крысах, самках и самцах массой 200–250 г. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Казанском государственном медицинском университете и одобренным этическим комитетом. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Крыс наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (Sigma, США) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г). Животным проводили ламинэктомию на уровне T_{VIII}. Дозированную контузионную травму спинного мозга наносили по методу, описанному ранее [2]. Взятие крови пуповины человека и выделение мононуклеарной фракции клеток осуществляли по методу, также описанному ранее [12]. Выделенные клетки трансфицировали путем электропорации [12] плазмидами pBud-VEGF-FGF2 [3] для введения животным 1-й группы (n=7). Сразу после нанесения травмы трансфицированные клетки инъецировали по 1 млн в 5 мкл DPBS (фосфатно-

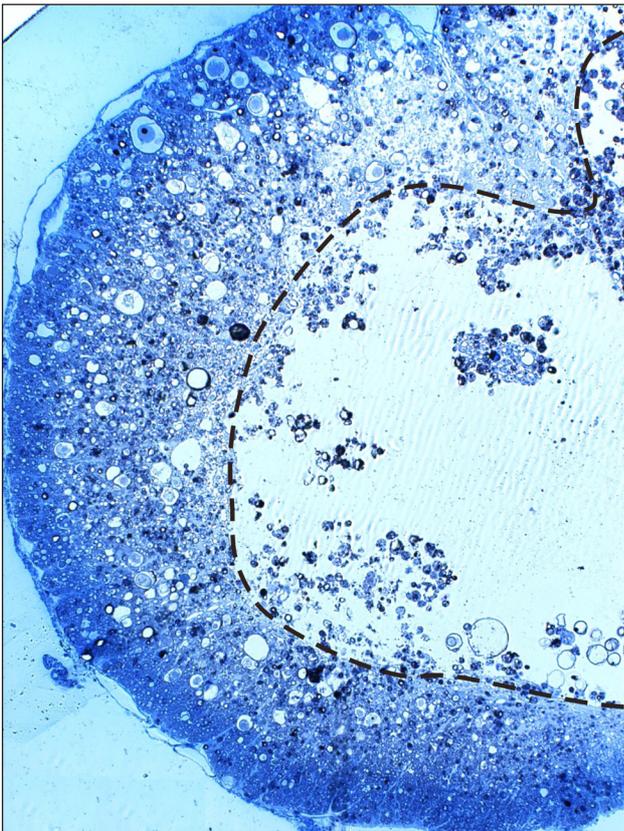


Рис. 1. Фрагмент спинного мозга крысы на расстоянии 3 мм от эпицентра через 30 сут после трансплантации в область контузионной травмы на уровне T_{VIII} мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой pBud-EGFP.

Штриховая линия — граница между центральной патологической полостью и зоной относительно сохранного белого вещества, способного к восстановлению. Ув. 40.

солевой буфер Дубленко, стерильный без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, БиолТ, Россия) в 2 точки на расстоянии 1 мм роstralнее и каудальнее эпицентра травмы и 0,5 мм латеральнее срединной линии при помощи гамльтоновского шприца (Sigma, США). Животным 2-й группы (n=18) в тех же условиях и в том же количестве вводили аналогичные клетки, трансфицированные плазмидой pBud-EGFP-N2 (Clontech, США), содержащей ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP). В течение 7 сут после операции всем животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) 1 раз в сутки. Животных 1-й группы через 30 сут, а крыс 2-й группы через 2, 4, 7, 14, 21 и 30 сут после нанесения травмы наркотизировали и транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4 °C). Фрагмент спинного мозга длиной 5 см брали вместе с позвонками. Через 12 ч от начала фиксации выделяли спинной мозг и разделяли его на 5 равных частей.

На криостатных поперечных срезах спинного мозга изучали выживание и миграционный потенциал клеток, трансфицированных плазмидой pBud-EGFP-N2. На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах приготовленных из материала, взятого через 30 сут после операции и залитого в эпон — аралдит, измеряли площадь сохранного серого и белого вещества на расстоянии 3 и 5 мм от эпицентра травмы в растральном и каудальном направлениях.

