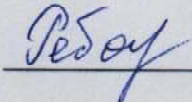


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление подготовки: 06.04.01– Биология

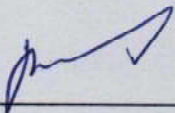
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
МУЛЬТИЦИСТРОННЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ
ИНДУКЦИИ АНГИОГЕНЕЗА

Студент 2 курса

" 6 " 05 2020 г.  (Ю.А. Ребольская)


Научный руководитель

д.б.н., профессор

" 6 " 05 2020 г.  (А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 6 " 05 2020 г.  (В.М. Чернов)

Казань–2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Генная терапия	9
1.2 Векторы в генной терапии	9
1.2.1 Вирусные векторы.....	10
1.2.2 Невирусные векторы	11
1.3 Методы доставки плазмид в клетки	13
1.4 Иммуортализованная линия клеток НЕК-293Т, полученная из эмбриональной почки человека.....	17
1.5 Ангиогенный процесс	19
1.5.1 Типы ангиогенеза	20
1.6. Факторы роста	22
1.6.1 Фактор роста фибробластов (FGF2).....	22
1.6.2 Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Выделение плазмидных конструкций	27
2.2 Рестрикционный анализ.....	28
2.3 Культивирование культуры клеток НЕК-293Т.....	28
2.4 Трансфекция культуры клеток НЕК-293Т	29
2.5 Сбор супернатанта и лизата трансфицированных клеток.....	29
2.6 Выделение мРНК.....	30

2.7 Синтез кДНК	31
2.8 Количественная оценка экспрессии мРНК с помощью ПЦР в реальном времени	32
2.9 Твердотельный иммуноферментный анализ (ИФА)	33
2.10 Мультиплексный анализ (xMAP) цитокинов, хемокинов и факторов роста.....	35
2.11 Формирование капиллярно-подобных трубочек на матрикеле	36
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	38
3.4 Протеомное профилирование генетически модифицированных и нативных клеток НЕК-293Т	49
3.5 Влияние VEGF и FGF2, экспрессируемых трансфицированными клетками, на формирование клетками HUVEC капиллярно-подобных структур	50
ВЫВОДЫ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	54

ВВЕДЕНИЕ

В наши дни широко распространены ишемические заболевания сердечно-сосудистой системы. Ишемия является серьезным состоянием, при котором приток крови к любой ткани или органу в организме уменьшается или останавливается. Во время ишемии блокируется один из кровеносных сосудов, снабжающих мозг или другие органы кровью и кислородом. Это может быть вызвано тромбами, бляшками или пузырьками воздуха. Нарушение кровотока препятствует работе органов, что может вызвать опасные для жизни проблемы, такие как сердечные приступы или инсульты. Курение, чрезмерное употребление алкоголя, высокое кровяное давление, высокий уровень холестерина, ожирение, диабет и старость (больше 60 лет) являются факторами, повышающими риск возникновения ишемических заболеваний [Health&Medicine, 2019].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2017 год все сердечно-сосудистые заболевания в совокупности вызывают около 17,9 миллиона случаев смерти в год во всем мире. Только на ишемическую болезнь сердца было зарегистрировано около 9,43 миллиона случаев смерти [Elflein, 2019]. Ежегодно в России диагностируется около 500000 случаев ишемического инсульта (ИИ). Заболеваемость ИИ в РФ составляет 3,48 на 1000 населения в год, в Европе – 0,38-0,47 на 1000 человек. И только 8% выживших после острых нарушений мозгового кровообращения могут вернуться к прежней жизни [Суслина с соавт., 2013; Ахмедов с соавт., 2013; Кадыков, Шахпаронова, 2014].

