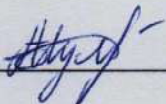


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление подготовки: 06.04.01– Биология

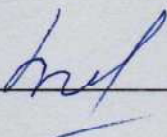
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТАБИЛЬНЫХ КУЛЬТУР
КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕПОРТЕРНЫЕ ГЕНЫ
ЛЮЦИФЕРАЗЫ И ДАЛЬНЕ КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО
БЕЛКА *IN VIVO* ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Студент 2 курса

" 6 " мая 2020 г.  (А.И. Муллагулова)

Научный руководитель

м.н.с., преподаватель

" 6 " мая 2020 г.  (Л.Г. Тазетдинова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 6 " мая 2020 г.  (В.М. Чернов)

Казань–2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Онкологические заболевания и противоопухолевые агенты	7
1.2 Тропизм мезенхимных стволовых клеток к опухолевым нишам	11
1.3 Нейробластома.....	15
1.4 Ксенографтные опухолевые модели.....	17
1.5 Лентивирусы	20
1.6 Репортерные гены.....	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Объект и материалы исследования.....	26
2.2 Культивирование пакующей линии клеток НЕК 293 FT	27
2.4 Выделение, культивирование и иммунофенотипирование мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани мыши	29
2.5 Пассирование клеточных культур	30
2.6 Криоконсервация клеточных культур	30
2.7 Характеристика мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани (МСК-ЖТ).....	31
2.9 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 α	33
2.10 Генетическая трансформация клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 α	34
2.11 Приготовление бактериальной культуры <i>E. Coli</i> для длительного хранения.....	35
2.12 Выделение плазмидной ДНК	36
2.13 Получение рекомбинантных лентивирусов	38

2.14	Получение генетически модифицированных МСК-ЖТ и SH-SY5Y, экспрессирующих репортерные белки ffLuc и Katushka2S	39
2.15	Вестерн блот анализ экспрессии ffLuc в МСК-ЖТ мыши	40
2.16	Создание ксенографтной модели нейробластомы, путем введения в тело мыши опухолевой линии клеток SH-SY5Y	42
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ		44
3.1	Трансформации клеток <i>E. Coli</i>	44
3.2.	Получение рекомбинантного лентивируса	45
3.3	Выделение и характеристика мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани (МСК-ЖТ)	47
3.4	Получение и характеристика генетически модифицированных МСК мыши, экспрессирующих репортерные белки ffLuc (МСК-ЖТ-ffLuc) и Katushka2s (МСК-ЖТ-Katushka2S)	50
3.5	Загрузка МСК-ЖТ противоопухолевыми химиопрепаратами паклитаксел и цисплатин и мультиплексный анализ	52
3.6	Создание ксенографтной модели нейробластомы, путем введения в тело мыши опухолевой линии клеток SH-SY5Y	54
3.7	Исследование тропизма и миграции МСК-FFLUC, загруженных противоопухолевыми препаратами, на ксенографтных мышечных моделях нейробластомы с использованием биолюминесцентной визуализации	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		60
ВЫВОДЫ.....		63

ВВЕДЕНИЕ

Онкогенез является сложным и динамическим процессом, включающим формирование опухолевой стромы, взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением, которое является основной характеристикой большинства злокачественных опухолей. Ключевым фактором роста и прогрессирования опухоли все больше признается ее микроокружение (МО), в состав которой входят иммунные, стромальные и мезенхимные стволовые клетки (МСК). Однако, роль последних вызывают противоречивые мнения, с одной стороны есть данные, которые указывают на ингибирование роста ряда эпителиальных опухолей, с другой стороны МСК секретируют различные факторы роста, питающие растущую опухоль. Эталоном в исследованиях онкогенеза являются ксенографтные модели опухолей на иммунодефицитных мышах, но эти модели имеют очень важный недостаток – отсутствие адаптивного иммунитета. Ксенотрансплантаты обеспечивают более сложную основу для изучения процесса онкогенеза в условиях *in vivo*. На сегодняшний день эти ксенотрансплантаты были протестированы на иммунодефицитных животных, но полная ликвидация адаптивного иммунитета является существенным недостатком. Иммунная система играет ключевую роль при моделировании противоопухолевой терапии, но более 90 % успешных доклинических исследований противоопухолевой терапии терпят неудачи в клинических испытаниях. Это связано с влиянием иммунной системы при формировании опухолевой стромы. Ключевую роль в формировании опухоли играют клеточные и неклеточные компоненты ниши, которые способствуют приобретению признаков злокачественности растущей аномальной ткани. В некоторых случаях благоприятным условием для развития атипичных клеток можно считать даже повреждение тканей. Клеточные и неклеточные компоненты опухолевой ниши формируют опухолевое микроокружение, который состоит из внеклеточного матрикса, миофибробластов, эндотелиальных, нейроэндокринных клеток, жировых клеток, мезенхимных стволовых клеток, иммуно-воспалительных клеток, а также из кровеносных и лимфатических сосудистых сетей.