На криостатных поперечных срезах спинного мозга на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы периваскулярные клетки непрямым иммунопероксидазным методом выявляли с антителами к β-рецептору тромбоцитарного фактора роста (PDGFβR) (Sigma, США) в разведении 1:100. Количество PDGFβR⁺-клеток подсчитывали на оцифрованных изображениях в 4 фиксированных зонах белого вещества: 1 — вентромедиальная часть переднего канатика, прилежащая к срединной щели, правая сторона; 2 — то же, левая сторона; 3 — латеральная часть бокового канатика в пределах фронтальной плоскости, проходящей через центральный канал, правая сторона; 4 — то же, левая сторона [1]. Просмотр препаратов и оцифровку изображений проводили с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия). Результаты морфометрии обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. В области контузионного повреждения спинного мозга в раннем периоде (7-е сутки) после травмы в относительно сохранном белом веществе развивается отек, нервные волокна роstralнее и каудальнее эпицентра травмы дегенерируют, их миелиновая оболочка подвергается деструктивным изменениям. В наибольшей мере повреждение затрагивает серое вещество, в котором наблюдается хроматоз и гибель нейронов. У животных с введением плазмиды pBud-EGFP-N2 к 30-м суткам в области травмы и на расстоянии 3 и 5 мм в каудальном и роstralном направлении границы между серым и белым веществом не прослеживаются. На поперечных срезах видна центральная зона полностью дезинтегрированной ткани, имеющей вид обширной полости с рассеянными в ней фрагментами дегенерирующих клеток (рис. 1). Величина ее уменьшается по мере удаления от эпицентра травмы: на расстоянии 3 мм она составляет $\frac{2}{3}$, а на

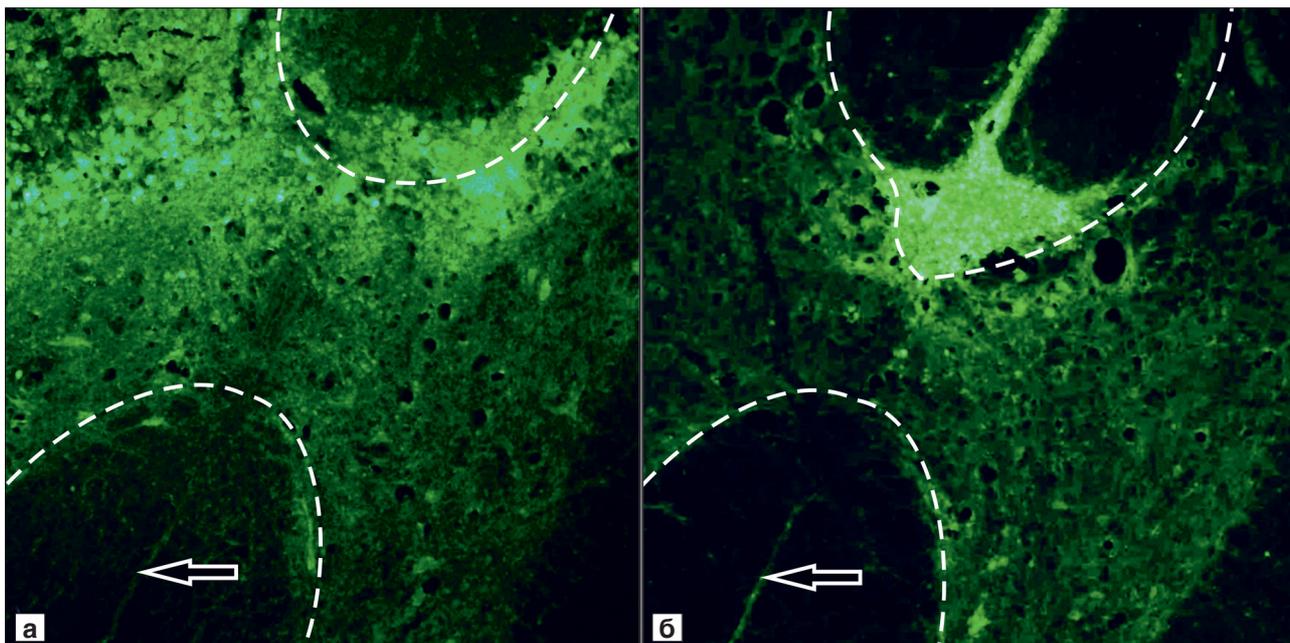


Рис. 2. Интенсивное специфическое свечение EGFP в трансплантированных в область повреждения спинного мозга крысы моноклеарных клетках крови пуповины человека в задних канатиках на границе с серым веществом (а) и локальное свечение в области заднего кортикоспинального тракта и по ходу задней срединной борозды (б).

