

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 –биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ МСК НА МОДЕЛИ  
РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

Работа завершена:

«6» мая 2020 г.

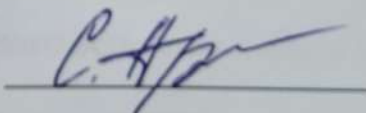


Алатраш Р.

Работа допущена к защите:

Научный руководитель  
к.б.н., Старший научный  
сотрудник

«6» мая 2020 г.



Архипова С.С.

Научный руководитель

д.б.н., профессор

«6» мая 2020 г.

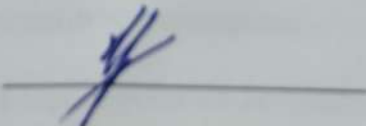


Ризванов А.А.

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«6» мая 2020 г.



Чернов В.М.

Казань-2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Патологические особенности рассеянного склероза.....	11
1.1.1 Общая характеристика рассеянного склероза.....	11
1.1.2 Эпидемиология рассеянного склероза.....	12
1.1.3 Этиология рассеянного склероза.....	12
1.2 Патология рассеянного склероза.....	13
1.2.1 Воспалительный процесс при рассеянном склерозе.....	13
1.2.1.1 Клетки и цитокины, участвующие в процессе воспаления.....	15
1.2.1.2 Возможные мишени для аутоиммунного ответа.....	17
1.2.2 Процесс демиелинизации при рассеянном склерозе.....	19
1.2.2.1 Повреждения белого вещества.....	20
1.2.2.2 Повреждения серого вещества.....	20
1.2.3 Процесс дегенерации аксонов при рассеянном склерозе.....	21
1.2.4 Роль астроцитов в развитии рассеянного склероза.....	23
1.3 Стратегии терапии рассеянного склероза.....	26
1.3.1 Терапия рассеянного склероза на основе стволовых клеток.....	27
1.3.1.1 Мезенхимальные Стромальные Клетки (МСК).....	28
1.3.1.2 Механизм действия мезенхимальных стромальных клеток (МСК) на экспериментальную аллергическую энцефаломиелитную (ЭАЭ) модель рассеянного склероза.....	30

1.3.1.3	Различия между мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) из разных источников .....	32
1.3.2	Терапевтическая эффективность внеклеточных везикул (ВВ), полученных из мезенхимальных стромальных клеток (МСК).....	33
1.3.2.1	Общая характеристика внеклеточных везикул (ВВ) .....	35
1.3.2.2	Особые характеристики внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК).....	36
1.3.2.3	Терапевтическая роль внеклеточных везикул (ВВ) полученных из мезенхимальных стромальных клеток (МСК), при заболеваниях центральной нервной системы.....	38
1.3.2.4	Терапевтическая роль внеклеточных везикул при рассеянном склерозе .....	40
1.3.3	Терапия рассеянного склероза с использованием микровезикул, трансдуцированных генным фактором роста нервов.....	41
	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	45
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	45
2.1	Объект исследования .....	45
2.2	Модель рассеянного склероза.....	47
2.3	Выделение мезенхимных стромальных клеток.....	48
2.3.1	Выделение МСК жировой ткани.....	48
2.3.2	Выделение МСК костного мозга.....	49
2.3.3	Выделение МСК пульпы зуба .....	49
2.4	Получение рекомбинантного лентивируса.....	49
2.5	Получение культуры клеток ЖМСК –NGF .....	51
2.5.1	Индукция микровезикул из ЖМСК .....	52
2.6	Просвечивающая электронная микроскопия .....	52



2.7	Статистическая обработка результатов.....	53
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	54
3.1	Морфологическое и структурное определение реактивных астроцитов	54
3.2	Морфологический анализ срезов головного мозга после введения МСК, полученных из различных источников.....	58
3.3	Морфологический анализ срезов спинного мозга после введения МСК из различных источников .....	61
3.4	Трансдукция ЖМСК с геном NGF.....	64
3.5	Характеристика микровезикул ЖМСК.....	66
3.6	Морфологический анализ срезов спинного мозга после введения микровезикул и микровезикул с NGF .....	67
3.6.1	Измерение площади демиелинизации .....	67
3.6.2	Оценка количества астроцитарных клеток .....	70
3.7	Оценка цитокинового профиля сыворотки крови исследуемых групп мышей .....	74
	ВЫВОДЫ .....	80
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	83

HLA — Молекулы главного комплекса гистосовместимости

Gal1 — Галактина

МСК — Микровезикулы, полученные из мезенхимных стволовых клеток

PLP — Протеин миелинового базиса

MBP — Миелинобазисный белок

МАО — Миелиноассоциированный гликопротеин

IgG — Иммуноглобулин G

PCN — Поликлональный конъюгат

Анти-IL-17 — Антиинтерлейкин 17

МСК — Мезенхимные стволовые клетки

## ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) - неизлечимое, прогрессирующее, хроническое аутоиммунное демиелинизирующее заболевание, характеризующееся множественными очагами поражения в центральной и периферической нервной системе. Причины данного заболевания до сих пор не ясны и исследуются во всем мире. Можно предположить, что РС является мультифакторным заболеванием, обусловленным выраженными воспалительным, миелин и аксон-дегенеративным компонентами и вовлечением клеток иммунной системы в развитие патологического процесса [Nylander, Hafler, 2012, Thompson *et al.*, 2018].

