

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.62) - биология

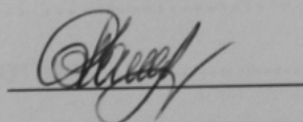
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОФЕНОТИПА, МОЛЕКУЛЯРНОГО
СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАННЫХ
ВЕЗИКУЛ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Работа завершена:

«06» июня 2017г.



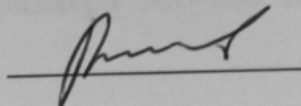
(Клетухина С.К.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

д.б.н., доцент каф. генетики

«06» июня 2017г.

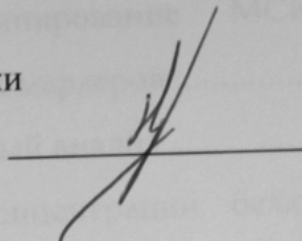


(Ризванов А.А.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор каф. генетики

«__» _____ 2017г.



(Чернов В.М.)

Казань-2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Клеточная терапия стволовыми клетками человека	7
1.2 Ограничения клеточной терапии стволовыми клетками.....	10
1.3 Теория паракринной стимуляции	11
1.4 Внеклеточные везикулы клеток млекопитающих	13
1.5 Регенеративный потенциал внеклеточных везикул стволовых клеток	14
1.6 Стимуляция высвобождения мембранных везикул с помощью цитохалазина В.....	16
1.7 Заключение по обзору литературы	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Культуры клеток человека, культивирование клеточных культур	21
2.2 Лабораторные животные	22
2.3 Пассирование клеточных культур.....	23
2.4 Получение МВ-ЦВ	23
2.5 Приготовление мембранных везикул и проведение сканирующей электронной микроскопии	24
2.6 Определение размера МВ-ЦВ МСК с помощью проточного цитофлуориметра – сортера.....	25
2.7 Иммунофенотипирование МСК/МВ МСК с помощью специфичных поверхностных маркеров	25
2.8 Мультиплексный анализ	27
2.9 Измерение концентрации белка методом бицинхониновой	

КИСЛОТЫ	28
2.10 Нанесение МВ-ЦВ МСК на клетки-реципиенты	28
2.11 Дифференцировка МСК мышцы	29
2.11.1 Дифференцировка в адипогенном направлении культуры	
МСК	30
2.11.2 Дифференцировка в остеогенном направлении культуры МСК	
.....	30
2.11.3 Дифференцировка в хондрогенном направлении культуры	
МСК	31
2.12 Окрашивание мембранным красителем МВ-ЦВ МСК мышцы .	32
2.13 Введение МВ МСК мышцы подкожно и внутримышечно	32
2.14 Оценка биораспределения МВ МСК мышцы	33
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	34
3.1 Получение мембранных везикул мезенхимных стволовых	
клеток человека с помощью цитохалазина В и характеристика их размера ...	34
3.2 Сравнение иммунофенотипа мембранных везикул и	
мезенхимных стволовых клеток человека	37
3.3 Исследование молекулярного состава мембранных везикул	
мезенхимных стволовых клеток человека	39
3.4 Оценка молекулярных изменений в клетках-реципиентах,	
индуцируемое мембранными везикулами мезенхимных стволовых клеток	
человека	42
3.5 Исследование биораспределения аллогенных мембранных	
везикул <i>in vivo</i>	47
ВЫВОДЫ	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внеклеточные везикулы клеток человека привлекают к себе повышенное внимание исследователей и медиков во всем мире. Это подтверждает статистика количества работ, посвященных внеклеточным везикулам. За последние 5 лет количество исследований, содержащих словосочетание «внеклеточные везикулы», возросло более чем в два раза (согласно данным PubMed - база данных научной литературы). Внеклеточные везикулы – это окруженные цитоплазматической мембраной округлые структуры, которые содержат цитоплазматическое содержимое родительской клетки и обладают размером 50-2000 нм [Akers *et al.*, 2013]. Обнаружено, что внеклеточные везикулы высвобождают практически все клетки организма человека. В настоящее время общепризнанно, что внеклеточные везикулы участвуют в межклеточной коммуникации, доставляя биологически активные молекулы к клеткам-мишеням и/или запуская рецептор-опосредованный клеточный сигналинг [Akyurekli *et al.*, 2015].

Внеклеточные везикулы проявляют свойства родительских клеток, так как в процессе образования заключают их цитоплазматическое содержимое, в том числе различные факторы роста, цитокины и хемокины. Поэтому везикулы стволовых клеток человека рассматриваются как перспективный инструмент терапии различных заболеваний. Известно, что клеточная терапия стволовыми клетками (СК) человека таит в себе опасность неограниченного роста с формированием опухоли, а также дифференцировки СК в нежелательном направлении. Поэтому применение внеклеточных везикул СК позволит обойти ограничения и риски клеточной терапии с сохранением эффективности действия.

В 2005 году Pick *et al.* предложили индуцировать высвобождение мембранных везикул от клеток человека с помощью химического вещества цитохалазина В [Pick *et al.*, 2005]. Известно, что применение веществ,

нарушающих связь гликопротеинов цитоплазматической мембраны с цитоскелетом (дибукаин) [Fox *et al.*, 1990] и нарушающих актиновый цитоскелет клеток человека (цитохалазин, латрункулин А) [Choi *et al.*, 2012; Atanassoff *et al.*, 2014], приводит к увеличению количества высвобождающихся мембранных везикул.

Мембранные везикулы СК могут стать перспективным инструментом регенеративной терапии, поэтому целью нашего исследования явилось получение мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток человека с помощью цитохалазина В и характеристика их размера, молекулярного состава и биологической активности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Получение мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток человека с помощью цитохалазина В и характеристика их размера;
- 2) Сравнение иммунофенотипа мембранных везикул и мезенхимных стволовых клеток человека;
- 3) Исследование молекулярного состава мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток человека;
- 4) Оценка молекулярных изменений в клетках-реципиентах, индуцируемое мембранными везикулами мезенхимных стволовых клеток человека;
- 5) Исследование биораспределения аллогенных мембранных везикул *in vivo*.