

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

РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ  
РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ  
АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН  
АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А

Работа завершена:

«7» 05 2021 г.  (Исса Шаза)

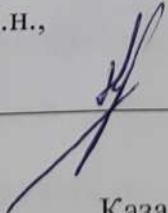
Работа допущена к защите:

Научный руководитель

(доцент, к.б.н.)

«7» 05 2021 г.  (В. В. Соловьева)

Заведующий кафедрой, д.б.н.,

«7» 05 2021 г.  (В. М. Чернов)

Казань – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1.1 Лизосомные болезни накопления.....	9
1.2 Метахроматическая лейкодистрофия.....	9
1.3 Молекулярные механизмы МЛД.....	10
1.4 Формы МЛД.....	11
1.5 Диагностика МЛД.....	13
1.6 Методы терапии МЛД.....	14
1.6.1 Ферментно-заместительная терапия.....	14
1.6.2 Трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.....	15
1.6.3 Трансплантация клеток пуповинной крови (ТКПК).....	16
1.6.4 Другие клеточные подходы.....	17
1.6.5 Генная терапия.....	18
<b>Заключение:</b> .....	22
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	23
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	23
2.1 Объект, схема и методика исследования.....	23
2.2 Описание плазмидных векторов.....	23
2.3 Проведение генетической трансформации клеток <i>E. coli</i> .....	24
2.4 Криоконсервация бактериальной культуры.....	25
2.5 Выделение плазмидной ДНК.....	26
2.6 Электрофорез в агарозном геле.....	26
2.7 Выделение мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани свиньи ..	27

2.8 Пассирование клеточных линий.....	28
2.9 Криоконсервация клеточных линий.....	28
2.10 Получение рекомбинантных аденоассоциированных вирусов AAV-ARSA .....	29
2.11 Протокол генетической модификации клеток для <i>in vivo</i> исследований .....	30
2.12 Вестерн блот анализ.....	30
2.13 Лабораторные животные и условия содержания.....	31
2.14 Забор материала .....	32
2.15 Определение общего содержания белка с помощью бицинхониновой кислоты.....	33
2.16 Подтверждение ферментативной активности арилсульфатазы А .....	33
2.17 Оценка безопасности терапии .....	33
2.18 Иммуноцитохимический анализ.....	33
2.19 Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) .....	34
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>35</b>
3.1 Анализ генетической конструкции рAAV-ARSA .....	35
3.2 Анализ экспрессии белка ARSA.....	35
3.3 Анализ ферментативной активности ARSA в плазме и спинномозговой жидкости свиней после введения AAV9-ARSA и MCK-ARSA .....	36
3.4 Иммуногистохимический анализ экспрессии ARSA в органах нервной системы свиней после введения AAV9-ARSA и MCK-ARSA .....	38
3.5 Определение количества мРНК трансгена в органах нервной системы свиней после введения AAV9-ARSA и MCK-ARSA .....	45

3.6 Определение ферментативной активности ARSA в органах нервной системы свиней после введения AAV9-ARSA и MCK-ARSA .....	47
3.7 Определение биохимических показателей в сыворотке крови свиней после введения AAV9-ARSA и MCK-ARSA.....	49
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	51
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	52

## ВВЕДЕНИЕ

Метахроматическая лейкодистрофия (МЛД) — наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дефицитом фермента арилсульфатазы А (англ. arylsulfatase A, ARSA) (OMIM 250100) или белка-активатора сапозина В (англ. saposin B, SapB), в результате чего происходит накопление сульфатидов в нервной и других тканях организма. Дефицит фермента возникает вследствие различных мутаций гена *ARSA* или *SAPB*. Тяжесть клинических признаков при МЛД определяется остаточной активностью фермента, зависящей от типа мутации. В настоящее время не существует эффективного лечения МЛД. Описаны клинические случаи применения субстрат-редуцирующей терапии, трансплантации костного мозга или пуповинной крови, однако терапевтическая эффективность данных методов остается недостаточной для предотвращения усугубления неврологических нарушений у пациентов с МЛД. Обнадешивающие результаты получены с использованием методов генной терапии для доставки генов дикого типа, кодирующих фермент ARSA.

В настоящей работе предлагается способ генной терапии метахроматической лейкодистрофии с использованием рекомбинантного репликационно-дефектного аденоассоциированного вируса (ААВ) 9-го серотипа.

**Целью** работы являлась разработка метода генной терапии МЛД с применением рекомбинантного репликативно-дефектного ААВ 9 серотипа, кодирующего кДНК гена *ARSA* человека (AAV9-ARSA).

В работе решались следующие **задачи**:

1) Разработать и синтезировать плазмидную конструкцию рAAV-ARSA, кодирующую фермент ARSA. Получить в препаративных количествах рекомбинантный AAV9-ARSA.

2) Выделить мезенхимные стволовые клетки (МСК) из жировой ткани свиньи и провести их генетическую модификацию рекомбинантным AAV9-ARSA.

3) Провести интратекальное и внутривенное введение AAV9-ARSA или внутривенное введение MCK, сверхэкспрессирующих ARSA (MCK-ARSA) свиньям дикого типа.

4) Провести оценку терапевтической эффективности и безопасности введения AAV9-ARSA и MCK-ARSA.

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Исса Шаза -

Самоцитирование

рассчитано для: Исса Шаза -

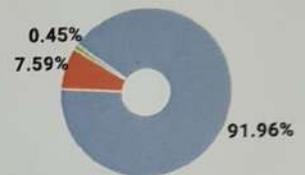
Название работы: Разработка и анализ функциональности рекомбинантной генетической конструкции на основе аденоассоциированного вируса, экспрессирующей ген арилсульфатазы А

Тип работы: Магистерская диссертация

Подразделение: КФУ, ИФМиБ

### РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	7.59%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	91.96%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.45%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 20.05.2021

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.