

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: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО И РЕГЕНЕРАТИВНОГО
ПОТЕНЦИАЛА ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ПОЛУЧЕННЫХ
ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Работа завершена:

"05" 06 2019 г.

(Е.А. Алексеева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
профессор, д.б.н.,
должность, зав. отделом

"05" 06 2019 г.

(А. А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

Профессор, д.б.н.

"05" 06 2019 г.

(В.М. Чернов)

Казань-2019

Оглавление	
Введение	3
Глава 1. Обзор литературы.	7
1.1 Патогенез рассеянного склероза.	7
1.2 Мезенхимные стволовые клетки.....	15
1.3 Фактор роста нервов.....	18
Глава 2 Материалы и методы	23
2.1 Объект исследования.....	23
2.2 Протокол создания модели ЭАЭ.....	24
2.3 Используемые клеточные линии:	24
2.4 Пассирование МСК из жировой ткани мыши	25
2.5 Криоконсервация МСК из жировой ткани мыши	26
2.6 Трансформация лентивирусов.....	27
2.7 Получение микровезикул с помощью цитохалазина В	27
2.8 Электронно-микроскопический метод.....	28
2.9 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	29
2.10 Мультиплексный анализ	29
Глава 3. Результаты и обсуждение	31
3.1 Световая микроскопия.	31
3.2 Электронная микроскопия.....	34
3.3 Полимеразная цепная реакция.	39
3.4 Мультиплексный анализ	41
Выводы:	44
Список литературы.....	45

Введение

Рассеянный склероз (РС) является хроническим аутоиммунным воспалительным и нейродегенеративным заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), приводящем к тяжелой инвалидизации. По данным официальной статистики в настоящее время более 2 млн людей в мире являются больными с рассеянным склерозом. Из них около 200 тысяч являются жителями России [1].

Характерные особенности заболевания включают демиелинизирующие участки в белом веществе спинного мозга и головного мозга, которые приводят к нарушениям нервной передачи. Воспалительный процесс сопровождается повышением уровня растворимых воспалительных цитокинов. Современная терапия направлена лишь на подавление иммунной реакции и замедление развития заболевания. Одним из направлений в поиске нового эффективного лечения РС может быть клеточная терапия. МСК и их микровезикулы представляются интересными кандидатами для использования в качестве терапевтического инструмента в ЦНС. Клетки, синтезирующие цитокины и нейропротекторные молекулы, способствуют уменьшению или увеличению скорости дегенерации нейронов [2]. Использование мезенхимных стromальных клеток (МСК) в этом качестве основано на том, что при определенных условиях они обладают выраженной иммуносупрессорной активностью и их трансплантация сопровождается облегчением симптомов целого ряда хронических дегенеративных заболеваний [3]. Кроме того МСК экспрессируют множество нейропротекторных факторов, способствующих выживанию нейронов и росту аксонов, а также целого ряда цитокинов, модулирующих нейровоспаление и иммунный ответ. Кроме того МСК можно достаточно легко изолировать не только из костного мозга, но и из других источников, таких как жировая ткань а также пульпа зуба, и эти клетки можно использовать аутологично в течении жизни пациента. По данным литературы трансплантация МСК может оказывать терапевтическое воздействие на патогенез и прогрессирование

нейродегенеративных расстройств [3]. Микровезикулы МСК обладают теми же свойствами, что и сами клетки, способны паракринно воздействовать на окружающие ткани-мишени. Цитиохолазин-индуцированные микровезикулы также представляют большой интерес, т.к. их можно получать в промышленных масштабах и использовать как переносчик для транспортировки терапевтических генов. При этом риск опухолеобразования практически отсутствует, по сравнению с использованием самих клеток МСК. Исследование терапевтических свойств микровезикул и разработка генной терапии на основе микровезикул, таким образом, является актуальной задачей [4].

Растет интерес к сложным отношениям между нервной и иммунной системами и тому, как ее изменение может влиять на гомеостаз и приводить к развитию воспалительных заболеваний. Ключевым посредником между этими двумя системами является фактор роста нервов (nerve growth factor - NGF), который может влиять как на функцию нейрональных клеток, так и на активность иммунных клеток. Повышенная экспрессия NGF, описанная в воспаленных тканях многих заболеваний, может регулировать иннервацию и нейронную активность периферических нейронов, индуцируя высвобождение иммуноактивных нейропептидов и нейротрансмиттеров, но также может напрямую влиять на врожденные и адаптивные иммунные ответы [5].

При рассеянном склерозе переносимые кровью иммунные клетки проникают в паренхиму головного мозга и провоцируют разрушение миелина. Области демиелинизации разграничиваются Т-лимфоцитами и моноцитами в клеточных инфильтратах; эти клетки играют роль в экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите и экспериментальном аутоиммунном невrite. Уровень цитокинов, а также маркеров активации инфламмасом, таких как NALP3, каспаза 1 являются показателями нейровоспаления в мозге [6]. В этой связи исследование терапевтического потенциала микровезикул и их влияние на иммунные и воспалительные процессы, а также на процессы нейрогенерации является чрезвычайно актуальным.

Цель работы - изучение терапевтических возможностей индуцированных микровезикул нативных и модифицированных фактором роста нервов (NGF) мезенхимных стромальных клеток мыши на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

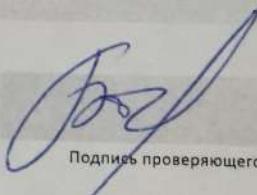
Задачи исследования:

- 1 - Изучить цитокиновый профиль в тканях головного мозга в условиях введения нативных и модифицированных NGF индуцированных микровезикул МСК.
- 2 - Изучить экспрессию генов, задействованных в нейровоспалении в вышеописанных условиях.
- 3 - Провести гистологическое исследование тканей головного мозга при этих воздействиях.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Алексеева Екатерина Александровна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	на пл
Название файла	на пл.docx
Процент заимствования	1,48%
Процент цитирования	0,28%
Процент оригинальности	98,25%
Дата проверки	14:53:21 04 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	06.06.19.
	 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.