

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
Дипломная работа  
**ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ  
ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ, СОДЕРЖАЩИХ  
БЕЛКИ ГЛИКОПРОТЕИДА И НУКЛЕОКАПСИДА**

Работа завершена:

"5" июн 2019 г.

Р.Р. Шарафутдинова

Работа сдана на рецензию

ассистент

"6" 06 2019 г.

Л.Г. Тазетдинова

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к. б. н., ассистент

"6" 06 2019 г.

Е. Е. Гаранина

Научный руководитель

д. б. н., профессор

"7" 06 2019 г.

А. А. Ризванов

Заведующий кафедрой

д. б. н., профессор

"7" 06 2019 г.

В. М. Чернов

Казань – 2019

# **СОДЕРЖАНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>6</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>8</b>
1.1 ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ	8
1.1.1 Классификация	8
1.1.2 Особенности содержимого везикул	9
1.1.3 Микровезикулы	9
1.1.4 Биогенез МВ и его регуляция	10
1.1.5 Перенос содержимого, биомаркерная роль МВ	11
1.1.6 Биологическая роль МВ клеток крови (коагуляция, воспаление и иммунитет)	11
1.2 ХАНТАВИРУСЫ	13
1.2.1 Эпидемиология	13
1.2.2 Особенности заболеваний, вызываемых хантавирусами	14
1.2.3 Патогенез ГЛПС	14
1.2.4 Патогенез при ХКЛС	15
1.2.5 Вирус Пуумала	16
1.3 Строение генома хантавирусов	19
1.3.1 Общие сведения строения	19
1.3.2 Репликационный цикл хантавирусов	20
1.3.3 Нуклеокапсидный белок	21
1.3.4 РНК-зависимая РНК полимераза	22
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	<b>28</b>
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	<b>28</b>
2.1 Получение искусственных микровезикул	28
2.1.1 Используемая клеточная линия, культивирование культуры клеток	28
2.1.2 Пассирование культур клеток	28
2.1.3 Получение микровезикул с помощью цитохалазина В	29
2.1.4 Вестерн blot	29

2.2 Генетическая модификация культуры клеток фибробластов мыши	31
2.2.1 Используемая клеточная линия	31
2.2.2 Кальциево-фосфатная трансфекция	31
2.2.3 Трансфекция культуры клеток фибробластов мыши	32
2.3 Подкожная инъекция модифицированных вирусом микровезикул лабораторным животным	32
2.4 Иммуноферментный анализ образцов сыворотки крови	33
2.5 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	34
2.5.1 Получение тотальной РНК из ткани животных	34
2.5.2 Синтез одноцепочечной ДНК	35
2.5.3 Проведение полимеразной цепной реакции целевых генов	35
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b>	<b>36</b>
3.1 Культивирование линии клеток эмбриональных фибробластов мыши Nih3T3	36
3.2 Анализ генетической модификации культур клеток HEK293T	36
3.3 Оценка наличия трансгена в МВ внутри клеток HEK293T	37
3.4 Получение микровезикул при помощи цитохалазина В	38
3.5 Оценка эффективности трансдукции клеток фибробластов мыши Nih3T3 и экспрессии трансгена в искусственных микровезикулах	38
3.6 Сбор сыворотки крови мышей, иммунизированных модифицированными микровезикулами	39
3.7 Регистрация результатов иммуноферментного анализа	40
3.8 Анализ содержания целевого трансгена в лимфоузлах мышей	41
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>43</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы секретируются всеми типами клеток организма. Они играют центральную роль в межклеточной коммуникации ввиду способности доставлять белки и нуклеиновые кислоты в клетки-реципиенты. Природа и обилие везикулярных составляющих является клеточно-специфичной и зависит от физиологического или патологического состояния донорской клетки, а также стимулов, модулирующих их продукцию, наряду с молекулярными механизмами биогенеза.

Микровезикулы регулируют множество патофизиологических процессов, среди которых: воспаление и иммунный ответ, рост опухолей и инфекции. Рибонуклеиновая и белковая фракции везикул различаются между здоровыми людьми и пациентами, что позволяет судить о присущей микровезикулам биомаркерной роли. [Barile et al., 2017] Открытие нативных везикул, переносящих малые РНК и белки, вызвало бурный интерес в сфере доставки лекарственных средств, так как теперь представляется возможным использование везикул для терапевтического переноса микроРНК, киРНК, мРНК, пептидов и синтетических лекарственных соединений. Адресность везикул достигается при помощи экспрессии целевых молекул, которыми могут быть пептиды или фрагменты антител, способных «узнавать» антиген на поверхности везикулярных частиц. [Barile et al., 2017]

Согласно современным данным, высвобождение микровезикул коррелирует с началом и прогрессированием многих заболеваний, включая и геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС). [Clancy et al., 2015] Инфекция представляет собой новую глобальную угрозу здоровью человечества: в год регистрируется около 10 000 случаев ГЛПС в Европе и 50 000 – во всем мире. Возбудителем данного заболевания является обширное семейство хантавирусов.

Хантавирус Пuumala (PuuV) - наиболее распространенный в Западной Европе штамм, вызывающий легкую форму геморрагической лихорадки с почечным синдромом, так называемую эпидемическую нефропатию. [Khalil et al., 2014] Только в Финляндии ежегодно

регистрируется около 1000 случаев эпидемии, с варьирующейся тяжестью заболевания (от бессимптомной инфекции до тяжелого течения, с уровнем смертности от 0,1%). [Brummer-Korvenkontio et al., 1980] Заражение вирусом у человека происходит посредством поступления в дыхательные пути аэрозольных частиц экскрементов зараженных полевок. [Monchatre-Leroy et al., 2018]

Расширение понимания механизмов патогенеза хантавирусной инфекции является ключом при прогнозировании инфекции, разработке альтернативных способов лечения. Так, выявление новых биомаркерных свойств микровезикул, экспрессирующих белок N и гликопротеины G1 и G2 хантавирусов, весьма актуально для оптимизации подходов при терапии и профилактики ГЛПС.

**Цель** работы - исследование иммуногенных свойств искусственных микровезикул, несущие белки гликопротеида и нуклеокапсида вируса Пуумала.

В рамках цели работы решались следующие экспериментальные задачи:

- 1) Генетическая модификация культуры клеток фибробластов мыши рекомбинантными лентивирусными частицами с последующим выделением искусственных микровезикул при помощи цитохалазина В;
- 2) Выявление экспрессии нуклеокапсидного N белка в искусственно полученных микровезикулах и в родительских клетках методом иммуноблотинга;
- 3) Иммунизация лабораторных животных искусственными микровезикулами, полученными с помощью цитохалазина В;
- 4) Исследование иммунного ответа методом иммуноферментного анализа.



## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
**Антиплагиат.ВУЗ**

Автор работы	Шарафутдинова Рената Рушановна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	Диплом Шарафутдинова Рената GEE (1)
Название файла	Диплом Шарафутдинова Рената GEE (1).docx
Процент заимствования	<b>19,19%</b>
Процент цитирования	<b>0,08%</b>
Процент оригинальности	<b>80,73%</b>
Дата проверки	<b>20:59:54 06 июня 2019г.</b>
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	<i>06.06.2019</i>

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.  
Представленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.