

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**«АНАЛИЗ САМООРГАНИЗАЦИИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК
НЕЙРОБЛАСТОМЫ IN VITRO НА МОДЕЛЯХ
ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА»**

Работа завершена:

Студент 4 курса, группа 01-501

«6 06 2019 г.

(Т.С. Прудников)

Научные руководитель

к.б.н., ассистент

«3 06 2019 г.

(В.В. Соловьева)

Заведующий кафедрой генетики

д.б.н., профессор

«4 06 2019 г.

(В.М. Чернов)

Казань-2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Виды онкологических заболеваний	7
1.2 Виды терапии, лечения и борьбы с опухолью	7
1.3 Виды доставки препарата	11
1.4 Трехмерные культуры, выращенные с использованием матрикса	12
1.4.1 Многоклеточные опухоли сфероидов (MCTS)	15
1.4.2 Подвешенные сфероиды	15
1.4.3 Аппаратная культура	18
1.4.4 Метод магнитной левитации	18
1.4.5 Метод ротационного бioreакторного культивирования	19
1.4.6 Культура встраивового геля	20
1.4.7 Скаффолд	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Выделение и культивирование клеток	26
2.2 Фенотипирование МСК	27
2.3 Окрашивание клеток флуоресцентными красителями	27
2.4 Подготовка планшета	27
2.5 Флуоресцентная микроскопия	27
2.6 FACS разделение клеток после совместного культивирования	28
2.7 Анализ жизнеспособности	28
2.8 Анализ клеточной пролиферативной активности	28
2.9 Мультиплексный анализ	29
2.10 Статистический анализ	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
3.1 Анализ самоорганизации клеток МСК и SH-SY5Y	30
3.2 Цитофлуориметрический анализ популяции клеток	32
3.3 Анализ жизнеспособности клеток после инкубации с цисплатином	36
3.4 Анализ цитокинового профиля ко-культуры	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	42
ВЫВОДЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

Основа опухоли представляет ключевую роль в увеличении, метастазирования и приобретении резистентности к химио- и лучевой терапии. Стромальные клетки в микроокружении опухоли принимают аномальный фенотип и функции, предопределенные сложной межклеточной сольватацией, в том числе клетка-клетка связями, паракринными факторами и другими биологически активными факторами, такие как внеклеточные везикулы, экстровизикулы их внутреннее содержимое и просто факторами среды [Wang *et al.*, 2017]. Опухолевая строма в обычной форме содержит в себе иммунные клетки и стволовые (мононуклеары, Т-хелперы, NK-клетки и нейтрофилы), миофибробласты, эндотелиальные клетки и опухоль-ассоциированные фибробlastы (англ. cancer associated fibroblasts, CAFs), адipoциты и внеклеточный матрикс (англ. extracellular matrix, ECM) [Quail and Joyce, 2013]. Сейчас проводится множество исследований связанных с CAFs из-за их активного воздействия на поддержку прогрессии, васкуляризации опухолей и индуцированно эпителиального-мезенхимного превращения (англ. epHitelial-mesencHymal transition, EMT) так же происходит увеличение процента инвазии. Ксенотрансплантатами глиомы исследуемые на мышиных моделях проявили высокую степень тропизма мезенхимных стволовых клеток (МСК) в районе опухолей [Kim *et al.*, 2016]. Строма опухоли демонстрирует собой тип хронического воспаления, содействуя рекрутированию и вовлечению стволовых опухолевых клеток (СОК) в онтогенез. [Wang *et al.*, 2015; Trivanovic *et al.*, 2016]. При проникновении в строму опухоли МСК способны дифференцироваться в более сложные мезенхимные клетки, такие как CAFs, макрофаги 1 и 2 типа или эндотелиальные клетки [Guan and CHen, 2013], одной из предназначений которых является в формирование хорошего микроокружения для увеличения опухоли. Такие формфакторы вовлекают опосредованную иммуносупрессию МСК секretируя интерферон γ (IFN $-\gamma$), фактор некроза опухоли α (TNF- α),

