

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: 06.04.01 (ОКСО 020400.62) – биология

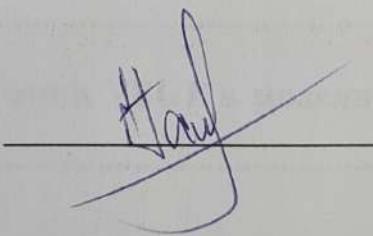
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

Работа завершена:

"7" 05 2021 г.

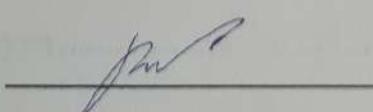


(Д. Р. Галиева)

Работа допущена к защите:

д. б. н., проф.

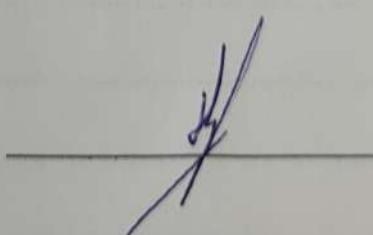
"7" 05 2021 г.



(Ризванов А. А.)

д. б. н., проф.

"7" 05 2021 г.



(В. М. Чернов)

Казань–2021

СОДЕРЖАНИЕ

		стр.
ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	СОКРАЩЕНИЙ	И
		5
ВВЕДЕНИЕ		6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....		8
1.1 Понятие генной терапии. Векторы для генной терапии, их сравнительная характеристика.....		8
1.1.1 Плазмидные векторы: преимущества и недостатки.....		11
1.1.2 Особенности аденоовирусных векторов		13
1.2 Хроническая ишемия нижних конечностей		16
1.3 Терапевтический ангиогенез.....		18
1.4 Сосудистый эндотелиальный фактор роста		21
1.4.1 Влияние VEGF на регенерацию и трофику мышечной и нервной ткани.....		26
1.4.2 Применение генной терапии VEGF в модели у крупных животных		29
1.5 Ангиогенин.....		31
1.6 Глиальный нейротрофический фактор		32
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....		35
2.1 Амплификация аденоовируса		35
2.3 Очистка аденоовируса		35
2.4 Титрование аденоовируса		36
2.5 Работа с животными		36
2.6 Выделение мРНК		37

2.7 Синтез кДНК	38
2.8 ПЦР-РВ	38
2.9 Иммуноблоттинг.....	40
2.10 Подготовка образцов тканей для гистологического исследования..	40
2.11 Гистохимическое исследование.....	41
2.12 Флуоресцентная иммуногистохимия	41
2.13 Морфометрический анализ и статистическая обработка результатов	42
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Получение рекомбинантных аденоовирусов	44
3.2 Оценка экспрессии мРНК генов vegf165a, gdnf, ангиогенина в ишемизированной мышце после прямой генной терапии различными комбинациями Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин.....	45
3.3 Оценка синтеза проангидиогенных факторов в ишемизированной мышце после прямой генной терапии различными комбинациями Ad5 VEGF165A, Ad5 GDNF, Ad5 ангиогенин на крысах и pVEGF на свиньях.	47
3.4 Оценка репаративного миогенеза в ишемизированный мышце после прямой генной терапии различными комбинациями Ad5 VEGF165A, Ad5 GDNF, Ad5 ангиогенин на крысах и pVEGF на свиньях.....	47
3.5 Оценка ангиогенеза в ишемизированый мышце после прямой генной терапии различными комбинациями Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин на крысах и pVEGF на свиньях.....	49
ВЫВОДЫ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	55

ВВЕДЕНИЕ

Облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей, приводящие к развитию хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) в настоящее время являются распространенной патологией в популяции людей старше 50 лет. Реконструктивные операции на ишемизированных сосудах не всегда возможны из-за высокого риска возникновения осложнений, связанных с сопутствующими заболеваниями (особенно в пожилом возрасте), или технически невозможны вследствие «многоэтажного» поражения сосудов, то разработка способов стимуляции ангиогенеза является крайне важной задачей регенеративной медицины и сосудистой хирургии, в частности.

Перспективным направлением является стимуляция ангиогенеза посредством введения плазмидных и вирусных векторов, кодирующих гены ангиогенных факторов [Журавлева с соавт., 2015] Основу лечебной тактики составляет стимуляция ангиогенеза в ишемизированных тканях ангиогенным фактором - сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF). VEGF принимает участие как в васкулогенезе, так и ангиогенезе. Его биологические эффекты заключаются в стимуляции миграции эндотелиальных клеток, их инвазию в базальную мембрану, пролиферацию, выживание и формирование фенестр, а также индукцию вазодилатации.

Целью данной работы являлась оценка влияние адено-вирусных конструкций, несущих гены проангиогенных факторов роста, на ангиогенез в ишемизированной мышце.

Цель: Оценить использование генных препаратов, созданных на основе аденоовирусных конструкций Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин на крысах и влияние pVEGF препарата на икроножную и большеберцовую мышцы свиней.

Задачи:

1. Получить рекомбинантные аденоовирусные конструкции Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин.
2. Оценить экспрессию мРНК генов VEGF165A в ишемизированной мышце после прямой генной терапии Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин.
3. Оценить синтез проангиогенных факторов в ишемизированной мышце после прямой генной терапии Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин.
4. Оценить ангиогенез и репаративный миогенез в ишемизированный мышце после прямой генной терапии Ad5-VEGF165A, Ad5-GDNF, Ad5-ангиогенин.
5. Оценить влияние pVEGF на васкуляризацию ишемизированной и икроножной и большеберцовой мышцах свиньи.