

Министерство образования и науки Российской Федерации
КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

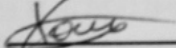
Специальность: 06.03.01 — биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(Бакалаврская работа)

**ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕНЫ VEGF И BMP2,
НА ПРОЦЕССЫ ОСТЕОГЕНЕЗА И АНГИОГЕНЕЗА IN VITRO И IN
VIVO**

Работа завершена:

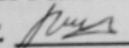
" 6 " июня 2018 г.  _____ (М.Р. Халиуллин)

Работа допущена к защите:

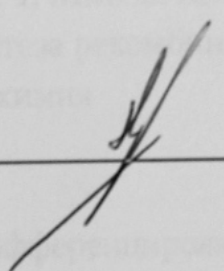
Научный руководитель

д.б.н., Ph.D.,

г.н.с., профессор кафедры генетики

" 6 " июня 2018 г.  _____ (А.А. Ризванов)

И.о. заведующего кафедрой
генетики

" 6 " 06 2018 г.  _____ (В.М. Чернов)

Казань — 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Невирусные векторы (плазмиды)	8
1.2. Перспективы использования двухкассетных плазмидных векторов в клинике	11
1.3. Трансфекция эукариотических клеток	12
1.4. Генная индукция регенерации костной ткани. Выбор целевых генов	15
1.5. Сосудистый эндотелиальный фактор роста	16
1.6. Костный морфогенетический белок	17
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	20
2.1. Методы работы с генетическими конструкциями	20
2.1.1. Создание генетических конструкций	20
2.1.2. Определение первичной нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование)	20
2.1.3. Приготовление компетентных клеток и трансформация по протоколу One Shot Top 10 E.coli	21
2.1.4. Выделение плДНК из бактериальных клеток	22
2.1.5. Электрофорез в агарозном геле	23
2.2. Методы работы с культурами клеток	23
2.2.1. Выделение мультипотентных стромальных клеток из костного мозга крысы	23
2.2.2. Проточная цитофлуориметрия	24
2.3. Методы трансфекции	26
2.3.1. Трансфекция клеток НЕК293FT, ММСК-КМ крысы	26
2.4. Методы подтверждения биосинтеза рекомбинантных белков	27
2.4.1. Флуоресцентная иммуноцитохимия	27
2.4.2. Иммуноблоттинг	28
2.4.3. Иммуноферментный анализ	29
2.5. Методы оценки остеогенной дифференцировки ММСК	31
2.5.1. Остеогенная дифференцировка трансфицированных ММСК	31
2.5.2. Цитологическое окрашивание, направленное на выявление фосфатных групп (реакция von Kossa)	31

2.5.3. Цитологическое окрашивание, направленное на выявление кальциевых депозитов (окрашивание Ализариновым красным)	32
2.6. Создание ген-активированного остеопластического материала	33
2.6.1. Совмещение плазмидной ДНК с остеопластическими материалами и определение емкости материалов для плазмидной ДНК	33
2.7. опыты на животных	34
2.7.1. Оценка влияния ген-активированных остеопластических материалов на процессы регенерации костной ткани	35
2.8.1. Подготовка образцов тканей для гистохимического исследования	36
2.8.2. Гистохимическое исследование	37
2.8.3. Морфометрическая оценка результатов гистохимического исследования	38
2.9 Программное обеспечение и статистическая обработка результатов	38
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	40
3.1. Создание генетических конструкций	40
3.2. Определение первичной нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование)	41
3.3. Нарботка, выделение и очистка генетических конструкций	41
3.4. Получение и анализ первичных клеточных культур	42
3.5. Анализ экспрессии трансенов клетками НЕК 293 FT и ММСК костного мозга крысы трансфицированными плДНК рBud-Kan-VEGF165A-BMP2	43
3.6. Иммуноферментный анализ	46
3.7. Анализ влияния среды, кондиционированной клетками НЕК293FT, трансфицированными плДНК рBud-Kan-VEGF165A-BMP2, на остеогенную дифференцировку ММСК костного мозга и остеобластов крысы	47
3.7.1 Определение минеральных отложений	47
3.8. Создание ген-активированного остеопластического материала	50
3.8.1 Совмещение плазмидной ДНК с остеопластическими материалами и определение емкости материалов для плазмидной ДНК	50
3.9 Оценка влияния ген-активированных остеопластических материалов на процессы регенерации костной ткани	52
4 ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	58

