

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 –биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МАРКЕРОВ
ИНФЛАММАСОМ (NALP3, Casp1) В РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ КЛЕТОК КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА С ДИАГНОЗОМ ГЛПС А ТАКЖЕ ИЗУЧЕНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ

Работа завершена:

«5» 06 2019 г.



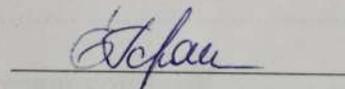
Асаад В.

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., ассистент

«6» 06 2019 г.

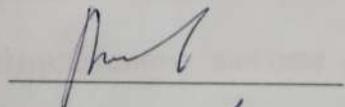


Гаранина Е.Е.

Научный руководитель

д.б.н., профессор

«6» 06 2019 г.

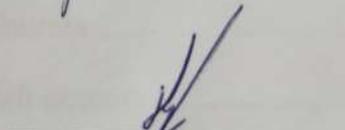


Ризванов А.А.

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«6» 06 2019 г.



Чернов В.М.

Казань-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 7 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 10 |
| 1.1 Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) | 10 |
| 1.1.1 Клиническое течение ГЛПС | 10 |
| 1.1.2 Патогенез ГЛПС | 12 |
| 1.1.3 Диагностика | 13 |
| 1.2 Инфламмосомы; их структура, регуляторные элементы и продукты | 14 |
| 1.3 Функции инфламмосом | 20 |
| 1.4 Активация инфламмосом при хантавирусной инфекции | 23 |
| Заключение | 24 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 25 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 25 |
| 2.1 Выделение лейкоцитов в градиенте плотности фиколла | 25 |
| 2.2 Клеточная сортировка мононуклеарных клеток | 25 |
| 2.3 Выделение РНК | 26 |
| 2.4 Реакция обратной транскрипции | 26 |
| 2.5 ПЦР в реальном времени | 27 |
| 2.6 Проведение мультиплексного анализа цитокинов и хемокинов по технологии xMAP Luminex | 29 |
| 2.7 Иммуноферментный анализ | 30 |
| 2.8 Иммуноблоттинг | 31 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ | 34 |
| 3.1 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови пациентов с диагнозом ГЛПС | 34 |
| 3.2 Клеточные популяции CD4+, CD8+, CD14+ и CD20+ у пациентов ГЛПС..... | 34 |
| 3.3 Анализ экспрессии маркеров инфламмасом (NALP3, casp1) в клетках крови | 35 |
| 3.4 Исследование цитокинового профиля у пациентов ГЛПС | 37 |
| 3.5 Анализ концентраций анти-хантавируса IgG у пациентов ГЛПС | 39 |
| 3.6 Изучение экспрессии NALP3 в клеточной линии A549, инфицированной различными белками хантавирусов | 39 |
| ВЫВОДЫ | 41 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 42 |

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные геморрагические лихорадки (ВГЛ) представляют серьезную проблему здравоохранения. В настоящее время по разным оценкам ежегодно регистрируется от 50 до 100 миллионов случаев ВГЛ в мире [Gibbons, Vaughn, 2002]. Частота смертельных исходов варьирует в зависимости от штамма вируса и может достигать 50% от всех заболевших. Специфическое лечение отсутствует, поэтому терапия основана на проведении мероприятий по симптоматическому лечению и поддержке жизненно важных органов. Также, не для всех ВГЛ существуют вакцины, поэтому проблема разработки методов предотвращения заболевания стоит особенно остро. Большинство ВГЛ являются зоонозами, поэтому заболевание регистрируется в очагах, совпадающих с ареалом обитания переносчика. Однако, в последнее время случаи ВГЛ были диагностированы за пределами ареала хозяина переносчика. Расширение внешнеэкономических связей и установление туристических контактов будет лишь способствовать распространению ВГЛ за пределы зоонозного ареала, тем самым представляя реальную угрозу. Ежегодно регистрируется около 100 000 случаев геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) [Zhang Y. *et al.*, 2008], большинство из которых регистрируется в Китае, Корее и России [Yu *et al.*, 2014]. ГЛПС развивается при инфекции вирусами Хантаан (HTNV), с Амуре (AMB), вирусом Сеул (SEOV), вирусом Добрава / Белград (DOBV), и вирусом Пуумала (PUUV), каждый из которых вызывает заболевания различной степени тяжести. Вирусы HTNV и DOBV способны вызывать наиболее тяжелую форму ГЛПС и имеют самые высокие показатели заболеваемости в диапазоне от 5 до 10% [Jonsson *et al.*, 2010]; вирус Сеул широко распространен во всем мире и вызывает умеренную форму ГЛПС [Jiang *et al.*, 2016].

