

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 – биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ  
МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК ПРИ ВВЕДЕНИИ *IN VIVO*

Работа завершена:

«01» 06 2021 г.



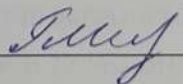
(Закирова И.Р.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., ассистент каф. биохимии,  
биотехнологии и фармакологии

«02» 06 2021 г.



(Гомзикова М.О.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«02» 06 2021 г.



(В.М. Чернов)

Казань – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>7</b>
1.1 Мембранные везикулы, индуцированные с помощью цитохалазина В ..	7
1.2 Иммуногенность и иммуномодулирующие свойства МСК.....	8
1.3 Биораспределение МСК и внеклеточных везикул.....	11
1.4 Стабильность внеклеточных везикул.....	13
1.5 Заключение по обзору литературы.....	16
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	<b>17</b>
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	<b>17</b>
2.1 Исследуемые соединения .....	17
2.2 Характеристика культур клеток человека и мыши.....	17
2.3 Лабораторные животные .....	17
2.4 Выделение мезенхимных стволовых клеток из подкожной жировой ткани человека и мыши.....	18
2.5 Культивирование и пассирование клеточных культур .....	18
2.6 Получение мембранных везикул с помощью цитохалазина В.....	19
2.7 Пробоподготовка индуцированных мембранных везикул и проведение сканирующей электронной микроскопии.....	19
2.8 Окрашивание мембранным красителем МВ-ЦВ МСК мыши .....	20
2.9 Оценка биораспределения МВ МСК мыши .....	21
2.10 Выделение и окрашивание антителами моноклеарных клеток крови мыши .....	21
2.11 Выделение сыворотки крови мышей.....	22
2.12 Определение концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в сыворотке крови мышей .....	22
2.13 Характеристика стабильности мембранных везикул в процессе хранения.....	23
2.14 Измерение концентрации белка.....	23
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	<b>24</b>

3.1 Получение мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток человека и мыши с помощью цитохалазина В и характеристика их размера .....	24
3.2 Оценка количества и активационного статуса иммунных клеток мыши после внутривенного введения мембранных везикул <i>in vivo</i> .....	25
3.3 Оценка концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и хемокинов после внутривенного введения мембранных везикул <i>in vivo</i> .....	29
3.4 Анализ биораспределения мембранных везикул <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> .....	33
3.5 Характеристика стабильности мембранных везикул в процессе хранения.....	35
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	39
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	40

## ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) – это окруженные билипидной мембраной пузырьки, которые секретируются клетками во внеклеточное пространство. ВВ разделяются на три основных подтипа, на микровезикулы (МВ), экзосомы и апоптотические тельца, которые различаются механизмом формирования, путем высвобождения, размером, содержанием и выполняемыми функциями [Zaborowski *et al.*, 2015; Yáñez-Mó *et al.*, 2015].

Микровезикулы - это ВВ, которые образуются путем отпочковывания плазматической мембраны клетки. Размер МВ обычно составляет от 100 нм до 1 мкм в диаметре [Raposo, Stoogvogel, 2013]. С током крови и лимфы МВ переносят информацию на удаленные расстояния в организме человека [Camussi *et al.*, 2011]. После высвобождения родительскими клетками, МВ могут взаимодействовать с клетками-мишенями и переносить различные биоактивные молекулы, включая мембранные рецепторы, белки, органеллы, мРНК и миРНК [Zaborowski *et al.*, 2015]. Благодаря этим неотъемлемым преимуществам МВ идеально подходят для разработки систем доставки биоактивных молекул и лекарственных препаратов [Kordelas *et al.*, 2014]. Более того, было продемонстрировано, что МВ мезенхимальных стволовых клеток (МСК) обладают свойством стимулировать регенерацию в поврежденной ткани, подобно МСК, благодаря способности заключать и доставлять содержимое родительских клеток, то есть они сами по себе могут действовать как терапевтический инструмент [Nassar *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2012; Pick *et al.*, 2005; Painter *et al.*, 1981; Piccin *et al.*, 2007].

Несмотря на перспективность и большую безопасность использования МВ по сравнению с МСК, их выход невелик, а процесс выделения достаточно времязатратен и трудоёмок. Сотрудниками нашей лаборатории ранее был применен подход к увеличению продукции МВ путем обработки клеток цитохалазином В [Gomzikova, Rizvanov, 2017]. Процедура получения индуцированных цитохалазином В мембранных везикул (иМВ) имеет

преимущества перед традиционным способом выделения естественных микровезикул: повышенный выход везикул, более гомогенный состав везикул из-за неселективного механизма включения цитоплазматического содержимого, сохранение биологической активности родительских клеток. Недавно было установлено, что индуцированные мембранные везикулы МСК стимулируют ангиогенез подобно родительским клеткам [Gomzikova *et al.*, 2017]. Однако иммуномодулирующие свойства иМВ, полученных из МСК, а также их биораспределение *in vivo* еще недостаточно изучены. Поэтому целью нашего исследования явилось получение индуцированных мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток мыши и человека, оценка их иммуногенных свойств, биораспределения *in vivo*, а также стабильности. Для достижения данной цели, нами были поставлены следующие задачи:

1. Получение мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток человека и мыши с помощью цитохалазина В и характеристика их размера;
2. Оценка количества и активационного статуса иммунных клеток после внутривенного введения мембранных везикул *in vivo*;
3. Оценка концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и хемокинов после внутривенного введения мембранных везикул *in vivo*;
4. Анализ биораспределения мембранных везикул *in vivo* и *ex vivo*;
5. Характеристика стабильности мембранных везикул в процессе хранения.



**АНТИПЛАГИАТ**  
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

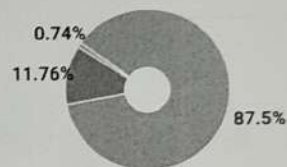
Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

### ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Закирова Илюза Рушановна  
Самоцитирование  
рассчитано для: Закирова Илюза Рушановна  
Название работы: Закирова И.Р.\_ВКР  
Тип работы: Не указано  
Подразделение: ИФМиБ, К(П)ФУ

### РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	11.76%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	87.5%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.74%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 17.05.2021

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.