

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

**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ**

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ДОСТАВКА МИТОХОНДРИЙ С ПОМОЩЬЮ МИКРОВЕЗИКУЛ

Работа завершена:

«5» 06 2019г.

(Курбангалеева С.В.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

д.б.н., профессор каф. генетики

«6» 06 2019г.

(Ризванов А.А.)

к.б.н., с.н.с.

«6» 06 2019г.

(Гомзикова М.О.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор каф. генетики

«6» 06 2019г.

(Чернов В.М.)

Казань – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Митохондриальные заболевания	8
1.2 Терапия митохондриальных заболеваний	13
1.3. Внеклеточные везикулы клеток млекопитающих	17
1.4 Способ получения микровезикул с помощью цитохалазина В	19
1.5 Микровезикулы как терапевтический инструмент для доставки митохондрий.....	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Выделение мезенхимных стволовых клеток из подкожной жировой ткани человека	23
2.2 Культивирование и пассирование клеточных культур.....	23
2.3 Получение микровезикул с помощью цитохалазина В	24
2.4 Пробоподготовка индуцированных микровезикул и проведение сканирующей электронной микроскопии.....	25
2.5 Иммунофенотипирование мезенхимных стволовых клеток человека	25
2.6 Окрашивание митохондрий	27
2.7 Окрашивание мембранным/ядерным красителем	28
2.8 Окрашивание AnnexinV	30
2.9 Перенос митохондрий	30

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Характеристика мезенхимных стволовых клеток	32
3.2 Характеристика индуцированных микровезикул из мезенхимных стволовых клеток.....	35
3.3 Доставка митохондрий посредством цитохалазин В индуцированных микровезикул в клетки-реципиенты	40
ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии являются ключевыми цитоплазматическими органеллами, отвечающими за выработку клеточной энергии, регулирующими уровень внутриклеточного кальция и гибель клеток. Мутации в митохондриальной ДНК приводят к мышечным расстройствам, таким как дегенерация, мышечная атрофия и миопатия, а также сопровождают развитие нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона. Снижение активности митохондрий и митохондриальная дисфункция выявлены также при старении, раке, нарушениях обмена веществ (Kim *et al.*, 2018).

При нарушении митохондриальной функции в большей степени страдают клетки головного мозга, скелетной мускулатуры, сердца, печени, почек, эндокринной и дыхательной систем. Патогенная мутация митохондриальной ДНК выявляется у одного человека из 200 (Elliott *et al.*, 2008). Митохондрии являются предметом интенсивных исследований, так как внутри этих органелл расщепляются сахара и длинноцепочечные жирные кислоты, АДФ рециркулируется обратно в АТФ, синтезируются стероиды и липиды, реплицируется ДНК, транскрибируются и транслируются белки (McBride *et al.*, 2006). Однако, несмотря на детальное исследование молекулярных механизмов, в настоящее время не существует способа эффективной доставки лекарственных препаратов/биоактивных молекул в митохондрии, а также не разработаны способы заместительной терапии при митохондриальных заболеваниях у взрослых людей. Поэтому поиск эффективного и неиммуногенного вектора для доставки терапевтических препаратов и/или функционально активных митохондрий является актуальной задачей.

Перспективным представляется использование естественных образований клеток человека – микровезикул (МВ), окруженных цитоплазматической мембраной, которые обеспечивают перенос биомолекул между соседними клетками в организме человека (Nawaz *et al.*, 2016). Преимуществами вектора на основе МВ является

наличие мембранны, которая защищает содержимое от разрушения, а также обеспечивает целевую доставку, благодаря наличию специфичных поверхностных рецепторов (Pick *et al.*, 2005; Gomzikova *et al.*, 2017). Кроме того, МВ способны к слиянию и доставке своего содержимого в клетку-реципиента (Ungermann *et al.*, 2019). В исследовании Hough K. R. было продемонстрировано, что миелоидные регуляторные клетки дыхательных путей переносят митохондрии в Т-клетки с помощью микровезикул. Таким образом подтверждается способность микровезикул заключать и доставлять митохондрии в клетки-реципиенты (Hough *et al.*, 2018). Сотрудниками нашей лаборатории разрабатывается способ высокопродуктивного получения микровезикул с применением цитохалазина В. Было показано, что индуцированные цитохалазином В микровезикулы (МВ-ЦВ), содержат генетический материал митохондрий – ген цитохромоксидазы I (Гомзикова М. О., 2016). Однако наличие в составе МВ-ЦВ функционально активных митохондрий и способность МВ-ЦВ к переносу митохондрий в клетки-реципиенты до настоящего времени исследованы не были.

В этой связи целью нашей работы явилось оценка наличия функционально активных митохондрий в составе МВ-ЦВ и перенос митохондрий в клетки-реципиенты.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека из подкожной жировой ткани и провести иммунофенотипирование выделенных клеток;
2. Получить МВ-ЦВ из МСК человека, оценить наличие функционально активных митохондрий в составе МВ-ЦВ;
3. Провести перенос митохондрий посредством МВ-ЦВ в клетки-реципиенты и оценить митохондриальный потенциал клеток-реципиентов.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Курбангалеева Сирина Васильевна
Подразделение	ДОСТАВКА МИТОХОНДРИЙ с помощью МИКРОВЕЗИКУЛ
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	Курбангалеева С.В_ВКР
Название файла	Курбангалеева С.В_ВКР.docx
Процент заимствования	15,56%
Процент цитирования	0,34%
Процент оригинальности	84,11%
Дата проверки	23:20:17 30 мая 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего	
Дата подписи	30.05.19.

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.