а — 7 сут; б — 14 сут после травмы. Штриховая линия — граница между серым и белым веществом; стрелки — передняя срединная щель. Ув. 250.

расстоянии 5 мм — до половины всей площади сечения. На периферии среза структура белого вещества более сохранна, признаки деструкции менее выражены. Здесь отмечено обилие микрополостей, разделенных прослойками соединительной ткани с признаками астроглиоза.

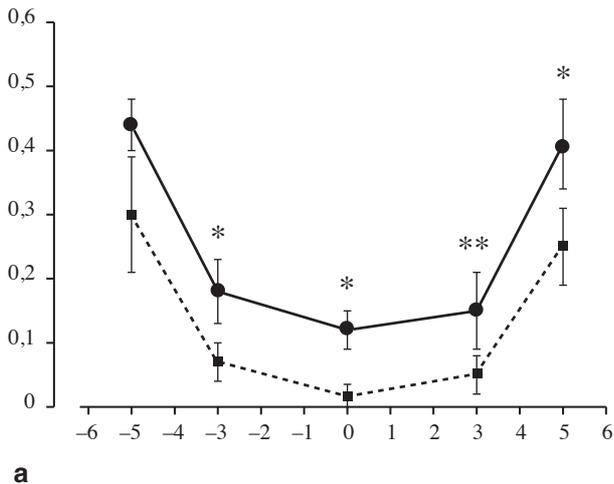
Явных различий строения эпицентра травмы у животных после введения плазмиды pBud-VEGF-FGF2 (1-я группа) и у крыс 2-й группы обнаружено не было.

В спинном мозгу животных 2-й группы с введением моноклеарных клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2, специфическое свечение выявлено на расстоянии до 10 мм в ростральном и каудальном направлении от точек инъекции. Это свечение наиболее интенсивно в ранние сроки после травмы и введения клеток (2–6-е сутки), отчетливо прослеживается в более поздние сроки (14–21-е сутки) (рис. 2) и постепенно затухает к 30-м суткам. Меченые EGFP-клетки присутствуют в сохранной ткани серого и белого вещества и проникают в патологические полости. Если к 2-м суткам после трансплантации люминесцирующие клетки распределены более равномерно и преимущественно в белом веществе, то к 6-м суткам они образуют скопления с интенсивной флюоресценцией, как в вентральной части задних канатиков, так и особенно, в прилегающей к ней дорсальной части серого вещества (см. рис. 2, а). К 7-м суткам области с характер-

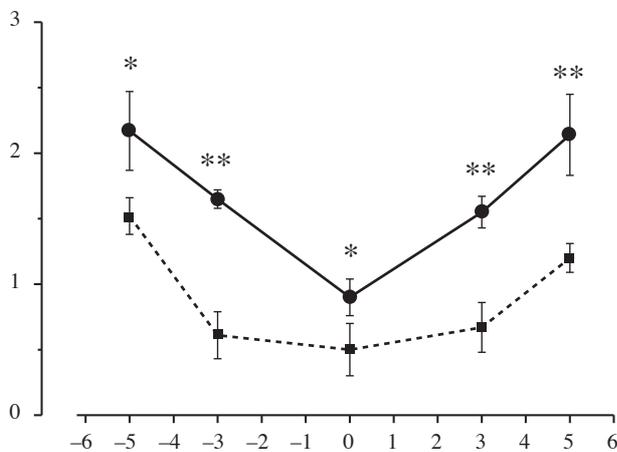
ным свечением EGFP занимают больший объем, интенсивность свечения возрастает, что может быть следствием усиления экспрессии EGFP в трансплантированных клетках или увеличения их количества за счет активной пролиферации. К 14-м суткам область присутствия EGFP⁺-клеток значительно сужается. К этому сроку специфическая флюоресценция EGFP выявлена в компактном скоплении клеток преимущественно в вентральной части задних канатиков на границе с серым веществом (см. рис. 2, б).

К 30-м суткам после трансплантации клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2 (1-я группа), площадь сохранного серого вещества на расстоянии 3 мм в ростральном направлении от эпицентра травмы увеличивается на 66%, а на том же расстоянии в каудальном направлении — на 61% (рис. 3, а). При сравнении 1-й (pBud-VEGF-FGF2) и 2-й (pBud-EGFP-N2) групп животных различия в площади сохранного серого вещества на расстоянии 5 мм от эпицентра выражены в меньшей степени, но так же как и при удалении на 3 мм от эпицентра, с превышением значений в 1-й группе на 40% в ростральном направлении и на 31% ($P < 0,05$) — в каудальном (см. рис. 3, а).

