

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

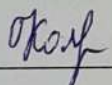
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 –биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ, СОДЕРЖАЩИХ
ГЛИКОПРОТЕИН ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА

Работа завершена:

«7» 05 2021 г.



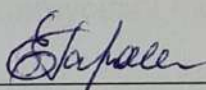
Колесникова А.И.

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., ст. преп.

«7» 05 2021 г.



Гаранина Е.Е.

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«7» 05 2021 г.



Чернов В.М.

Казань-2021

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Микровезикулы. Классификация микровезикул.....	9
1.2 Биологические эффекты микровезикул. Роль микровезикул при норме и патологии	11
1.3 Микровезикулы из мезенхимных стволовых клеток.....	14
1.4 Биологическая роль микровезикул	16
1.5 Получение микровезикул.....	20
1.6 Микровезикулы как потенциальные кандидаты для вакцин	21
1.7 Хантавирусная инфекция. Вакцины на основе клеточных и белковых компонентов для профилактики хантавирусной инфекции.....	25
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Объект исследования.....	33
2.2 Выделение мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани мышей	33
2.3 Иммунофенотипирование клеток	34
2.4 Получение рекомбинантного лентивируса LV-PuuM	34
2.5 Концентрирование лентивирусных частиц. Генетическая модификация мМСК.....	35
2.6 Выделение микровезикул с использованием цитохалазина В.....	35
2.7 Электронная микроскопия: пробоподготовка, заливка, окрашивание	36
2.8 Определение концентрации общего белка микровезикул. Вестерн- блот анализ	38
2.9 Трансдукция клеток A549 модифицированными микровезикулами.	40
2.10 Иммунизация мышей	40
2.11 Метод иммуноферментных пятен (ELISpot)	41
2.12 Иммуноферментный анализ (ИФА)	42
2.13 Мультиплексный анализ.....	42

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Определение иммунофенотипа мМСК.....	44
3.2 Электронная микроскопия микровезикул.....	44
3.3 Вестерн-блот анализ.....	46
3.4 Анализ секреции цитокинов в образцах микровезикул	46
3.5 Визуализация микровезикул <i>in vivo</i> с помощью IVIS Spectrum In Vivo Imaging System	47
3.6 Иммуноферментный анализ	49
3.7 Мультиплексный анализ	49
3.8 Анализ активации цитотоксических лимфоцитов	51
ВЫВОДЫ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	54

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные геморрагические лихорадки являются одними из наиболее распространенных инфекционных заболеваний в мире. На сегодняшний день по разным оценкам ежегодно регистрируется от 50 до 100 миллионов случаев ВГЛ в мире [Gibbons, Vaughn, 2002]. По данным европейского центра профилактики и контроля заболеваний на 2015 г. в Европе было зарегистрировано 2889 случаев хантавирусной инфекции, летальный исход составил 31%. Большая часть заболевших (93,7%) была зарегистрирована в таких странах, как Финляндия, Франция, Германия и Швеция. В России Роспотребнадзор сообщает за этот же период о 9201 случае геморрагической лихорадки с почечным синдромом ГЛПС (о количестве летальных исходов не сообщается). Смертность при заражении ВГЛ различается в зависимости от штамма возбудителя и может достигать до 50%.

Классические вакцины, такие как живые аттенуированные вакцины (LAV) и цельноклеточные инактивированные вакцины (IV), продемонстрировали эффективность в борьбе со вспышками инфекционных заболеваний [Adams *et al.*, 2015]. Однако ряд таких ограничений, как беременность и сниженный иммунитет, обуславливает актуальность и необходимость дальнейших исследований и для повышения эффективности вакцин [Sanders *et al.*, 2015; Lauring *et al.*, 2010; Lycke, 2012].

В качестве альтернативных носителей для доставки иммуногенных белков могут служить внеклеточные везикулы (EV), которые способны обеспечивать долговременное действие антигена в месте инъекции, облегчить доставку к иммунным клеткам и повысить общую иммуногенность [Pashine *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2019]. Внеклеточные везикулы играют решающую роль в межклеточной коммуникации, перенося мембранные и цитозольные белки, липиды и нуклеиновые кислоты [Storni *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2017]. Первоначально внеклеточные везикулы рассматривались как побочные продукты при патологических нарушениях. Впоследствии их стали рассматривать как еще одно новое вещество, опосредующее передачу сигнала

in vivo. Кроме того, они играют важную роль в патогенезе и прогрессировании атеросклероза, инсульта, ишемической болезни сердца и сахарного диабета, неся белки, липиды и нуклеиновые кислоты, экспрессируемые материнскими клетками. Все больше и больше исследований показывают, что молекулярные характеристики и клеточное происхождение микровезикул отражают природу самого заболевания и зависят от его прогрессирования и лечения. Это мощный инструмент для диагностики, прогноза и мониторинга лекарств [Wolf, 1967; Chen *et al.*, 2018].

Различные физиологические факторы и различные патологические стимулы могут влиять на продукцию и состав МВ, что приводит к изменению активных веществ, переносимых МВ, и различным биологическим эффектам. Следовательно, механизм действия МВ и их активных веществ в организме является ключом к идентификации маркеров заболевания.

Многочисленные научные исследования и доклинические данные в настоящее время показали практическую клиническую пользу наивных микровезикул вместо целых клеток, благодаря более высокой биостабильности и меньшему риску аномальной дифференцировки и злокачественности, а также как терапевтический инструмент, дополняющий традиционные лекарства [Акурекли *et al.*, 2015; Riazifar *et al.*, 2017; Agrahari *et al.*, 2019].

Цель работы – определить иммуногенные свойства микровезикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток жировой ткани мыши, сверхэкспрессирующих ген гликопротеина вируса Пуумала.

Задачи:

1. Выделить мезенхимные стволовые клетки (мМСК) из жировой ткани мышей.
2. Получить рекомбинантный лентивирус, обеспечивающий экспрессию гена Р_{нМ} в культуре мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани.

3. Выделить искусственные микровезикулы из генетически модифицированных клеток и охарактеризовать методами трансмиссионной электронной микроскопии и мультиплексного анализа.

4. Оценить распределение микровезикул при подкожном введении мышам линии C57Bl/6.

5. Установить наличие антител к белку гликопротеина методом иммуноферментного анализа, а также исследовать секрецию цитокинов и хемокинов в образцах сыворотки иммунизированных животных.

6. Проанализировать активацию цитотоксических лимфоцитов у иммунизированных животных методом ELISpot.



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

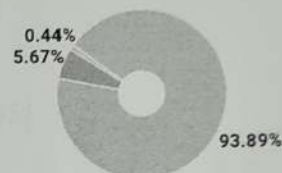
Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.СТРУКТУРА

Автор работы: Колесникова Алёна Игоревна
Самоцитирование
рассчитано для: Колесникова Алёна Игоревна
Название работы: Молекулярно-генетический и иммунологический анализ искусственных микровезикул, содержащих гликопротеин хантавируса Пуумала
Тип работы: Магистерская диссертация
Подразделение: КФУ, ИФМиБ

РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	5.67%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	93.89%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.44%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 20.05.2021

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.