

Министерство науки и высшего образования РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра генетики

Программа обучения: «Генетика»

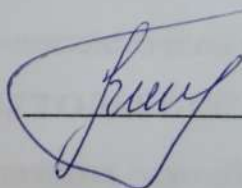
по направлению подготовки: 06.04.01 – Биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ
НА СЕКРЕТОМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Работа завершена:

«6» 05 2020 г.

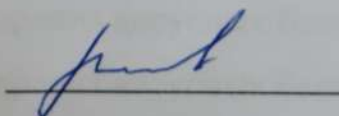


(В. А. Тепаева)

Научный руководитель

д-р биол. наук, проф.

«6» 05 2020 г.



(А. А. Ризванов)

Работа допущена к защите:

Заведующий кафедрой

д-р биол. наук, проф.

«6» 05 2020 г.



(В. М. Чернов)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Генная терапия	10
1.2 Невирусные конструкции, как система доставки нуклеиновых кислот	10
1.3 Вирусные конструкции, как система доставки нуклеиновых кислот	12
1.3.1 Ретровирусные векторы	12
1.3.2 Аденоассоциированные вирусные векторы.....	16
1.3.3 Аденовирусные векторы	18
1.4 Стволовые клетки	22
1.4.1 Стволовые клетки из жировой ткани.....	24
1.5 Стратегия терапевтического ангиогенеза.....	26
1.6 Фактор роста эндотелия сосудов.....	27
1.7 Нейтрофический фактор глиальных клеток.....	32
1.8 Нейрональная молекула межклеточной адгезии	34
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 Протеомный анализ очищенных рекомбинантных аденовирусов пятого серотипа	37
2.1.1 Ферментативный гидролиз вирусных белков в геле.....	37
2.1.2 Ферментативный гидролиз вирусных белков в растворе	37
2.1.3 Масс-спектрометрический анализ	38
2.2 Выделение и культивирование стволовых клеток из жировой ткани человека.....	40
2.3 Генетическая модификация стволовых клеток рекомбинантными аденовирусами, кодирующими терапевтические факторы (GDNF, NCAM, VEGF).....	40
2.4 Оценка экспрессии мРНК, целевых генов VEGF, GDNF, NCAM в генетически-модифицированных клетках.....	41

2.4.1 Выделение тотальной РНК из стволовых клеток жировой ткани	41
2.4.2 Синтез кДНК	42
2.4.3 Количественная оценка экспрессии мРНК с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени	43
2.5 Иммуноферментный анализ экспрессии рекомбинантных белков	43
2.6 Мультиплексный анализ супернатантов трансдуцированных и нативных клеток (xMAP)	44
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	46
3.1 LC-MS/MS- анализ очищенных рекомбинантных аденовирусов пятого серотипа, экспрессирующих EGFP или факторы роста (VEGF, GDNF, NCAM)	46
3.3 Анализ эффективности аденовирусной трансдукции	54
3.4. Оценка экспрессии генов VEGF, GDNF, NCAM генетически модифицированными клетками <i>in vitro</i>	55
3.5 Оценка влияния генетической модификации на секретомный профиль стволовых клеток жировой ткани.....	57
3.6. Протеомный анализ нативных и генетически-модифицированных клеток из жировой ткани человека.....	62
ВЫВОДЫ	64
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	65

ВВЕДЕНИЕ

Ишемические заболевания характеризуются снижением местного кровотока, в результате которого может произойти временное нарушение работы или повреждение органов и тканей. В настоящее время ишемические заболевания являются одной из острых медико-социальных проблем в развитых странах мира. По данным Всемирной Организации Здоровья (ВОЗ) летальный исход от сосудистых заболеваний составляет 31 %. На территории Российской Федерации этот показатель достиг 57,1 % [World Health Organization, 2014].