Уменьшение площади деструкции ткани при трансплантации клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, выявлено также в белом веществе (см. рис. 3, б). К 30-м суткам эксперимента на расстоянии 3 мм в ростральном



а



б

Рис. 3. Площадь сохранного серого (а) и белого (б) вещества на поперечном срезе спинного мозга крысы на уровне T_{VIII} через 30 сут после трансплантации в область контузионной травмы клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2 (пунктирная линия) и плазмидой pBud-VEGF-FGF2 (сплошная линия).

По оси абсцисс — расстояние от эпицентра травмы, слева от 0 — в каудальном, справа — в ростральном направлении (мм); по оси ординат — исследованный параметр (mm^2). Различия значимы: * при $P < 0,05$, ** при $P < 0,01$.

и каудальном направлении от эпицентра травмы площадь сохранного белого вещества у животных 1-й группы превышает данный показатель у животных 2-й группы соответственно на 56 и 63%. На расстоянии 5 мм ростралью и каудально от эпицентра травмы площадь сохранного белого вещества у животных 1-й группы увеличивается на 45 и 43% соответственно ($P < 0,05$) (см. рис. 3, б). Результаты морфометрии свидетельствуют о том, что чем ближе к эпицентру травмы и точкам введения клеток располагается исследуемый участок мозга, тем в большей мере

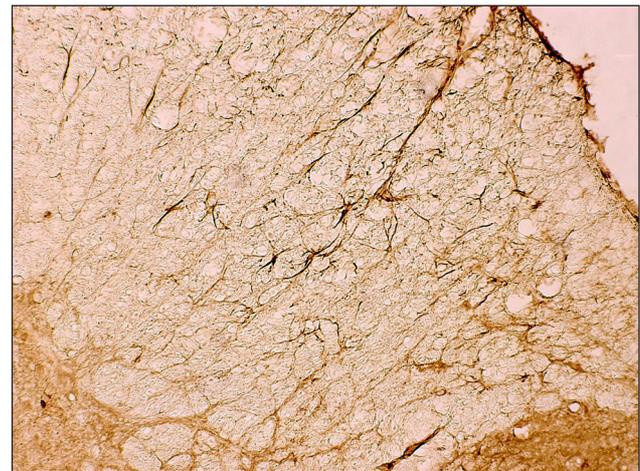


Рис. 4. Экспрессия PDGFR в зоне 3 белого вещества спинного мозга крысы на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы в ростральном направлении через 14 сут после трансплантации клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pBud-EGFP.

Иммуноцитохимическая реакция. Ув. 250.

оказывается поддерживающее влияние доставки терапевтических генов на сохранность серого и белого вещества.

Осадок конечного продукта иммуногистохимической реакции с антителами к PDGFR выявлен преимущественно в белом веществе в клетках, связанных с кровеносными сосудами. Длинные PDGFR-иммунопозитивные отростки этих периваскулярных клеток ориентированы по ходу кровеносных сосудов, проходящих в радиальном направлении (рис. 4). Наибольшее количество PDGFR⁺-клеток выявлено в наружных зонах белого вещества. Различий в характере распределения и интенсивности осадка иммуногистохимической реакции в материале, полученном от животных 1-й (pBud-VEGF-FGF2) и 2-й (pBud-EGFP-N2) группы, выявлено не было. У животных 1-й группы в наружных зонах белого вещества на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы количество периваскулярных клеток, экспрессирующих PDGFR, возрастает в среднем на 30% (рис. 5).

Обсуждение полученных данных. Поддерживающее влияние трансплантируемых клеток и доставляемых ими стимуляторов регенерации на восстановление утраченных функций спинного мозга в значительной мере зависит от выживания и длительности присутствия этих клеток в ткани реципиента и от их миграционного потенциала. В этом отношении наши данные согласуются с результатами исследований [5, 14], в которых в условиях адекватной иммуносупрессии генетически модифицированные стволовые мезенхимные клетки при трансплантации в

интактный спинной мозг крысы не только выжили в течение не менее 3 нед, но и экспрессировали трансген. Усиление специфического свечения EGFP в ранние сроки после трансплантации в область травмы спинного мозга крысы, доставляемого клетками крови пуповины человека, может быть результатом пролиферации данных клеток и/или усиления в них экспрессии трансгена.