ВВЕДЕНИЕ

Персистирующие костные дефекты различной этиологии трудно поддаются общепринятым методам лечения и сопровождаются длительной потерей трудоспособности пациента, вплоть до инвалидности, вызывающей существенный экономический и социальный ущерб. Такие костные дефекты возникают чаще всего в результате нарушения консолидации перелома, остеонекрозов различной этиологии, протяженных дефектов трубчатых костей, при ранениях, операциях на черепе. Даже при обычном переломе риск развития нарушения его консолидации и формирования дефекта составляет до 10%, а при патологиях, сопровождающихся нарушением местной и общей трофики, эта вероятность возрастает до 28% [Hernandez *et al.*, 2012].

На сегодняшний день многообещающим направлением является применение синтетических и натуральных остеопластических материалов. Основными требованиями к материалам являются наличие остеоиндуктивных и остеоиндуктивных свойств. Для заполнения костного дефекта они должны заполнять собой костный дефект, обладать необходимой формой и механическими свойствами, соответствующими потерянной костной ткани. Единственным ограничением является размер костного дефекта, так как большие размеры импланта отрицательно сказываются на васкуляризации его центральных областей, что влечет за собой замедление ремоделирования костной ткани [Kang *et al.*, 2014]. При обширных дефектах существует риск нарушения регенерации в связи с нарушением местной трофики тканей, обусловленной сопутствующим повреждением сосудов, нервов и мягких тканей.

Один из современных подходов к стимуляции репаративных процессов в клеточном окружении — внесение факторов роста в место повреждения.

Применение белковых факторов *in situ* сильно ограничено вследствие их быстрого разрушения протеолитическими ферментами [Demidova-Rice *et al.*, 2012] В связи с этим возник вопрос о стимуляции экспрессии целевых белков непосредственно клетками костного ложа. Наиболее целесообразным является применение генной терапии с использованием BMP2 и VEGF165 совместно в составе единой конструкции.

Значительное количество костной ткани может быть восполнено, если объединить два подхода — остеопластические материал и плДНК, ко-экспрессирующая гены *bmp 2* и *vegf165a*. Кроме собственно возмещения этот подход позволит обеспечить васкуляризацию импланта за счет прорастания кровеносных сосудов реципиента в место имплантации и дополнительно стимулировать остеогенез за счет улучшения трофики.

Таким образом, в клетки, трансфицированных плазмидной конструкцией, несущей гены белковых факторов VEGF165 и BMP2, можно будет наблюдать синергичное воздействие этих белковых факторов на процессы остео- и ангиогенеза *in vitro* и репаративного остеогистогенеза *in vivo*, что представляет большой практический и фундаментальный интерес. Доставка плазмидной ДНК *in vivo* представляет особую сложность в генной терапии и биомедицине, что и ограничивает использование подобных технологий. В этой связи новый терапевтический инструмент в виде ген-активированного костного графта (ГАКГ), выполняющего совместно с функцией передачи генов также функции остеокондукции и остеоиндукции, представляет несомненный практический интерес.

Цель работы: проанализировать влияние плазмидной ДНК, кодирующей гены VEGF165A и BMP2, на процессы остеогенеза и ангиогенеза *in vitro* и *in vivo*.

В соответствии с целью были поставлены следующие экспериментальные задачи:

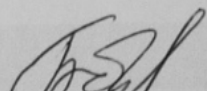
1. Создать двухкассетную экспрессионную плазмидную конструкцию pBud-Kan-coVEGF165-coBMP2, ко-экспрессирующую одновременно и независимо факторы VEGF165A и BMP2;
2. Проанализировать работоспособность плазмидной конструкции pBud-Kan-coVEGF165-coBMP2 и ее влияние на процессы osteo- и ангиогенеза *in vitro*;
3. Создать ГАМ с применением разработанной плДНК pBud-VEGF-BMP2, и проанализировать его влияние на остеогенез и ангиогенез *in vivo* в модели дефекта бедренной кости крысы.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Халиуллин Марсель Рафисович
Факультет, кафедра, номер группы	Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра генетики, группа 01-404
Тип работы	Не указано
Название работы	Халиуллин Марсель Рафисович Антиплагиат.docx
Название файла	Антиплагиат.docx
Процент заимствования	8,52%
Процент цитирования	0,38%
Процент оригинальности	91,10%
Дата проверки	21:40:00 05 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; 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

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.