

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
**ОЦЕНКА ИММУННЫХ СВОЙСТВ ИНДУЦИРОВАННЫХ  
МИКРОВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

**Работа завершена:**

Группа 01-740-1

«5» 06 2019 г.

(О.А. Неустроева)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель:

к.б.н., с.н.с

«6» 06 2019 г.

(М.О. Гомзикова)

д.б.н., доцент кафедры генетики

«6» 06 2019 г.

(А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«6» 06 2019 г.

(В.М. Чернов)

Казань – 2019

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	10
1.1 Мезенхимные стволовые клетки	10
1.2 Биологическая активность мезенхимных стволовых клеток	11
1.3 Модулирование иммунных реакций организма мезенхимными стволовыми клетками	12
1.4 Внеклеточные везикулы	16
1.5 Терапевтическое применение микровезикул	19
1.6 Микровезикулы индуцированные цитохалазином В	22
1.7 Заключение по обзору литературы	24
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	25
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	25
2.1 Выделение мезенхимных стволовых клеток	25
2.2 Пассирование клеточных культур	25
2.3 Дифференцировка в адипогенном направлении культуры МСК	26
2.4 Дифференцировка в остеогенном направлении культуры МСК	26
2.5 Дифференцировка в хондрогенном направлении культуры МСК	27
2.6 Иммунофенотипирование мезенхимальных стволовых клеток	28
2.7 Получение индуцированных цитохалазином В микровезикул	29
2.8 Пробоподготовка и проведение сканирующей электронной микроскопии	30
2.9 Мультиплексный анализ	30
2.10 Лабораторные животные	31

2.11 Иммунизация мышей эритроцитами барана.....	31
2.12 Оценка активности нейтрофилов в teste хемилюминесценции .....	32
2.13 Измерение фагоцитарной активности перitoneальных макрофагов .....	33
2.14 Выделение мононуклеарных клеток крови.....	33
2.15 Оценка жизнеспособности иммунных клеток.....	34
2.16 Активация мононуклеарных клеток крови .....	34
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....</b>	<b>35</b>
3.1 Характеристика иммунофенотипа, размера и молекулярного состава мезенхимных стволовых клеток и индуцированных цитохалазином В микровезикул .....	35
3.2 Влияние внутривенного введения МВ-ЦВ МСК на гуморальный иммунный ответ.....	41
3.3 Влияние внутривенного введения МВ-ЦВ МСК на клеточный иммунный ответ .....	43
3.4 Влияние индуцированных цитохалазином В микровезикул на жизнеспособность клеток крови <i>in vitro</i> .....	45
3.5 Иммуномодулирующее действие индуцированных цитохалазином В микровезикул на активированные клетки крови <i>in vitro</i> .....	47
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>50</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>51</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются перспективным инструментом клеточной терапии при лечении широкого спектра заболеваний. Повышенный интерес к МСК вызван их недифференцированным состоянием, для которого характерно отсутствие экспрессии ГКГС II (главный комплекс гистосовместимости) и костимулирующих молекул, таких как CD80, CD86 и CD40 и низкая экспрессия молекул ГКГС класса I [Blanc Le *et al.*, 2003]. Внутривенная инъекция аллогенных МСК не приводит к развитию иммунного ответа, наоборот МСК проявляют иммуносупрессивные и противовоспалительные свойства [Cao *et al.*, 2015].

В настоящее время существует несколько десятков клинических испытаний с использованием МСК в качестве терапевтического инструмента при аутоиммунных заболеваниях и при реакции «трансплантат против хозяина» (согласно БД <https://clinicaltrials.gov/>, обращение 27.05.2019). Однако стволовые клетки (СК) обладают риском дифференцировки в нежелательном направлении, злокачественной трансформации, неограниченного деления и формирования опухоли [Amariglio *et al.*, 2009; Breitbach *et al.*, 2007; Kunter *et al.*, 2007; Rosland *et al.*, 2009].