В условиях нашего эксперимента длительная экспрессия EGFP на фоне отсутствия иммуносупрессии и трансплантации клеток в момент травмы, а не после прохождения пика цитостатического действия провоспалительных цитокинов и клеточных иммунных реакций, свидетельствует не только о высокой способности трансплантируемых клеток к выживанию, но и о потенциальной возможности поддерживать экспрессию терапевтических генов.

Можно полагать, что трансфекция клеток генами нейротрофических факторов в выбранной нами комбинации VEGF-FGF2 увеличивает количество жизнеспособных клеток и продлевает их пребывание в области травмы. Такая возможность показана для нейральных стволовых клеток, трансфицированных геном VEGF, при их трансплантации в область контузионной травмы спинного мозга [9].

Следует отметить важность выявленных нами миграционных возможностей клеток крови пуповины человека, трансплантируемых в область травмы спинного мозга. Миграционный потенциал мононуклеарных клеток крови пуповины, изученный нами в области контузионного повреждения спинного мозга, превышает или находится на уровне типированных гемопоэтических и нейральных стволовых клеток в аналогичных экспериментах [7, 10].

PDGF-B связываясь с рецепторами PDGF β R, стимулирует дифференцировку перицитов из предшественников, экспрессирующих PDGF β R, что оказывает поддерживающее влияние на процесс васкуляризации [6, 8]. Его нарушение показано при дефектах генов PDGF-B и PDGF β R [11]. Зарегистрированное нами к 30-м суткам эксперимента увеличение количества PDGF β R⁺-клеток отражает усиление васкуляризации белого вещества в области травматического повреждения спинного мозга. Этот эффект, по-видимому, является результатом действия VEGF, продуцируемого трансплантируемыми клетками крови пуповины.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что доставка терапевтических генов VEGF и FGF2 при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины человека приводит к

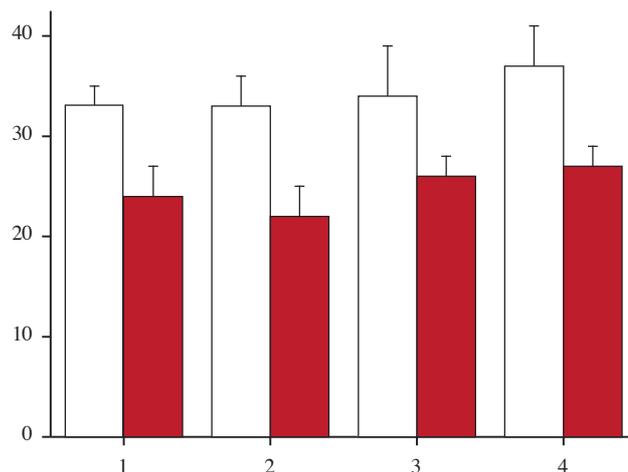


Рис. 5. Количество PDGF β R⁺-клеток в различных зонах белого вещества на 30-е сутки после операции.

Светлые столбики — у животных 1-й группы (pBud-VEGF-FGF2); темные столбики — у животных 2-й группы (pBud-EGFP-N2). По оси абсцисс — зоны морфометрии; по оси ординат — исследованный показатель. Вертикальные отрезки — средние квадратичные отклонения; различия между контролем и опытом значимы при $P < 0,05$.

уменьшению площади деструкции серого и белого вещества, стимулирует васкуляризацию ткани мозга и поддерживает его посттравматическую регенерацию.