В России в период с 1996 по 2006 годы было выявлено 89 162 случая ГЛПС, и средняя частота составила 5,8 случая на 100 000 человек (1997-2007 годы), достигнув пика в 1997 году, когда было зарегистрировано 14,3 случая на 100 000

человек. Частота ГЛПС в России варьируется географически. Наиболее эндемичными по заболеваемости являются регионы Приволжского федерального округа, в частности Татарстан, Удмуртия, Самара, Оренбург и Башкирия, последние имеют наибольшую заболеваемость (68 случаев/100 000 человек/год) в этих регионах, где преобладает инфекция вирусом Пуумала [Garanina *et al.*, 2009].

Основным путем передачи инфекции от грызунов к человеку является вдыхание аэрозольных выделений; вирусные антигены выделяются с фекалиями, мочой и слюной, которые при аэрозольном воздействии могут вдыхаться инфицированными людьми [Sargianou *et al.*, 2012]. Один из видов американских хантавирусов (вирус Андес, ANDV) является исключением из этой парадигмы, имея документально подтвержденные случаи передачи вируса от человека человеку [Ferres *et al.*, 2007].

Хантавирусы поражают клетки эндотелия сосудов, вызывая обширное повреждение в капиллярах и малых сосудов. Однако молекулярные механизмы ГЛПС мало изучены. Одна из причин – отсутствие подходящих животных моделей. В последнее время многие фундаментальные и клинические исследования проливают свет на основные механизмы патогенеза ГЛПС и предлагают различные способы снижения тяжести заболевания [Jiang *et al.*, 2016].

Длительное изучение молекулярных механизмов иммунного ответа привело к открытию инфламмасом, которые представляют собой цитозольные полипротеиновые комплексы, образующиеся в ответ на различные внешние и внутренние стимулы, включая вирусные и бактериальные инфекции. Инфламмасомы являются необходимым компонентом врожденного иммунного ответа. Ключевыми продуктами инфламмасом являются про-воспалительные цитокины: интерлейкин-1-бета (IL-1 β) и интерлейкин-18 (IL-18).

Таким образом, изучение иммунного ответа больных ГЛПС, одна из сторон которого представлена сборкой воспалительного процесса, необходимо для лучшего понимания заболевания.

Цель настоящей работы заключается в исследовании транскрипционной активации маркеров инфламмасом – каспазы 1 и криопирин (NALP3) и молекулярных механизмов противовирусной защиты у пациентов с диагнозом ГЛПС.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

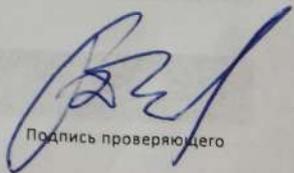
1. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови, полученной от пациентов с диагнозом ГЛПС с последующей сортировкой на популяции $CD^3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD14^+$, $CD20^+$;
2. Исследование транскрипционной активации маркеров инфламмасом (NALP3, casp1) в вышеуказанных клеточных популяциях;
3. Исследование цитокинового профиля в сыворотке, собранной от больных с диагнозом ГЛПС;
4. Выявление антител IgG у пациентов с ГЛПС;
5. Изучение экспрессии NALP3 в клеточной линии A549, инфицированной различными белками хантавирусов.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

| | |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Автор работы | Асаад Валаа Абд Аль-Карим |
| Подразделение | |
| Тип работы | Магистерская диссертация |
| Название работы | Изучение транскрипционной активности маркеров инфламмасом (NALP3, Casp1, Il-1B) в различных популяциях клеток крови человека с диагнозом ГЛПС, а также изучению молекулярных механизмов противовирусной защиты..docx |
| Название файла | antiplagiat-Асаад Валаа Диссертация GEE 300519 .docx |
| Процент заимствования | 14,23% |
| Процент цитирования | 0,59% |
| Процент оригинальности | 85,19% |
| Дата проверки | 09:57:19 03 июня 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 | 05.06.2019  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.