

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

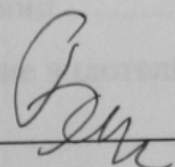
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(Дипломная работа)

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ МАРКЁРОВ ИНФЛАММАСОМ В
КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ИЗ ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ (HUVES)
И ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Работа завершена:

"06" 06 2018 г.



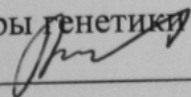
(Е.В. Охезин)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

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

"06" 06 2018 г.

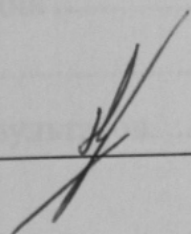


(А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"6" 06 2018 г.



(В.М. Чернов)

Казань-2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	2
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Хантавирусные инфекции. Общие сведения	8
1.2 Особенности патогенеза хантавирусной инфекции.....	9
1.3 Особенности иммунного ответа при хантавирусной инфекции.....	11
1.4 Жизненный цикл и строение хантавирусов.....	12
1.5 История открытия инфламмасом.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.6 Структура инфламмасом	Ошибка! Закладка не определена.
1.7 Механизм активации инфламмасом	20
1.8 Инфламмасомы в клеточных популяциях	25
1.9 Активация воспаления и иммунного ответа.....	26
1.10 Функционирование инфламмасом при инфекционных заболеваниях	28
1.11 Инфламмасомы как терапевтическая цель	31
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Используемые клеточные линии	33
2.2 Выделение и культивирование эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVES).....	34
2.3 Генетическая модификация культуры клеток HUVES.	35
2.4 Выделение МКПК в градиенте плотности фиколла	35
2.5 Клеточный сортинг.....	36
2.6 Выделение тотальной РНК.....	36
2.7 Реакция обратной транскрипции	37
2.8 ПЦР в реальном времени	37
2.9 Статистическая обработка результатов.....	37

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	39
3.1 Выделение и культивирование эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVEC).....	39
3.2 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови пациентов с диагнозом ГЛПС и условно здоровых доноров.....	40
3.3 Сортировка клеток на популяции CD3+ лимфоцитов (Т-лимфоциты) и CD14+ (макрофаги)	41
3.4 Анализ экспрессии маркеров инфламмасом (ИЛ-1 β , NALP3, casp1) в культуре клеток крови и генетически модифицированных клетках HUVEC	41
ВЫВОДЫ	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные геморрагические лихорадки являются одними из наиболее распространенными инфекционными заболеваниями в мире. В настоящее время по разным оценкам ежегодно регистрируется от 50 до 100 миллионов случаев ВГЛ в мире [Gibbons *et al.*, 2002]. Смертность при заражении ВГЛ варьируется в зависимости от штамма возбудителя и может достигать до 50%.

Хантавирусы представляют собой группу РНК(-) вирусов, переносчиками которых выступают грызуны; данные вирусы относятся к роду *Hantavirus*, семейство *Bunyaviridae* [Ermonval *et al.*, 2016]. Хантавирусы вызывают две тяжелые формы заболевания, хантавирусный легочный синдром (ХЛС) и геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) [Mir, 2010].

На территории России зарегистрированы множественные зоонозные очаги ГЛПС расположенные на территории между Волгой и Уралом, а также на Дальнем Востоке. Следует отметить, что Республика Татарстан является одним из активных очагов ГЛПС на территории Российской Федерации. Ежегодно на территории Республики Татарстан регистрируются вспышки ГЛПС где большинство заболевших являются молодые люди трудоспособного возраста. Расширение внешнеэкономических связей, глобализация экономики, развитие туризма будут в дальнейшем способствовать распространению заболевания за пределы зоонозного ареала. Таким образом, принимая во внимание отсутствие эффективных вакцин, проблема изучения молекулярных механизмов противовирусной защиты для последующей разработки новых подходов к терапии и профилактики данной патологии.

Клинические проявления ГЛПС можно разделить на 5 последовательных стадий: стадию лихорадки, гипотензивную фазу, олигурическую фазу, диуретическую фазу и фазу реконвалесценции [Korva *et al.*, 2013]. На протяжении всего периода заболевания отмечаются такие

типичные симптомы как тромбоцитопения, высокая температура и синдром капиллярной утечки [Martin, 2002].

