

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.62) - биология
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ХАРАКТЕРИСТИКА И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ЕСТЕСТВЕННЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Работа завершена:

«7» 05 2021г. Курбангалиева (С.В. Курбангалиева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

Ведущий научный сотрудник, к.б.н.

«7» 05 2021г. Гомзикова (М.О. Гомзикова)

Главный научный сотрудник, д.б.н., профессор

«7» 05 2021г. Ризванов (А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор каф. генетики

«7» 05 2021г. Чернов (В.М. Чернов)

Казань – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Донорство митохондрий мезенхимальными стволовыми клетками .	11
1.2 Внеклеточные везикулы: классификация, состав	14
1.3. Биологическая активность микровезикул	19
1.4 Способы получения везикул	23
1.4.1 Методы выделения и очистки внеклеточных везикул	24
1.4.2 Методы продукции мембранных везикул	28
1.5 Применение мембранных везикул, индуцированных с помощью цитохалазина В	30
1.6 Заключение по обзору литературы	32
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1 Выделение мезенхимальных стволовых клеток из подкожной жировой ткани человека и мыши.....	34
2.2 Культивирование и пассирование клеточных культур.....	34
2.3 Выделение естественных и индуцированных цитохалазином В микровезикул.....	35
2.3.1 Выделение естественных микровезикул (eMB) мезенхимальных стволовых клеток.....	35

2.3.2 Стандартный протокол выделения МВ-ЦВ МСК с использованием цитохалазина В	36
2.3.3 Модифицированный протокол выделения индуцированных цитохалазином В микровезикул (МВ-ЦВ) из мезенхимальных стволовых клеток	37
2.4 Выделение тотального белка.....	37
2.5 Измерение концентрации белка методом бицинхониновой кислоты	38
2.6 Пробоподготовка индуцированных микровезикул и проведение сканирующей электронной микроскопии.....	39
2.7 Пробоподготовка индуцированных микровезикул и проведение трансмиссионной электронной микроскопии.....	40
2.8 Приготовление мембранных везикул для анализа методом динамического рассеяния света.....	40
2.9 Окрашивание митохондриальными красителями.....	41
2.10 Окрашивание мембранным/ядерным красителем.....	42
2.11 Обработка мезенхимальных стволовых клеток антимицином А.....	43
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	45
3.1 Характеристика морфологии и размера естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток.....	45
3.1.1. Оценка морфологии и размера микровезикул методом сканирующей электронной микроскопии	45
3.1.2. Оценка размера микровезикул методом динамического рассеяния света	49

3.2 Сравнительный анализ выхода естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток	51
3.3 Оценка тотальной концентрации белка естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток.....	53
3.4 Оценка митохондриального состава естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток	54
3.5 Визуализация митохондрий методом трансмиссионной электронной микроскопии	58
3.6 Создание модели митохондриальной дисфункции <i>in vitro</i> и оценка способности МВ-ЦВ МСК восстанавливать митохондриальную функцию в клетках-реципиентах.....	61
ВЫВОДЫ.....	67
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	68

ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальные заболевания, а также заболевания, связанные/сопровождающиеся пониженной активностью митохондрий, представляют серьезную клиническую и социально-экономическую проблему, поскольку приводят к инвалидизации трудоспособного населения. При нарушении митохондриальной функции в большей степени страдают клетки головного мозга, скелетной мускулатуры, сердца, печени, почек, эндокринной и дыхательной систем (Kim *et al.*, 2018). В настоящее время существует проблема восстановления митохондриальной функции клеток организма, поскольку не разработана заместительная терапия для взрослых людей, а лечение носит симптоматический характер.

Основная сложность в терапии митохондриальной дисфункции – это доставка лекарственных средств в дефектные или поврежденные митохондрии. Лекарственному препарату необходимо преодолеть цитоплазматическую мембрану клетки, а также двухслойную мембрану, окружающую митохондрии. Поэтому поиск эффективного и неиммуногенного вектора для доставки терапевтических препаратов и/или функционально активных митохондрий является актуальной задачей.

Доставка функционально активных митохондрий непосредственно в клетки человека является перспективным способом терапии различных митохондриальных заболеваний. Существует достаточно большое количество исследований, посвященных межклеточному переносу митохондрий для терапии митохондриальной дисфункции (Babenko *et al.*, 2018; Heyck *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Murray, Krasnodembskaya, 2019; Nakamura *et al.*, 2020; Paliwal *et al.*, 2018). Так как даже одна перенесенная функционально активная митохондрия может размножиться в клетке-реципиенте (Hill *et al.*, 2014).

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются перспективными кандидатами для донорства митохондрий, так как с их помощью можно получать изолированные митохондрии или же осуществить трансплантацию клеток с функционально активными митохондриями в организм реципиента (Islam *et al.*, 2012; Robicsek *et al.*, 2018). Репаративный потенциал МСК может быть напрямую связан с горизонтальным переносом митохондрий между клетками (Rustom, 2016). Однако клеточная терапия несет угрозу неограниченного деления, что ограничивает ее широкое применение.

