

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии**

ЗЕЙДИНА
Елизавета Леонидовна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ
ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

Дипломная работа

Научный руководитель:
старший преподаватель кафедры
биохимии
М.С.Чумаченко

Допущена к защите
«_» _____ 2021г.
зав. кафедрой биохимии,
кандидат биологических наук, доцент И.В. Семак

Минск, 2021

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 88 страниц, 42 рисунка, 2 таблицы, 119 источников.

Ключевые слова: ЭКЗОСОМЫ, ПЛАЗМА КРОВИ, УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ, АНАЛИЗ ТРАЕКТОРИИ НАНОЧАСТИЦ, ДОТ-БЛОТ, КРОВЬ КРЫС, КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА, ДЕКСТРАН, ПЭГ.

Объектом исследования являлась плазма крови крыс, плазма крови человека, мезенхимальные стволовые клетки человека.

Область возможного практического применения: медицинская биохимия, медицина, фармакология.

Цель: провести сравнительную характеристику современных методов выделения и анализа экзосом плазмы крови.

В работе использовались методы ультрацентрифугирования, анализ траектории наночастиц, белковый ДСН-электрофорез, дот-блот и статистические методы обработки полученных данных.

Актуальность исследований обусловлена необходимостью разработки быстрых и недорогих методов выделения и анализа экзосом из биологических жидкостей с целью их дальнейшего использования в научных исследованиях и в клинической практике.

Научная новизна – впервые проведено выделение экзосом с помощью специально подобранных двухфазных полимерных систем, проведен сравнительный анализ методов выделения экзосом. Подобраны и оптимизированы методы детектирования методов.

В результате исследований, основанных на применении различных методов выделения и детекции экзосом из плазмы крови, было установлено, что применение метода ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы оптимально подходит для выделения экзосом из плазмы крови, при этом данный метод неэффективен и требует дополнительной оптимизации для выделения экзосом из мезенхимальных стволовых клеток. Из 15 двухфазных полимерных систем с помощью методов детекции экзосом таких как анализ траектории наночастиц и дот-блота были выбраны 2 системы (Система 1 - 4% декстран и 2,5% ПЭГ, 14% декстран и 2% ПЭ, 3,5% Система 2 - декстран и 1% ПЭГ), которые были наиболее эффективны при выделении экзосом. Данные системы были рекомендованы к проведению клинического исследования для мониторинга эффективности лечения Лимфомы Ходжкина в "Национальном медицинском исследовательском центре онкологии имени Н.Н.Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 88 старонак, 42 малюнкi, 2 табліцы, 119 крыніц.

Ключавыя словы: ЭКЗОСОМЫ, ПЛАЗМА КРЫВІ, УЛЬТРАЦЭНТРЫФУГІРОВАННЕ, АНАЛІЗ ТРАЕКТОРЫІ НАНАЧАСЦІЦ, ДОТ-БЛОТ, КРОЎ ПАЦУКІ, КРОЎ ЧАЛАВЕКА, ДЕКСТРАН, ПЭГ.

Аб'ектам даследавання з'яўлялася плазма крыві пацукоў, плазма крыві чалавека, мезенхімальных ствалавых клеткі чалавека.

Вобласць магчымага практычнага прымянення: медыцынская біяхімія, медыцына, фармакалогія.

Мэта даследавання: правесці параўнальную характарыстыку сучасных метадаў вылучэння і аналізу экзосом плазмы крыві. У працы выкарыстоўваліся метады ультрацэнтрыфугіравання, аналіз траекторыі наначасціц, бялковы ДСН-электрафарэз, дот-блот і статыстычныя метады апрацоўкі атрыманых дадзеных.

Аktуальнасць даследаванняў абумоўлена неабходнасцю распрацоўкі хуткіх і недарагіх метадаў вылучэння і аналізу экзосом з біялагічных вадкасцяў з мэтай іх далейшага выкарыстання ў навуковых даследаваннях і ў клінічнай практыцы.

Навуковая навізна - упершыню праведзена вылучэнне экзосом з дапамогай спецыяльна падобраных двухфазна палімерных сістэм, праведзены параўнальны аналіз метадаў выдзялення экзосом. Падобраны і аптымізаваны метады дэтэктавання экзосом. У выніку даследаванняў, заснаваных на ўжыванні ўжыванні розных метадаў вылучэння і дэтэкцыі экзосом з плазмы крыві, было ўстаноўлена, што прымяненне метаду ультрацэнтрыфугіравання ў градыенте сахарозы аптымальна падыходзіць для вылучэння экзосом з плазмы крыві, пры гэтым дадзены метады неэфектыўны і патрабуюць дадатковай аптымізацыі для вылучэння экзосом з мезенхімальных ствалавых клетак. З 15 двухфазных палімерных сістэм з дапамогай метадаў дэтэкцыі экзосом такіх як аналіз траекторыі наначасціц і дот-блот былі абраныя 2 сістэмы (Сістэма 14% декстран і 2,5% ПЭГ, 14% декстран і 2% ПЭГ, 3,5% Сістэма 2 - декстран і 1% ПЭГ), якія былі найбольш эфектыўныя пры выдзяленні экзосом. Дадзеныя сістэмы былі рэкамендаваныя для правядзення клінічнага даследавання для маніторынгу эфектыўнасці лячэння Лімфомы Ходжкіна ў "Нацыянальным медыцынскім даследчым цэнтры анкалогіі імя Н.Н.Петрова" Міністэрства аховы здароўя Расійскай Федэрацыі.

ABSTRACT

Graduate work, 88 pages, 42 drawings, 2 tables, 119 sources.

Key words: EXOSOMES, BLOOD PLASMA, ULTRACENTRIFUGATION, ANALYSIS OF THE NANOPARTICLE TRAJECTORY, DOT-BLOT, RAT BLOOD, HUMAN BLOOD, DEXTRAN, PEG.

The object of the study was rat blood plasma, human blood plasma, human mesenchymal stem cells.

The area of possible practical application: medical biochemistry, medicine, pharmacology.

Purpose of the study: to carry out a comparative characteristic of modern methods of isolation and analysis of blood plasma exosomes. Were used methods of ultracentrifugation, analysis of the trajectory of nanoparticles, protein SDS electrophoresis, dot blot and statistical methods of processing the data obtained.

The relevance of research is due to the need to develop fast and inexpensive methods for the isolation and analysis of exosomes from biological fluids with a view to their further use in scientific research and in clinical practice.

Scientific novelty - for the first time the isolation of exosomes was carried out using specially selected two-phase polymer systems, a comparative analysis of methods for isolation of exosomes was carried out. Methods for detecting exosomes were selected and optimized. As a result of studies based on the use of various methods for the isolation and detection of exosomes from blood plasma, it was found that the use of ultracentrifugation in a sucrose gradient is optimal for the isolation of exosomes from blood plasma, while this method is ineffective and requires additional optimization for the isolation of exosomes from mesenchymal stem cells. From 15 biphasic polymer systems using exosome detection methods such as nanoparticle trajectory analysis and dot blot, 2 systems were selected (System 1 - 4% dextran and 2.5% PEG, 14% dextran and 2% PEG, 3.5% System 2 - dextran and 1% PEG), which were most effective in exosome isolation. These systems were recommended for a clinical trial to monitor the effectiveness of treatment for Hodgkin's lymphoma at the Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation.