

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

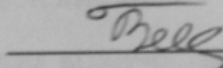
Направление: 06.04.01. (ОКСО 020401.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

СОЗДАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КОНСТРУКТА НА ОСНОВЕ  
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО ПИЩЕВОДА НИЗШИХ  
ПРИМАТОВ *PAPIO HAMADRYAS*

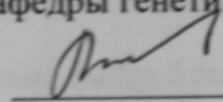
Работа завершена:

" 5 " июня 2018 г.  (З.Е. Гилазиева)

Работа допущена к защите:

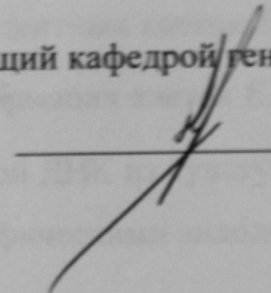
Научный руководитель:

д.б.н., профессор, доцент кафедры генетики

" 5 " июня 2018 г.  (А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор, заведующий кафедрой генетики

" 7 " 06 2018 г.  (В.М. Чернов)

Казань-2018

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	7
1.1 Патологические и клинические аспекты заболеваний пищевода	7
1.2 Использование тканеинженерных технологий при восстановлении тканей пищевода	10
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	17
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	17
2.1 Объект исследования	17
2.2 Децеллюляризация тканей пищевода	17
2.2.1 Гистологическое исследование экстрацеллюлярного матрикса	17
2.2.2 Количественное определение белка	18
2.2.3 Определение содержания количества ДНК	19
2.2.4 Электронно-микроскопический метод	20
2.3 Характеристика фибробластов человека	20
2.3.1 Определение иммунофенотипа клеток	20
2.4 Генетическая модификация фибробластов	21
2.4.1 Приготовление ночной культуры клеток <i>E. coli</i>	21
2.4.2 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	21
2.4.3 Генетическая трансформация клеток <i>E. coli</i>	22
2.4.4 Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток <i>E. coli</i>	22
2.4.5 Гидролиз ДНК специфическими эндонуклеазами	23
2.4.6 Электрофорез в агарозном геле	24
2.4.7 Получение рекомбинантных лентивирусов	25
2.4.8 Генетическая модификация фибробластов	26

2.5. Определение биосовместимости клеток и натурального каркаса	26
2.5.1 Оценка метаболической активности клеток	27
2.5.2 Метод количественной оценки экспрессии мРНК генов с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени	27
2.6 Статистическая обработка результатов	27
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	29
3.1 Гистологический и иммуногистохимический анализ нативного и децеллюляризованного пищевода низших приматов с количественным определением белка экстрацеллюлярного матрикса	29
3.2 Определение количественного содержания ДНК	33
3.3 Ультраструктурные особенности децеллюляризованной ткани	35
3.4 Характеристика фибробластов и их генетическая модификация	38
3.4.1 Рестрикционный анализ плазмидной ДНК	39
3.4.2 Получение рекомбинантных лентивирусов и трансдукция фибробластов	39
3.5 Определение биосовместимости фибробластов и полученного натурального каркаса	40
<b>ВЫВОДЫ</b>	44
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	45

## ВВЕДЕНИЕ

В литературе описано большое количество заболеваний, требующих радикальных операций на пищеводе и последующей реконструкции органа, среди которых наиболее распространен рак пищевода – по частоте возникновения он занимает восьмое место среди всех онкологических заболеваний и третье место среди опухолей пищеварительного тракта [Zhang *et al.*, 2013]. Так же серьезных реконструктивных операций требуют выраженные стенозы различного генеза и врожденные аномалии развития пищевода, такие как атрезия, которая встречается у 1 из 2500 новорожденных [Tröbs *et al.*, 2017] и ахалазия, имеющая годовую частоту 1.6 в 100000, с пиковым возрастом от 30 до 60 лет. В России за последние годы увеличивается распространённость болезней органов пищеварения, а также отмечается превалирование патологий верхних отделов желудочно-кишечного тракта, а именно гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, что может в дальнейшем привести к более серьезным последствиям [Сторонова и соавт., 2010; Khan *et al.*, 2007].

Реконструктивные операции на пищеводе, обычно подразумевающие под собой замещение органа или его части фрагментом желудка либо кишки, достаточно травматичны и зачастую проводятся в несколько этапов, что сопряжено с высоким риском осложнений, ростом интра- и послеоперационной заболеваемости, и смертности [Kurpan *et al.*, 2012]. Трансплантация донорского пищевода не представляется оптимальным подходом не только ввиду необходимости длительной иммуносупрессии, но и вследствие технической сложности формирования сосудистых анастомозов за счет кровоснабжения органа мелкими сосудами из различных бассейнов [Freud *et al.*, 1999].

В литературе приводятся данные о высокой частоте фиброзирования и отсутствии сократительной способности аллотрансплантата, что так же ограничивает применение данного метода [Macchiarini *et al.*, 1995]. Альтернативным подходом является замещение ткани пищевода

синтетическими материалами, однако используемые на данный момент материалы обладают недостаточно хорошей биосовместимостью и неоптимальными механическими свойствами, что сопряжено с развитием серьезных осложнений, таких как несостоятельность анастомоза, перфорация органа, отторжение импланта [Gossot *et al.*, 1988; Freud *et al.*, 1999]. Новое направление в тканевой инженерии основывается на изучении ассоциации собственных или донорских клеток и бесклеточной матрицы, с помощью которых создается искусственный орган *in vitro*. Ткани, созданные *in vitro*, могут быть получены из клеток пациента для обеспечения альтернативной стратегии замены органов. В отличие от современных процедур по трансплантации органов, предполагается, что такие аутологичные ткани не будут вызывать проблем иммунодефицита и отторжения.

**Целью** работы является установить возможность использования натурального децеллюляризованного пищевода низших приматов *Rapio hamadryas* в качестве каркаса для адгезии и пролиферации фибробластов.

В работе решались следующие **задачи**:

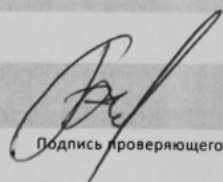
- 1) Исследовать особенности децеллюляризованной ткани пищевода низших приматов.
- 2) Трансдуцировать фибробласты человека с помощью лентивирусных конструкций, содержащих ген зеленого флуоресцентного белка.
- 3) Определить биосовместимость полученного натурального каркаса и фибробластов *in vitro*.



## СПРАВКА

### о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Гилязиева Зарема Евгеньевна
Факультет, кафедра, номер группы	ИФМиБ, кафедра генетики, 01-640-1
Тип работы	Не указано
Название работы	Гилязиева Зарема Евгеньевна Гилязиева ЗЕ 01-640-1.docx
Название файла	Гилязиева ЗЕ 01-640-1.docx
Процент заимствования	7,57%
Процент цитирования	0,25%
Процент оригинальности	92,18%
Дата проверки	13:02:30 04 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ЭЗОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС
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.