В наши дни повышенное внимание исследователей приковано к внеклеточным везикулам (ВВ). ВВ - это окруженные мембраной округлые структуры размером 50-2000 нм [Akers *et al.*, 2013], которые берут свое начало от разного типа клеток. ВВ являются медиаторами межклеточной коммуникации. Высвобождаясь в ответ на широкий спектр стимулов, ВВ переносят заключенные в них биоактивные молекулы (факторы транскрипции, хемокины, цитокины, факторы роста), нуклеиновые кислоты (мРНК, миРНК, микроРНК, ДНК) [Bellingham *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2014; Vagner *et al.*, 2018] в клетки организма.

ВВ МСК обладают биологической активностью родительских клеток. Так же как и клетки-доноры они оказывают противовоспалительное и иммуномодулирующее действие на клетки, участвующие в развитии

клеточного и гуморального иммунного ответа [Kyurkchiev, 2014]. В настоящее время известно о двух клинических испытаниях ВВ МСК для терапии резистентной к стероидам реакции «трансплантат против хозяина» [Kordelas *et al.*, 2014] и хронического заболевания почек [Nassar *et al.*, 2016]. Однако получение естественных ВВ в достаточном для клинических испытаний количестве и адаптация процесса выделения естественных ВВ в производство является сложной и ресурсозатратной задачей. Сотрудниками нашей лаборатории развивается способ получения индуцированных микровезикул МСК с применением цитохалазина В (МВ-ЦВ) [Гомзикова, 2016]. К настоящему времени МВ-ЦВ применяются в качестве векторов для доставки биоактивных молекул и химиопрепараторов [Peng *et al.*, 2015] *in vivo*, а также стимуляции роста кровеносных сосудов *in vitro* и *in vivo* [Гомзикова, 2016]. Таким образом, МВ-ЦВ МСК являются перспективным инструментом бесклеточной терапии. Однако иммунологические свойства МВ-ЦВ МСК до настоящего времени исследованы не были.

В связи с актуальностью данного вопроса **целью** нашего исследования было оценить иммуномодулирующие свойства аллогенных индуцированных микровезикул мезенхимных стволовых клеток мышей *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Охарактеризовать иммунофенотип и молекулярный состав мезенхимных стволовых клеток и размер, иммунофенотип и молекулярный состав МВ-ЦВ МСК мыши;
- 2) Оценить влияние внутривенного введения аллогенных МВ-ЦВ МСК мыши на выработку антител;
- 3) Оценить влияние аллогенных МВ-ЦВ МСК мыши на биохимическую активность нейтрофилов и фагоцитарную активность макрофагов *in vitro*;
- 4) Оценить влияние аллогенных МВ-ЦВ МСК мыши на жизнеспособность мононуклеарных клеток крови *in vitro*;

5) Протестировать иммуномодулирующее действие аллогенных МВ-ЦВ МСК человека на активированные фитогемагглютинином клетки крови человека *in vitro*.

Изучение иммуномодулирующей способности МВ-ЦВ МСК показало, что МВ-ЦВ МСК способны ингибировать экспрессию генов, ответственных за синтез цитокинов и хемокинов, а также генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004]. МВ-ЦВ МСК способны ингибировать экспрессию гена, кодирующего белок, участвующий в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004]. Синтез цитокинов и хемокинов, а также белков, участвующих в регуляции иммунной системы, ингибируется МВ-ЦВ МСК [Gao et al., 2004]. МВ-ЦВ МСК способны ингибировать экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004].

Большое значение МСК придается в изучении иммуномодулирующей способности МСК, поскольку МСК способны ингибировать экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004]. МВ-ЦВ МСК способны ингибировать экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004]. МВ-ЦВ МСК способны ингибировать экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004]. МВ-ЦВ МСК способны ингибировать экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции иммунной системы [Gao et al., 2004].



## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Неустроева Ольга Андреевна
Подразделение	
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	ОЦЕНКА ИММУННЫХ СВОЙСТВ ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Название файла	Неустроева_антиплагиат.docx
Процент заимствования	3,61%
Процент цитирования	0,90%
Процент оригинальности	95,49%
Дата проверки	14:05:36 30 мая 2019г.
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

30.06.19

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. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.