

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

**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Направление: 06.03.01 – биология

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НА ФОНЕ ВНУТРИВЕННОГО
ВВЕДЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МСК**

Работа завершена:

«31» 05 2021 г.

(М.П. Ахмет)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

ст. преподаватель

кафедры генетики

«01» 06 2021 г.

(Л.Г. Тазетдинова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«01» 06 2021 г.

(В.М. Чернов)

Казань – 2021

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Семейство холинэстераз.....	7
1.2 Бутирилхолинэстеразы	8
1.3 Функция бутирилхолинэстераз.....	13
1.3.1 Детоксикация	15
1.3.2 Гидролиз ацетилхолина	16
1.3.3 Жировой обмен	17
1.3.4 Связывание и утилизация полипролин-богатых пептидов	18
1.4. Роль БуХЭ в болезни Альцгеймера	18
1.5. Применение БуХЭ в клинической практике.....	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Объект и материалы исследования	24
2.2 Клеточные линии.....	24
2.3 Выделение и культивирование кМСК-ЖТ.....	25
2.3.1 Пассирование кМСК-ЖТ	26
2.3.2 Криоконсервация кМСК-ЖТ	27
2.5 Работа с бактериальными клетками.....	27
2.5.1 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 α	28
2.5.2 Генетическая трансформация клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 α	29
2.5.3 Приготовление бактериальной культуры <i>E. Coli</i> для долговременного хранения	30
2.5.4. Выделение плазмидной ДНК из культуры <i>E. coli</i> DH5 α	30
2.5.5 Рестрикционный анализ плазмидных конструкций.....	34
2.6 Генетическая модификация клеток кМСК-ЖТ с помощью плазмидной ДНК pRc/CMV-hBCNE	35

2.6.1 Оптимизация генетической модификации клеток HEK293T, кМСК-ЖТ	35
2.7. Генетическая модификация HEK293T и кМСК-ЖТ TurboFect.....	36
2.8 Анализ экспрессии гена hBCHE в кМСК-ЖТ после модификации плазмидной ДНК pRc/CMV-hBCHE	37
2.9 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	38
2.10 Введение генетически модифицированных кМСК-ЖТ-hBCHE лабораторным крысам	39
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1 Трансформации клеток <i>E. Coli</i> с помощью плазмидной ДНК pRc/CMV-hBCHE.....	40
3.2 Генетическая модификация клеток HEK293T, кМСК-ЖТ и МКПК с помощью плазмидной ДНК pRc/CMV -hBCHE	42
3.2.1 Оптимизация генетической модификации клеток с помощью Turbofect и Lipofectamine 3000	42
3.2.2 Генетическая модификация клеток HEK293T и кМСК-ЖТ с помощью Turbofect	43
3.3 Анализ экспрессии гена hBCHE в кМСК-ЖТ после модификации плазмидной ДНК pRc/CMV-hBCHE	45
3.2.3 Изменение активности БуХЭ в плазме крыс после введения кМСК-ЖТ-hBCHE	45
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49

ВВЕДЕНИЕ

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – сериновая гидролаза, одна из двух холинэстераз человека, способная стехиометрически связываться с разнообразными токсинами, фосфорорганическими соединениями и пестицидами, одновременно ингибируя ацетилхолинэстеразу (АХЭ). БуХЭ обнаруживается почти во всех органах и тканях, в частности дыхательных органах, печени, желудочно-кишечном тракте, а также в сыворотке крови у всех млекопитающих, в том числе и человека. Несмотря на то, что физиологическая функция БуХЭ до конца не ясна, есть данные в мировой литературе, что она играет ключевую роль в поддержании активности нейромедиаторов ацетилхолина в нервно-мышечных окончаниях, а также в центральной нервной системе.

Недавние исследования показали, что активность ферментов БуХЭ и АХЭ в плазме (сыворотке), лейкоцитах и эритроцитах повышена у пациентов с болезнью Альцгеймера, сахарным диабетом, гипертонией, инсулинерезистентностью и гиперлипидемией.

Высокая реакционная способность ингибирования токсинов, делает БуХЭ человека перспективным кандидатом на роль биологического антидота, действующего таргетно на множества фосфорорганических ядов. Однако, препартивное и промышленное получение рекомбинантной БуХЭ, достаточного для инъекционного введения, затруднено из-за ее низкой экспрессии в клетках организма. Таким образом, исследование и получение БуХЭ является актуальной задачей современной медицины для интоксикации организма человека при попадании в ткани ядовитых веществ.

Цель работы: Анализ ферментационной активности бутирилхолинэстеразы на фоне внутривенного введения генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани крысы, экспрессирующих бутирилхолинэстеразу в хвостовую вену лабораторным крысам.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие
Задачи:

1. Получить в препаративных количествах плазмидную ДНК pRc/CMV-hBCHE, содержащую нуклеотидную последовательность гена рекомбинантного белка бутирилхолинэстеразы (БуХЭ);
2. Провести рестрикционный анализ выделенной плазмидной конструкции pRc/CMV-hBCHE;
3. Выделить мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани крысы (кМСК-ЖТ);
4. Провести генетическую модификацию кМСК-ЖТ и НЕК293T плазмидной ДНК, кодирующей БуХЭ (pRc/CMV-hBCHE) и контрольной плазмидой pEGFP-N2, экспрессирующих ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка EGFP;
5. Провести оценку эффективности трансфекции культур клеток по флуоресценции контрольных образцов, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2;
6. Анализ ферментационной активности бутирилхолинэстеразы в плазме крыс на фоне введения в хвостовую вену крысы кМСК-ЖТ-hBCHE *in vivo*.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Ахмет Маржан Пайызханкызы

Самоцитирование

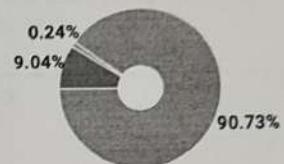
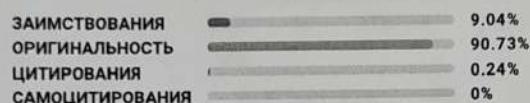
рассчитано для: Ахмет Маржан Пайызханкызы

Название работы: Ахмет Маржан 702 группа

Тип работы: Не указано

Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 01.06.2021

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:

01.06.2021

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.