

**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 ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ НУКЛЕОКАПСИДА И  
ГЛИКОПРОТЕИДА ВИРУСА PUUMALA В ИММУНИЗИРОВАННЫХ  
МЫШАХ IN VIVO**

**Работа завершена:**

"06" 06 2019 г.

*А.И. Колесникова*

(А.И. Колесникова)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель

Проф., чл.-кор. АН РТ

д.б.н.

"06" 06 2019 г.

*А.А. Ризванов*

(А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

Д.б.н., проф.

"06" 06 2019 г.

*В.М. Чернов*

(В.М. Чернов)

Казань–2019

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	3
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	8
1.1 Структурные компоненты хантавируса Пуумала (PUUV) .....	8
1.2 ДНК-вакцины.....	13
1.3 Особенности иммунного ответа к хантавирусам у грызунов.....	21
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	29
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	29
2.1 Выделение плазмидной ДНК pBud-PuuS-PuuM с использованием набора PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit .....	29
2.2 Электрофорез ДНК в 0.8% агарозном геле.....	29
2.3 Генетическая модификация клеток HEK293T плазмидной ДНК pBud-PuuS-PuuM.....	30
2.4 Исследование биосинтеза белков гликопротеида и нуклеокапсида вируса Пуумала <i>in vitro</i> методом иммунофлуоресцентного анализа.....	31
2.5 Иммунизация животных, забор материала .....	32
2.6 Электронная микроскопия: пробоподготовка, заливка, окрашивание...	32
2.7 Выделение РНК, кДНК и постановка ПЦР с обратной транскрипцией.	34
2.8 Иммуноферментный анализ.....	35
2.9 Метод иммуноферментных пятен (ELISpot) .....	35
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	37
3.1 Анализ выделения плазмидной ДНК в 0.8% агарозном геле .....	37
3.2 Анализ экспрессии генов нуклеокапсида и гликопротеида <i>in vitro</i> .....	37
3.3 Анализ экспрессии мРНК гена нуклеокапсида в тканях мышей .....	39
3.4 Иммуноферментный анализ .....	40
3.5 Анализ активации цитотоксических лимфоцитов .....	41
3.6 Электронная микроскопия.....	41
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	45
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	46
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	47

## ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько десятилетий расширилось понимание механизмов патогенеза и признание хантавирусной инфекции. Однако, амплитуда и масштабы вспышек хантавируса увеличиваются. Несколько новых штаммов хантавирусов с неизвестным патогенным потенциалом были идентифицированы у различных хозяев насекомоядных животных [Avsic-Zupanc, 2015].

С новыми хозяевами были обнаружены новые ареалы хантавирусов, несколько новых видов были обнаружены в Африке. В настоящее время во всем мире выявлено более 28 хантавирусов, которые вызывают различные патологии у людей, и с различными уровнями смертности, в зависимости от вида хантавируса и его географического происхождения. Случаи геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) были зарегистрированы в Европе и Азии, в то время как хантавирусные сердечно-легочные синдромы (ХЛС) наблюдаются в Северной и Южной Америке [Ermonval *et.al.*, 2016]. По последним статистическим данным на 1000 случаев ХЛС, по оценкам, ежегодно регистрируется более 100000 случаев ГЛПС во всем мире [Avsic-Zupanc, 2015].

Хантавирусы представляют собой группу РНК(-) вирусов, переносчиками которых выступают грызуны; данные вирусы относятся к роду *Hantavirus*, семейство *Bunyaviridae* [Vaheri *et.al.*, 2013; Mir, 2010]. Хантавирусы вызывают две тяжелые формы заболевания, хантавирусный легочный синдром (ХЛС) и геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) [Vaheri *et.al.*, 2013; Mir, 2010; Mustonen *et.al.*, 2013].

Заражение происходит посредством вдыхания аэрозолей или частиц пыли, зараженных вирусом, содержащихся в экскрементах грызунов. ГЛПС характеризуется острой почечной недостаточностью и геморрагическими проявлениями, которые варьируются от петехий до сильного внутреннего кровотечения. Пневмония и сердечно-сосудистая дисфункция являются симптомами ХЛС. Повышенная проницаемость микрососудистого

эндотелия, является общим эффектом хантавирусной инфекции [Klempa, 2009; Avsic-Zupanc, 2015]. Лечение хантавирусных заболеваний обычно основывается на поддерживающей терапии, такой как гемодиализ при ГЛПС [Bren *et.al.*, 1996], механическая вентиляция, экстракорпоральная мембранные оксигенация [Guilfoyle and Macnab, 2008; Wernly *et.al.*, 2011] и гемофильтрация при ХЛС [Bugedo *et.al.*, 2016] и/или шоковая терапия у обоих заболеваний [Szabo, 2017].

Основной проблемой разработки вакцин против ВГЛ является их низкая эффективность. Это может быть связано с тем, что субъединичные вакцины не способны вызывать «полноценный» иммунный ответ, что оставляет возможность для вируса избегать распознавания иммунной системой. Например, несмотря на развитие гуморального иммунного ответа, эффективность защиты при иммунизации формалин-инактивированным хантавирусом не выявлена [Cho, Howard, 1999]. Было сделано предположение, что инактивация формалином вызывает изменения в антигенном профиле вируса, таким образом, снижая защитные свойства вакцины. Другая вакцина, Хантавакс, нашедшая широкое применение в Китае, также не соответствует всем требованиям к эффективным вакцинам. Например, через год после вакцинации, серопозитивность снижалась до 40%, что требовало повторных бустерных иммунизаций [Cho *et.al.*, 2002]. Несмотря на длительные усилия ведущих американских исследовательских институтов, до сих пор не разработана эффективная вакцина против ХЛС.

В связи с отсутствием эффективных методов лечения и вакцин, гарантирующих стойкий гуморальный и клеточный иммунный ответ, при этом одобренной для использования в США и Европе, информирование общественности и меры предосторожности являются единственными способами минимизировать риск хантавирусной инфекции [Avsic-Zupanc, 2015]. Основными детерминантами, определяющими развитие гуморального и клеточного иммунного ответа, являются вирусные белки нуклеокапсида и гликопротеида оболочки.

Понимание молекулярных механизмов активации иммунного ответа *in vivo*, а также выявление ключевых маркеров воспаления на клеточном уровне является безусловной актуальной задачей.

**Цель работы** — исследование экспрессии белков нуклеокапсида и гликопротеида вируса Puumala в иммунизированных мышах *in vivo*.

**Задачи:**

- 1) Выделение плазмидной ДНК pBud-PuuS-PuuM методом щелочного лизиса с использованием набора PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit.
- 2) Исследование биосинтеза белков гликопротеида и нуклеокапсида вируса Пуумала *in vitro* методом иммунофлуоресцентного анализа.
- 3) Иммунизация лабораторных мышей препаратом плазмидной ДНК pBud-PuuS-PuuM и оценка экспрессии генов гликопротеида и нуклеокапсида в тканях животных.
- 4) Исследование гуморального и клеточного иммунного ответа мышей на введение плазмидной ДНК pBud-PuuS-PuuM.



## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Колесникова Алёна
Подразделение	КФУ, ИФМиБ
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	Исследование экспрессии белков нуклеокапсида и гликопротеина вируса Puumala в иммунизированных мышах <i>in vivo</i>
Название файла	диплом на пагиат Колесникова.docx
Процент заимствования	<b>28,48%</b>
Процент цитирования	<b>1,03%</b>
Процент оригинальности	<b>70,49%</b>
Дата проверки	<b>09:58:17 03 июня 2019г.</b>
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 5 июня 2019г.

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.  
Представленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.