Традиционными методами лечения ишемических заболеваний являются медикаментозная терапия и хирургические методы (в том числе эндоваскулярная хирургия). Однако последние могут повлечь за собой множество осложнений. Например, тромбозы, тромбоэмболия, инсульт интраоперационный и послеоперационный, реперфузионный отек мозга. К недостаткам также можно отнести то, что операция требует длительного

восстановительного процесса и последующей медикаментозной терапии. В связи с этим, генная терапия для индукции терапевтического ангиогенеза является интересной и перспективной альтернативой традиционным методам лечения.

Принцип терапевтического ангиогенеза заключается во введении ангиогенных факторов, которые стимулируют постнатальный рост новых кровеносных сосудов для восстановления циркуляции в ткани.

Первые пилотные исследования генной терапии с использованием терапевтических факторов (VEGF, FGF-2, HGF, PDGF, SDF-1 и др.) показали обнадеживающие результаты на моделях ишемии скелетных мышц у животных и человека. Однако недавние крупные рандомизированные плацебо-контролируемые исследования не смогли достоверно подтвердить эффективность генной терапии различными ангиогенными факторами [Shishehbor et al., 2019; De Haro et al., 2009; Miao et al., 2014].

Возможными причинами, лежащими в основе неэффективности генной терапии ангиогенеза, могут быть распространенность у пациентов сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний, гиперлипидемии, диабет, пожилой возраст пациентов и введение только единичных терапевтических факторов. Поэтому была предложена стратегия комбинированной генной терапии с использованием нескольких проангиогенных факторов одновременно [Miao et al., 2014; Makarevich et al., 2018]. Совместная доставка VEGF165 с ангиопоэтином-1 [Liu et al., 2007; Flugelman et al., 2019], SDF-1 α [Yu et al., 2007], PDGF-B [Shi, 2018] или HGF [Makarevich et al., 2012] показывала улучшенный ангиогенный ответ по сравнению доставкой только единичных факторов. Синергетические эффекты между VEGF и FGF2 показаны в широком спектре исследований при индукции ангиогенеза *in vitro* [Li et al., 2016; Bai et al., 2014; Салафутдинов и др., 2011] и *in vivo* [Lee et al., 2007; Kim et al., 2015; Yang et al., 2018]. Таким образом, доставка нескольких генов в культивируемые клетки или ткани может стать незаменимым инструментом многих исследований в научной или клинической практике.

В связи с этим в этом проекте были созданы и протестированы мультицистронные генетические конструкции, содержащие 2А-пептидные последовательности пикорновирусов, обеспечивающие коэкспрессию генов и биосинтез рекомбинантных белков – ключевых индукторов ангиогенеза (VEGF и FGF2). Также были получены данные о расщеплении, функциональности и иммуногенности (цитокиновый профиль) синтезируемых рекомбинантных белков, находящихся в составе мультицистронной конструкции, связанных через 2А-пептидные последовательности пикарновирусов.

Цель работы: исследовать влияние мультигенных рекомбинантных конструкций на секретомный и протеомный профиль клеток, а также на процессы индукции ими ангиогенеза *in vitro*.

Задачи исследования:


1. Выделить, очистить и охарактеризовать мультигенные моноцистронные плазмидные конструкции.
2. Оценить экспрессию рекомбинантных генов и белков (VEGF, FGF2 и DsRed) трансфицированными клетками человека.
3. Охарактеризовать влияние генетической модификации плазмидными конструкциями на биосинтез и секрецию клетками человека цитокинов, хемокинов и факторов роста *in vitro*.
4. Получить сравнительные 2D-белковые карты генетически модифицированных и нативных клеток человека.
5. Изучить влияние, ангиогенных факторов VEGF и FGF2, секретируемых модифицированными клетками, на формирование капилляро-подобных структур эндотелиальными клетками вены пуповины человека и стволовыми клетками из жировой ткани человека.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Ребольская Юлия Александровна
Подразделение	
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Ребольская_ВКР2020.docx
Название файла	Ребольская_ВКР2020.docx
Процент заимствования	5.65 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.81 %
Процент оригинальности	93.53 %
Дата проверки	14:47:48 22 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по elibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	22.05.2020  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.