трансформирующий фактор роста β (TGF- β), интерлейкин1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-10, индоламина 2,3-диоксигеназы (IDO), простагландина E2 (PGE2) и оксида азота (NO) [Trivanovic *et al.*, 2016]. МСК, в свою очередь, также секретируют факторы, увеличивающие васкуляризацию опухоли, такие как фактор ингибирования лейкемии (LIF), колониестимулирующий фактор 1 (CSF1), белок-ингибитор макрофагов 2 (MIP2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [Solov'yeva *et al.*, 2012], IFN- γ , различные факторы роста как фактор роста опухолей (TGF) и TNF- α [RHee *et al.*, 2015]. Секреция фактора роста 1 стромальных клеток (SDF1), IL-6, NO, IL-3, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), M-CSF и гранулоциб тарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) приводит к повышению уровня резистентности к противоопухолевым препаратам, что так же демонстрирует значимую роль микроокружения в разростании опухоли [Guan and CHen, 2013]. Однако, помимо про-опухолевых свойств, МСК могут проявлять обратный эффект. МСК способны ингибировать рост опухоли, способствуя привлечению клеток воспалительного ответа [RHee *et al.*, 2015], ингибируя ангиогенез и сигнальные пути Wnt и AKT [Tai *et al.*, 2015], индуцируя остановку клеточного цикла и апоптоз [Madrigal *et al.*, 2014]. Фибронектин, ламинин и т.д. являются структурными белками и обеспечивают механическую поддержку ECM [Wang *et al.*, 2017]. На молекулярном уровне компоненты и концентрация активных биомолекул определяют субмикронную структуру ECM и его механические свойства, которые наряду с различными стимулирующими опухоль факторами, секретируемыми стромальными клетками, влияют на скорость и интенсивность метастазирования [Edgar *et al.*, 2014].

Современный скрининг противоопухолевых препаратов на данный момент нацелен на уничтожение не только самих раковых клеток но и на повышение регрессии роста микроокружения, в котором активно принимают участие различные стволовые клетки такие как МСК так и иммунные [CChoi *et al.*, 2015]

На данный момент официально принятым протоколом по проверке препаратов является панель NCI60, которая состоит из 60 различных видов

раковых клеток, посаженных на специальный планшет. Главным минусом этой панели является то, что она не учитывает многих внешних факторов, которые способствуют лекарственной резистентности к противоопухолевым препаратам. [Mingaleeva *et al.*, 2013]. Поэтому для создания наиболее точной тест системы *in vitro*, необходимо разработка модельного объекта, содержащего в себе не только опухолевые клетки, но остальные присущие данному типу рака или другой опухоли. Создание таких тест систем так же поможет проанализировать системы межклеточных взаимодействий, что может являться одним из новых таргетов в обнаружении слабых мест опухоли.

Цель работы – исследования формирования различных клеточных формирований на различных матрицах, оценка их жизнеспособности, анализ микроокружения и фиксирование морфологических изменений в ко-культуре. Для достижения поставленных целей были сформулированы следующие задачи:

- 1) Выделить мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга и провести анализ иммuno фенотипа.
- 2) Провести анализ самоорганизации МСК и клеток нейробластомы SH-SY5Y при совместном ко-культивировании на различных моделях внеклеточного матрикса
- 3) Окрасить клетки мембранными красителями для последующего изучения с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.
- 4) Проанализировать жизнеспособность МСК и SH-SY5Y как в ко-культуре так и в моно-.
- 5) Провести Мультиплексный анализ среды после инкубации клеток как в ко-культуре так и в моно- с помощью для определения состава среды.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Прудников Тихон Сергеевич
Подразделение	Дипломная работа Прудникова Тихона 01-501
Тип работы	Реферат
Название работы	диплом прудников тихон 2019
Название файла	диплом прудников тихон 2019.docx
Процент заимствования	10,11%
Процент цитирования	0,57%
Процент оригинальности	89,33%
Дата проверки	13:50:38 30 мая 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов

Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего	
Дата подписи	30.05.2019

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.