Мультифокальные зоны воспаления, обусловленные очаговой Т-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрацией, а также гибелью олигодендроцитов являются первичными причинами разрушения миелиновой оболочки, что приводит к образованию бляшек в центральной нервной системе (ЦНС), состоящих из воспалительных клеток и их продуктов, демиелинизированных и рассеченных аксонов, а также астроглиоза как в белом, так и в сером веществе. Эти поражения при РС влияют на когнитивное функционирование головного мозга, которое коррелирует с физической недееспособностью. Данные клинические симптомы приводят к глубоким функциональным ограничениям, влияющим на повседневную работоспособность, профессиональную деятельность и социализацию, а также могут изменять поведение или настроение, что приводит к поведенческим нарушениям, таким как агрессия или импульсивность, депрессия или апатия [Oreja-Guevara *et al.*, 2019].

На сегодняшний день терапия этого заболевания основана на замедлении процессов нейродегенерации и подавлении иммунной системы больных. Иммуномодулирующие препараты в основном используются для терапии РС и направлены на минимизацию симптомов заболевания [Ghasemi



*et al.*, 2017]. Однако эта стратегия малоэффективна, поэтому необходим поиск новой более эффективной стратегии терапии данного заболевания.

Одним из направлений в поиске нового эффективного лечения РС может стать клеточная терапия или их секреторные продукты. Согласно литературным данным, клетки синтезирующие цитокины и нейропротекторные молекулы, способствуют снижению или увеличению скорости дегенерации нейронов [Scolding *et al.*, 2017]. Показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) эффективны в лечении РС благодаря своим иммуномодулирующим и регенеративным свойствам. Они обладают способностью дифференцироваться в другие клетки и проявляют ряд значимых антипролиферативных, противовоспалительных и антиапоптотических свойств [Mohyeddin Bonab *et al.*, 2013, Staff *et al.*, 2019]. Исследования показали, что цитокины и факторы, секретирруемые МСК, достаточны для стимуляции регенерации [Takahashi *et al.*, 2006], на основании этого факта была сформирована паракринная гипотеза о терапевтическом эффекте МСК [Hodgkinson *et al.*, 2016], которая в настоящее время широко признана. В широком спектре факторов, секретирруемых МСК, внеклеточные везикулы (ВВ) были идентифицированы как потенциальная терапевтическая альтернатива использованию МСК [Keshtkar *et al.*, 2018].

В дополнение к этим двум подходам была предложена идея трансдуцировать в МСК необходимые гены для нейрогенеза, такие как ген Фактор роста нервов (NGF), получать повышенное количество этого фактора и доставлять его в виде компонента микровезикул, секретирруемых этими клетками. Поскольку NGF представляет собой плеiotропный цитокин, способствующий биосинтезу миелина олигодендроцитами в ЦНС и шванновскими клетками в периферической нервной системе. Иммуномодулирующие свойства NGF и его трофические эффекты на миелинпродуцирующие клетки обеспечивают основу для использования

NGF в лечении иммуноопосредованных демиелинизирующих нарушений [Razavi *et al.*, 2015].

В связи с трудностями исследования патогнеза рассеянного склероза и разработки методов его лечения на пациентах, одним из подходов для изучения патологических процессов является модель рассеянного склероза на мышах – экспериментального аутоимунный энцефаломиелит (ЭАЭ). С помощью этой модели все перечисленные терапевтические стратегии можно изучить и сравнить, чтобы найти наилучшую и более эффективную стратегию.

По данным литературы, трансплантация МСК и их трансдуцированных микровезикул может оказывать терапевтическое влияние на патогенез и прогрессирование нейродегенеративных нарушений [Galieva *et al.*, 2019, Riazifar *et al.*, 2019, Shaimardanova *et al.*, 2020], однако сравнение наиболее эффективной терапевтической стратегии между этими тремя стратегиями еще не проводилось, как и исследования патологических изменений в сочетании с использованием микровезикул с NGF. Таким образом, изучение механизмов влияния МСК-производных микровезикул на течение ЭАЭ является весьма актуальной задачей. Кроме того, изучение терапевтических возможностей микровезикул МСК, трансдуцированных с помощью NGF представляется небезынттересным.

**Целью** работы является исследование терапевтических свойств индуцированных микровезикул МСК на модели рассеянного склероза и сравнение их терапевтической эффективности с мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из различных источников.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Подтверждение реактивности астроцитов в тканях ЦНС мышей с моделью ЭАЭ.



- 2) Исследование структуры тканей головного и спинного мозга и на модели ЭАЭ после трансплантации МСК, выделенных из жировой ткани, костного мозга и пульпы зуба мышей.
- 3) Исследование структуры спинного мозга на модели ЭАЭ после введения нативных индуцированных цитохалазином В микровезикул МСК.
- 4) Исследование структуры ткани спинного мозга на модели ЭАЭ после введения индуцированных цитохалазином В микровезикул полученных из МСК трансдуцированных NGF.
- 5) Оценка цитокинового профиля образцов крови мышей, получавших терапию с введением ЖМСК, нативных и трансдуцированных NGF микровезикул.
- 6) Сравнение результатов, полученных по трем исследованным способам терапии, для выбора наиболее эффективной стратегии.

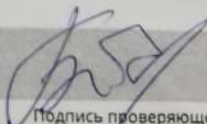




## СПРАВКА

### о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Алатраш Рим
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	REEM ALATRASH.docx
Название файла	REEM ALATRASH.docx
Процент заимствования	2.86 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.68 %
Процент оригинальности	96.46 %
Дата проверки	18:34:12 26 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 общепотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	26.05.20 

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.