Исследование поддержано государственным контрактом ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации 16.512.112101.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев С. В., Карасев А. В., Чехонин В. П. и др. Исследование эффективности трансплантации нейральных стволовых клеток человека крысам с травмой спинного мозга: применение функциональных нагрузочных тестов и метода ВВВ. Бюл. экспер. биол., 2010, т. 149, № 3, с. 355–360.
2. Лебедев С. В., Тимофеев С. В., Жарков А. В. и др. Нагрузочные тесты и метод ВВВ при оценке двигательных нарушений после контузионной травмы спинного мозга. Бюл. экспер. биол., 2008, т. 145, № 10, с. 471–476.
3. Салафутдинов И. И., Шафигуллина А. К., Ялвач М. Э. и др. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010, т. 5, № 2, с. 62–57.
4. Чельшев Ю. А. и Викторов И. В. Клеточные технологии ремелинизации при травме спинного мозга. Неврол. вестн. им. В. М. Бехтерева, 2009, № 1, с. 49–55.
5. Bai L., Lennon D. P., Eaton V. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009, v. 57, № 11, p. 1192–1203.
6. Betsholtz C., Lindblom P. and Gerhardt H. Role of pericytes in vascular morphogenesis. *EXS*, 2005, v. 94, p. 115–125.

7. Han S. S., Liu Y., Tyler-Polsz C. et al. Transplantation of glial-restricted precursor cells into the adult spinal cord: survival, glial-specific differentiation, and preferential migration in white matter. *Glia*, 2004, v. 45, p. 1–16.
8. Hellstrom M., Gerhardt H., Kalen M. et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 2001, v. 153, p. 543–553.
9. Jin L.H., Pennant W. A., Lee H. M. et al. Neural stem cells modified by a hypoxia-inducible VEGF gene expression system improve cell viability under hypoxic conditions and spinal cord injury. *Spine*, 2011, v. 36, № 11, p. 857–864.
10. Khalatbary A. R. and Tiraihi T. Localization of bone marrow stromal cells in injured spinal cord treated by intravenous route depends on the hemorrhagic lesions in traumatized spinal tissues. *Neurol. Res.*, 2007, v. 29, № 1, p. 21–26.
11. Lindahl P., Johansson B., Leveen P. and Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B deficient mice. *Science*, 1997, v. 277, p. 242–245.
12. Rizvanov A. A., Kiyasov A. P., Gazizov I. M. et al. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neuro-genesis—a novel approach in stem cell therapy. *Neurochem Int.*, 2008, v. 53, № 6–8, p. 389–394.
13. Ronaghi M., Erceg S., Moreno-Manzano V. and Stojkovic M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells*, 2010, v. 28, № 1, p. 93–99.
14. Ronsyn M. W., Berneman Z. N., Van Tendeloo V. F. et al. Can cell therapy heal a spinal cord injury? *Spinal Cord*, 2008, v. 46, № 8, p. 532–539.
15. Zhao Z. M., Li H. J., Lu S. H. et al. Intraspinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats. *Cell Transplant.*, 2004, v. 13, № 2, p. 113–122.

Поступила в редакцию 14.02.2011
Получена после доработки 12.03.2012

EFFECTS OF TRANSPLANTATION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD MONONUCLEAR CELLS, EXPRESSING VEGF AND FGF2 GENES, INTO THE AREA OF SPINAL CORD TRAUMATIC LESION

*G. F. Shaymardanova, Ya.O. Mukhamedshina,
A. A. Rizvanov, I. I. Salafutdinov and Yu. A. Chelyshev*

Effects of immediate single transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells (UCB-MC) transfected with recombinant vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor-2 (FGF2) genes into the area of injury were studied on the model of rat spinal cord dosed contusion at TVIII level. UCB-MC transfected with EGFP-N2 plasmid were transplanted into the rats of the control group under similar conditions. The presence of EGFP- labeled cells were traced in white matter during 21 days after transplantation at a distance no less than 10 mm in rostral and caudal directions from the nearest point of the injection. By 30 days after the transplantation of UCB-MC transfected with pBud-VEGF-FGF2 plasmid, the cross-sectional area of sparing grey matter increased by more than 60% at a distance of 3 mm from the epicenter of injury. By that time, in the animals of this group, the number of perivascular cells expressing beta receptor of platelet-derived growth factor (PDGFβR) was increased by an average of 30% in the outer zones of white matter 1.5 cm from the injury epicenter. Delivery of the therapeutic genes VEGF and FGF2 to the damaged region and their expression in cell carriers stimulates vascularization and post-traumatic spinal cord regeneration.

Key words: *spinal cord, regeneration, umbilical cord blood cells, VEGF, FGF2*

Laboratory of Molecular Basis of Pathogenesis, RAS Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, RAS Kazan Scientific Center; Department of Histology, Cytology and Embryology, and Central Research Laboratory, Kazan State Medical University; Department of Genetics, Kazan (Volga Region) Federal University; Republican Clinical Hospital, Kazan