Несмотря на многочисленные гипотезы о механизмах патогенеза хантавирусной инфекции, точный механизм остается неизвестным. У пациентов с ГЛПС наблюдается повышенная продукция многочисленных цитокинов и хемокинов, в частности, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), фактора некроза опухолей – альфа (TNF- α), ИЛ-6 и ИЛ-8; тем самым индукция про-воспалительных цитокинов и хемокинов играет центральную роль в развитии хантавирусной инфекции [Pal *et al.*, 2018]. Данные цитокины усиливают экспрессию молекул адгезии в клетках эндотелия, облегчая трансмиграцию лейкоцитов в очаги инфекции и воздействуя на терморегуляторный центр, тем самым обуславливая лихорадку. Нарушение эндотелиальной целостности при ВГЛ может быть результатом цитотоксического действия вирус специфичных цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) и/или натуральных киллеров (НК) [Hollingsworth *et al.*, 2008]. Поэтому можно сделать предположение о решающей роли иммунных эффекторных клеток в патогенезе геморрагического синдрома. В подтверждение этого предположения, Ennis и коллеги показали циркуляцию ЦТЛ у больных ХЛС, способных к распознаванию и уничтожению эндотелиальных клеток, зараженных вирусом [Ennis *et al.*, 1997].

Помимо увеличения ИЛ-6 и ИЛ-8 у больных ГЛПС отмечается повышенная секреция ИЛ-1 β . Недавно Zhu с соавторами показали, что ИЛ-1 β вызывает повышенную проницаемость сосудов путем активации рецепторов интерлейкинов и активации каскада MYD88-ARNO-ARF6, обуславливающих нарушение сосудистой проницаемости [Zhu *et al.*, 2012]. Кроме того, Hottz сообщил, что экспрессия ИЛ-1 β повышена в тромбоцитах и микрочастицах, полученных из тромбоцитов инфицированных вирусом денге, и что вирус лихорадки денге инициирует сборку инфламмасом, активацию каспазы-1 и каспаза-1-зависимую секрецию ИЛ-1 β (Hottz *et al.*, 2013). Это подтверждает тот факт, что ИЛ-1 β может способствовать патогенезу вирусных инфекции

путем индукции повышенной проницаемости сосудов. Таким образом, ввиду того, что возбудители геморрагических лихорадок относятся к разным штаммам, паттерны активации ряда сигнальных каскадов могут различаться.

Цель настоящей работы заключается в исследовании активации маркеров инфламмасом – каспазы 1, интерлейкина-1 β , криопирин в CD3+ и CD14+ позитивных клеток крови и первичной клеточной культуры HUVEC, трансфицированных плазмидными конструкциями, несущими нуклеотидную последовательность генов структурных компонентов вируса Пуумала.

В рамках цели работы решались следующие экспериментальные задачи:

1) Выделение, культивирование и генетическая модификация эндотелиальных клеток из пупочной вены человека плазмидной ДНК рLX-Puu-S, содержащая ген нуклеокапсидного белка вируса Пуумала.

2) Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови пациентов с диагнозом ГЛПС и условно здоровых доноров. Сортировка клеток на популяции CD3+ лимфоцитов (Т-лимфоциты) и CD14+ (макрофаги).

3) Анализ экспрессии маркеров инфламмасом (ИЛ-1 β , NALP3, casp1) в культуре клеток крови и генетически модифицированных клетках HUVEC методом ПЦР в реальном времени.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы Охезин Егор Валерьевич
Факультет, кафедра, номер группы ИФМиБ, кафедра генетики, гр. 01-401
Тип работы Дипломная работа
Название работы Охезин Егор Валерьевич Антиплагиат.docx

Название файла Антиплагиат.docx

Процент заимствования 11,27%

Процент цитирования 0,24%

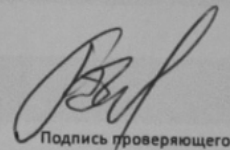
Процент оригинальности 88,49%

Дата проверки 16:09:03 04 июня 2018г.

Модули поиска Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; 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