Известно, что МСК проявляют выраженный тропизм к опухолевым нишам, что делает их перспективными векторами для доставки противоопухолевых агентов к трансформированным клеткам. В тоже время остается неясным влияние загрузки МСК химиотерапевтическими препаратами на их миграционную активность и тропизм к опухолевым нишам. Данная работа направлена на определение и анализ фундаментальных механизмов адресной миграции и хоминга МСК, загруженных химиотерапевтическими препаратами, в очаги опухолеобразования. Полученные фундаментальные данные лягут в основу для усовершенствования и внедрения в клиническую практику методов адресной доставки противоопухолевых агентов с использованием стволовых клеток.

Цель работы – получение стабильных опухолевых клеточных линий нейробластомы человека, экспрессирующих репортерные белки для создания ксенографтных опухолевых моделей и исследование адресной миграции мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани мыши (МСК-ЖТ) с использованием системы витальной визуализации *in vivo*.

Для достижения цели были выдвинуты следующие **задачи**:

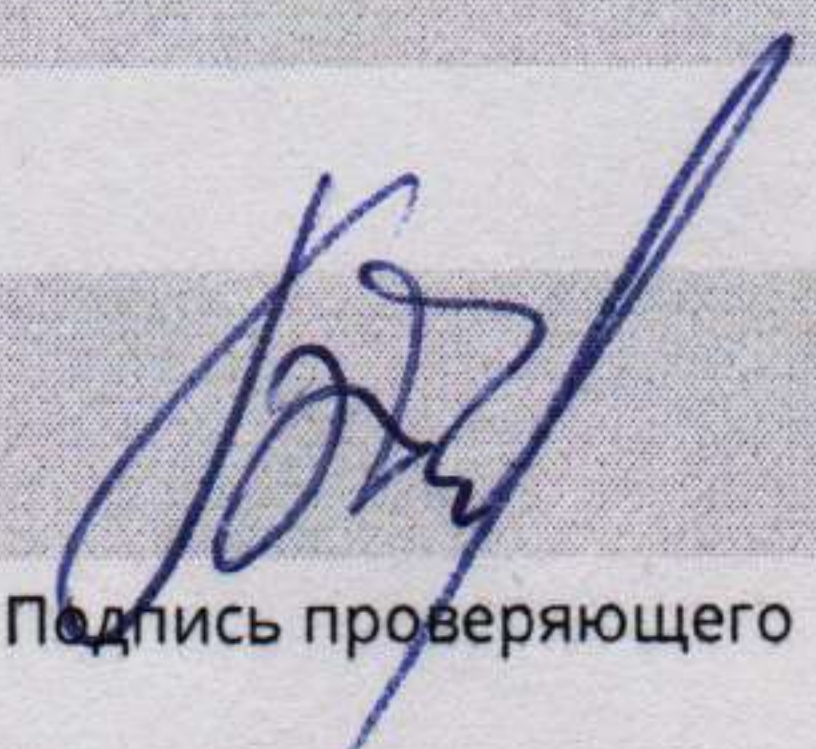
1. Получение в препаративных количествах плазмидных конструкций pMD2-VSV-G (оболочечная плаزمида), pCMV-dR8.74 (упаковочная плазмида) и векторной плазмиды pLX302 Luciferase-V5 puro и pLX303-Katushka2S, необходимых для сборки лентивирусных частиц.
2. Создание и получение в препаративных количествах рекомбинантных репликационно дефектных лентивирусов, экспрессирующих белки биолюминесценции ffLuc и дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S.
3. Выделение мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани мыши (МСК-ЖТ), иммунофенотипический анализ выделенных клеток. Оценка способности МСК-ЖТ к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.
4. Получение генетически модифицированных МСК-ЖТ и SH-SY5Y, экспрессирующих репортерные белки ffLuc и Katushka2S (МСК-ЖТ-ffLuc, МСК-ЖТ-Katushka2S, SH-SY5Y-ffLuc, SH-SY5Y-Katushka2S).

5. Оценка экспрессии ffLuc в генетически модифицированных SH-SY5Y-ffLuc с использованием вестерн блот анализа.
6. Загрузка генетически модифицированных (МСК-ЖТ-ffLuc и МСК-ЖТ-Katushka2S) и нативных МСК-ЖТ противоопухолевыми химиопрепаратами паклитаксел и цисплатин.
7. Проведение мультиплексного анализа для оценки изменений в секреции цитокинов/хемокинов и факторов роста нативных МСК-ЖТ, МСК-ЖТ-ffLuc и МСК-ЖТ-Katushka2S после загрузки химиопрепаратами цисплатин и паклитаксел.
8. Получение ксенографтной модели нейробластомы, путем введения в тело мыши генетически модифицированной опухолевой клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y-ffLuc.
9. Оптическая визуализация *in vivo* миграции МСК-ЖТ-Katushka2S, загруженных противоопухолевыми препаратами цисплатин и паклитаксел, в теле ксенографтной мыши с помощью системы IVIS Spectrum In Vivo Imaging System.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Муллагулова Айсылу Илдаровна
Подразделение	
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Магистерская диссертация.docx
Название файла	вкр.docx
Процент заимствования	17.42 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.49 %
Процент оригинальности	82.10 %
Дата проверки	14:45:51 22 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по elibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	22.05.2020  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.