Альтернативным инструментом терапии являются внеклеточные везикулы (ВВ) – производные клеток, которые осуществляют межклеточный транспорт в организме, имеют свою собственную мембрану, рецепторы и несут в своем составе биологически активный груз клеток-доноров (белки, липиды, нуклеиновые кислоты) (Gomzikova *et al.*, 2019). ВВ могут также переносить и целые органеллы: митохондрии (Islam *et al.*, 2012), рибосомы (Court *et al.*, 2008) и протеасомы (Yu *et al.*, 2014). В ряде исследовательских работ был показан терапевтический эффект переноса функционально активных митохондрий внутри ВВ на модели острого повреждения легких (Islam *et al.*, 2012), на мышевой модели фокальной церебральной ишемии (Hayakawa *et al.*, 2016), при окислительном стрессе (Phinney *et al.*, 2015), на мышевой модели аутоиммунного энцефаломиелита (Peruzzotti-Jametti *et al.*, 2021). Однако ограничивающим фактором широкого клинического применения ВВ является трудоемкость их получения и низкий выход продукта (Gomzikova, Rizvanov, 2017). Поэтому поиск эффективного способа доставки функционально активных митохондрий в клетки и ткани организма с целью восстановления биоэнергетической потребности поврежденных клеток является актуальной задачей.

Сотрудниками нашей лаборатории разработан способ высокопродуктивного получения мембранных везикул с применением

цитохалазина В из мезенхимальных стволовых клеток (МВ-ЦВ МСК). Ранее нами было обнаружено, что МВ-ЦВ содержат генетический материал митохондрий (ген цитохромоксидазы I) (Гомзикова М. О., 2016), а также способны заключать и доставлять в клетки-реципиенты целые функционально активные митохондрии (Патент № 2727540). Однако сравнительный анализ естественных внеклеточных везикул и индуцированных цитохалазином В мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток, а также сравнение процентного содержания в их составе функционально активных митохондрий до настоящего времени проведены не были.

В этой связи **целью** нашей работы явилась характеристика и сравнительный анализ естественных микровезикул (eMB) и индуцированных цитохалазином В мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток (МВ-ЦВ МСК).

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

1. Выделить и охарактеризовать морфологию и размер естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток;
2. Провести сравнительный анализ выхода естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток;
3. Провести сравнительный анализ тотальной концентрации белка естественных и индуцированных микровезикул мезенхимальных стволовых клеток;
4. Оценить частоту включения митохондрий в состав eMB и МВ-ЦВ МСК;
5. Оптимизировать процедуру выделения МВ-ЦВ МСК, содержащих митохондрии, и визуализировать митохондрии методом трансмиссионной электронной микроскопии;

6. Создать модель митохондриальной дисфункции *in vitro* и оценить способность МВ-ЦВ МСК восстанавливать митохондриальную функцию в клетках-реципиентах.

При выполнении этого пункта необходимо учесть, что введение в культуру клеток-реципиентов МБ-ЦВ МСК не всегда приводит к восстановлению функций, нарушенных в клетках-доноров. На данный момент времени известны случаи, когда введение МБ-ЦВ МСК в клетки-реципиенты не восстанавливает функции, нарушенные в клетках-донорах (Балакирев, Гусев, Чеканова, 2010). Важно отметить, что для восстановления нарушенной функции в клетках-реципиентах необходимо использовать не только МБ-ЦВ МСК, но и другие методы, включая генетическую инженерию, введение в клетки-реципиенты генов, кодирующих белки, отсутствующие в клетках-реципиентах, а также введение в клетки-реципиенты генов, кодирующих белки, способные восстанавливать функции, нарушенные в клетках-реципиентах (Балакирев, Гусев, Чеканова, 2010).

В этом пункте можно изучить роль митохондрий в восстановлении нарушенных функций в клетках-реципиентах. Для этого можно использовать различные методы, позволяющие изучить функции митохондрий в клетках-реципиентах, включая измерение концентрации цитохрома с-оксидазы, измерение концентрации митохондриальных белков, изучение функций митохондрий с помощью генетической инженерии, введение в клетки-реципиенты генов, кодирующих белки, способные восстанавливать нарушенные функции в клетках-реципиентах, а также введение в клетки-реципиенты генов, кодирующих белки, способные восстанавливать нарушенные функции в клетках-реципиентах (Балакирев, Гусев, Чеканова, 2010). Важно отметить, что для восстановления нарушенных функций в клетках-реципиентах необходимо использовать не только МБ-ЦВ МСК, но и другие методы, включая генетическую инженерию, введение в клетки-реципиенты генов, кодирующих белки, отсутствующие в клетках-реципиентах, а также введение в клетки-реципиенты генов, кодирующих белки, способные восстанавливать нарушенные функции в клетках-реципиентах (Балакирев, Гусев, Чеканова, 2010).



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Курбангалеева Сирина Васильевна

Самоцитирование

рассчитано для: Курбангалеева Сирина Васильевна

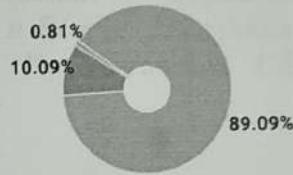
Название работы: Характеристика и сравнительный анализ естественных и индуцированных микровезикул
мезенхимальных стволовых клеток

Тип работы: Магистерская диссертация

Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	10.09%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	89.09%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.81%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 18.05.2021

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ;
Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU
(EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль
поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU;
Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов;
Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович

ФИО проверяющего

Дата подписи:

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.