

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

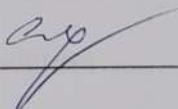
Специальность: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
Дипломная работа

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ  
БЕТА-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А И ОЦЕНКА ИХ  
ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ *IN VIVO*

Работа завершена:

« 7 » 06 2022 г.



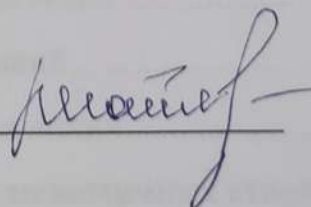
(А.Р. Шаршин)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

ассистент кафедры генетики

« 7 » 06 2022 г.



(А.А. Шайнов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

« 8 » 06 2022 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 GM2 ганглиозидозы .....	7
1.2 БТС .....	8
1.3 Диагностика БТС .....	11
1.5 Методы лечения БТС .....	14
1.5.1 Субстрат-редуцирующая терапия.....	14
1.5.2 Заместительная терапия.....	15
1.5.3 Трансплантация костного мозга и пуповинной крови .....	16
1.5.4 Генная терапия.....	16
1.6 Лентивирусные векторы .....	19
1.7 МСК .....	20
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	23
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	23
2.1 Объект, схема и методика исследования .....	23
2.2 Описание плазмидных векторов и кодонная оптимизация нуклеотидных последовательностей генов .....	23
2.3 Выделение МСК из жировой ткани.....	24
2.4 Пассирование клеточных линий .....	25
2.5 Криоконсервация клеточных линий.....	26
2.6 Генетическая модификация мезенхимных стволовых клеток.....	26
2.7 Получение рекомбинантного лентивируса LV-HEXA-HEXB.....	27
2.8 Выделение мРНК из клеток и гомогенатов органов.....	27
2.9 Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) .....	28

2.10 Вестерн-блот анализ.....	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	32
3.1 Получение генетической конструкции рLX303-HEXA-P2A-HEXB.....	32
3.2 Определение количества мРНК трансгена в генетически модифицированных чМСК.....	33
3.3 Определение ферментативной активности НехА в кондиционированной среде трансдуцированных МСК .....	35
3.4 Анализ экспрессии белков HEXA и HEXB .....	36
3.5 Анализ ферментативной активности НехА в плазме крыс после введения кМСК-HEXA-HEXB.....	37
3.6 Исследование безопасности введения генетически модифицированных МСК путем анализа изменения лейкоформулы и процента живых клеток в иммунных органах сыворотки крови лабораторных крыс. ....	38
ВЫВОДЫ .....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	43

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

HexA	$\beta$ -гексозаминидаза А
HLA	Антигены тканевой совместимости
LTRs	Long terminal repeats
MUG	4-метилумбеллиферил-бета-DN-ацетилглюкозамин
MUGS	4-метилумбеллиферил-бета-DN-ацетилглюкозамин-6-сульфат
ААВ	Адено-ассоциированные вирусы
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ВПГ-1	Вирус простого герпеса 1 типа
гРНК	Геномная рибонуклеиновая кислота
ГЭБ	Гематоэнцефалический барьер
ДНК	Десоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	Дезоксинуклеотидтрифосфаты
ЛБН	Лизосомные болезни накопления
М6Ф	Маннозо-6-фосфат
МКПК	Мононуклеарные клетки периферической крови
МСК	Мезенхимальные стволовые клетки
МФ	Мононуклеарная фракция
ПААГ	Электрофорез в полиакриламидном геле
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РКВ	Репликационно-компетентные вирусы
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СРТ	Субстрат-редуцирующая терапия
ТКМ	Трансплантация костного мозга
ЦНС	Центральная нервная система

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Тея-Сакса на данный момент является наиболее изученным и описанным GM2 ганглиозидозом, а также является одним из самых тяжело протекающих лизосомных заболеваний (OMIM 272800). БТС наследуется аутосомно-рецессивным путем и возникает в результате накопления GM2 ганглиозидов в тканях организма. Различные виды мутаций гена *HEXA* приводят к дефициту фермента HexA, а вследствие к возникновению БТС. Возраст начала заболевания и тяжесть проявления клинических признаков при БТС зависят от типа мутаций и остаточной активности *HEXA*. Патологическое накопление GM2 ганглиозида в тканях организма является идеальным примером для изучения лизосомных болезней накопления. При БТС характерная задержка развития и дальнейший регресс с быстро прогрессирующей нейродегенерацией чаще всего вызывает преждевременную смерть пациентов. На данный момент не было найдено эффективного лечения БТС, были описаны клинические случаи применения трансплантации костного мозга или пуповинной крови, субстрат-редуцирующей терапии. К сожалению, существующие на сегодняшний день методы не позволяют предотвратить усугубление нейродегенерации у пациентов с БТС.

**Цель работы** — получить бицистронный вектор на основе рекомбинантного лентивируса, одновременно кодирующий гены бета-гексозаминидазы А, оценить его функциональность и безопасность на клеточной культуре мезенхимных стволовых клеток человека *in vitro* и лабораторных животных *in vivo*.

В работе решались следующие задачи:

1) Получить бицистронный вектор на основе рекомбинантного лентивируса, включающий оптимизированные по кодонному составу кДНК генов *HEXA* и *HEXB*, разделенные нуклеотидной последовательности Р2А-пептида.

2) Нарботать препаративное количество рекомбинантного лентивируса LV-HEXA-2A-HEXB. Получить генетически модифицированные мезенхимные стволовые клетки человека (чМСК) со сверхэкспрессией генов *HEXA* и *HEXB* (чМСК-HEXA-HEXB).

3) Охарактеризовать чМСК-HEXA-HEXB путем кПЦР, теста на активность HexA и вестерн-блот анализа.

4) Получить генетически модифицированные крысиные МСК (кМСК-HEXA-HEXB). Оценить ферментативную активность HexA в плазме крови крыс после внутривенного введения кМСК-HEXA-HEXB.

5) Оценить влияние внутривенного введения кМСК-HEXA-HEXB на изменение количественного соотношения живых и мертвых клеток в иммунных органах и лейкоформулы крови крыс.

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Шарафиева Алия Фаридовна  
Самоцитирование  
рассчитано для: Шарафиева Алия Фаридовна  
Название работы: Антиплагиат Шарафиева  
Тип работы: Дипломная работа  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	8.39%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	8.39%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	91.24%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	91.24%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.36%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.36%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 03.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 03.06.2022 17:53

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); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Каюмов Айрат Рашитович  
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.