Для терапии ишемических заболеваний используют различные медикаментозные препараты, эндоваскулярные методы, разнообразные хирургические техники. Однако хирургические методы лечения являются крайней мерой при терапии ишемических заболеваниях и применяются только в редких случаях, когда консервативные подходы становятся неэффективными. К недостаткам хирургических методов можно также отнести возможные осложнения, наличие противопоказаний, риск кровотечения, повторного тромбоза, длительная реабилитация с последующей медикаментозной терапией.

В настоящее время, несмотря на большое терапевтическое разнообразие, число смертей от данных нозологий возрастает. В некоторой степени это связано с недостатком эффективных средств в современной медицине, способных стимулировать рост новых сосудов в ишемизированных тканях [Berthold, 2011; Kolandaivelu, 2011; Woodis, 2010].

В связи с обострившейся ситуацией и высоким ростом смертности, вызванным ишемическими заболеваниями, разрабатываются новые методы лечения. Одним из перспективных методов считается терапевтический ангиогенез, позволяющий улучшить кровоснабжение пораженных тканей за счет роста новых кровеносных сосудов.

Стволовые клетки (СК), получаемые из разных источников, представляют большой интерес, т. к. они являются уникальной популяцией клеток, способных к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток. Важной отличительной особенностью СК выступает способность к миграции в очаг поврежденной ткани и слабая иммуногенность [Bai et al., 2016]. К тому же, СК секретируют широкий спектр различных факторов, паракринные эффекты, которые играют важную роль в процессах выживания клеток и регенерации тканей [Liang et al., 2014].

Однако пластичность стволовых клеток может зависеть от источника получения клеток. Например, МСК, выделенные из костного мозга, обладают более сильным остеогенным потенциалом по сравнению с клетками из синовиальной оболочки даже при культивировании в одинаковых условиях [Sakaguchi et al., 2005]. К тому же, МСК являются очень гетерогенной и редкой популяцией клеток. На их долю в костном мозге приходится около 0,01% от числа всех представленных клеток, в периферической крови их концентрация еще меньше. Поэтому для клинического применения стволовых клеток необходимо выделить гомогенную культуру и нарастить нужное количество клеток. Однако большое количество пассажей приводит к старению клеток и может повлиять на их функциональность и регенеративный потенциал [Yang et al., 2018].

Для повышения регенеративного потенциала СК модифицируют с помощью различных геннотерапевтических конструкций, содержащих гены проангиогенных факторов (VEGF, FGF2, YGF, PDBF, GDNF и другие) [Куприянов, Миронов, 1993; Crafts et al., 2015]. Ангиогенная эффективность многих из них показана на моделях ишемии миокарда и скелетных мышц у животных, однако в клинических исследованиях основная доля приходится на VEGF и FGF2, хотя спектр их в настоящее время все больше разрастается. Кроме того, обнаруживается их взаимный синергетический эффект.

В связи с этим, в данном исследовании мы изучили мультифакторное воздействие ростовых факторов на секретомный профиль стволовых клеток из жировой ткани человека.

Цель работы:

Определить влияние гиперэкспрессии проангиогенных факторов на секретомный профиль стволовых клеток человека *in vitro*.

Исходя из цели работы, были определены следующие **задачи исследования:**

1. Провести выделение и наработку стволовых клеток из жировой ткани человека;
2. Провести протеомное профилирование рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов, экспрессирующих проангиогенные факторы;
3. Оптимизировать условия генетической модификации стволовых клеток из жировой ткани человека и оценить экспрессию трансгенов в трансдуцированных клетках;
4. Охарактеризовать профиль секретируемых цитокинов, хемокинов и факторов роста нативными и генетически модифицированными стволовыми клетками человека.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Теваева Валентина Алексеевна
Подразделение	
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Теваева_ВКР2020
Название файла	плагиат 2.pdf
Процент заимствования	21.13 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.54 %
Процент оригинальности	78.32 %
Дата проверки	23:06:31 21 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

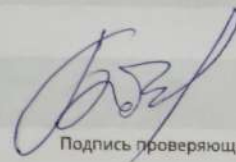
Работу проверил

Бабынин Эдуард Викторович

ФИО проверяющего

Дата подписи

21 мая 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.