

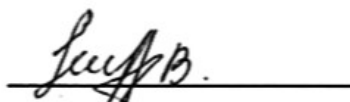
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01– Биология


Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КАРЦИНОМ ПОД
ДЕЙСТВИЕМ СОЧЕТАННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ

Студентка 4 курса
группы 01-801
" 1 " июня 20__ г.


_____ (Щербакова А.В.)

Научный руководитель
к.б.н., доцент
" 1 " июня 20__ г.


_____ (Зеленихин П.В.)

Заведующий кафедрой
микробиологии
д.б.н., профессор
" 1 " июня 20__ г.


_____ (Ильинская О.Н.)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Инвазия и миграция опухолевых клеток	8
1.1.1 Коллективная миграция	9
1.1.2 Одиночная миграция	9
1.2 Сочетанные противоопухолевые агенты	11
1.3 Мишени воздействия комбинированных противоопухолевых препаратов	13
1.3.1 Путь антиоксидантной реакции Nrf2-Keap1	14
1.3.2 Путь карбоангидразы	15
1.3.3 Пути апоптоза	15
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	17
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	17
2.1 Тестируемые соединения	17
2.2 Культура клеток	17
2.3 МТТ-тест	18
2.4 Оптимизация состава питательной среды для анализа миграционной активности клеток A431 при помощи метода повреждающего штриха	19
2.5 Анализ влияния противоопухолевых агентов на миграцию клеток A431 <i>in vitro</i> при помощи метода повреждающего штриха	20
2.6 Характеристика сочетанного действия препаратов	21
2.7 Статистическая обработка результатов	22
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	23
3.1 Цитотоксическая активность биназы и доксорубицина	23
3.2 Анализ влияния FBS на скорость миграции клеток A431	25
3.3 Анализ миграции клеток A431 <i>in vitro</i> под действием противоопухолевых агентов	27

3.4 Характеристика сочетанного действия препаратов	29
ВЫВОДЫ	31
БЛАГОДАРНОСТИ	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	33

ВВЕДЕНИЕ

Способность к миграции - важнейшее свойство живых клеток, благодаря которому происходят такие процессы, как возникновение иммунных ответов, заживление ран, зачатие и эмбриональное развитие [Radu *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2011]. Помимо этих благоприятных либо нейтральных для организма процессов, подвижность клеток также может вызывать и негативные паталогические проявления, например метастазирование злокачественных новообразований или воспаление.

Метастазирование – это движение и распространение раковых клеток из первичного очага опухоли в отдаленные органы. К сожалению, его молекулярные механизмы пока ещё плохо изучены из-за их очевидной сложности. Существует множество методов анализа миграционных особенностей клеток, которые приносят огромную пользу для широкого спектра дисциплин в биологии, медицине, биоинженерии и смежных областях.

Миграция и инвазия злокачественных клеток привлекают особое внимание ученых, поскольку они являются критическими компонентами метастазирования, процесса, считающегося основной причиной смерти онкологически больных [Tarin *et al.*, 2008]. Для того, чтобы рак распространялся и диссеминовал по всему телу, раковые клетки должны мигрировать через внеклеточный матрикс (ВКМ), проникать в кровеносные сосуды, с током крови достигать определенного участка и, наконец, выходить за пределы сосуда, чтобы сформировать очаги в других местах организма [Castellone *et al.*, 2011]. Благодаря различным тестам можно получить данные, которые позволяют понять, насколько хорошо конкретный тип клеток может спонтанно мигрировать или реагировать на вещество и направленно мигрировать к нему.

Ингибирование метастатического распространения клеток опухолей, достаточно трудоемко, требует одновременного воздействия препаратов на

различные этапы метастатического каскада. Другой сложностью является длительность разработки новых подходов к терапии раковых заболеваний. Требуется, по меньшей мере, 10–15 лет для создания и тестирования принципиально нового лекарственного средства [Mohs *et al.*, 2017]. В связи с этим большое внимание исследователей приковано к использованию уже имеющихся препаратов в сочетаниях для воздействия на разные этапы распространения опухоли. Данный способ терапии был впервые предложен еще в 1965 году Эмилом Фреем. Он вместе с коллегами использовал для лечения лимфолейкоза сочетание нескольких препаратов – метотрексата, 6-меркаптопурина, винкристина и преднизона [Frei *et al.*, 1965]. На удивление, такой подход к лечению опухоли оказался весьма эффективным. Впоследствии комбинации различных препаратов начали широко использовать для обеспечения противоопухолевого действия, уменьшения скорости роста опухоли, снижения метастатической активности и индукции апоптоза [Mokhtari *et al.*, 2017]. Множество новых и перспективных подходов предполагают сочетания агентов, направленных на разные мишени и имеющих разные механизмы действия. Одним из потенциальных компонентов сочетанной противоопухолевой терапии могут стать рибонуклеазы (РНКазы) микроорганизмов, мишенями которых являются РНК, не связанные с белками, т. е. транспортные и некодирующие мРНК. Важно, чтобы продуцентами РНКаз были организмы, наиболее филогенетически далекие от млекопитающих для того, чтобы избежать ингибирующего действия протекторов РНК [Mitkevich *et al.*, 2019]. Таким образом, РНКазы в комбинации с уже изученными противоопухолевыми антибиотиками могут в перспективе использоваться в качестве ингибиторов метастазирования опухолей, поскольку будут нацелены на различные молекулярные пути.

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы стала характеристика влияния сочетанного действия рибонуклеазы *Bacillus pumilus* – биназы и противоопухолевого антибиотика доксорубицина на

жизнеспособность и миграционную активность клеток эпидермоидной карциномы человека A431.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Определить цитотоксическую активность биназы и доксорубицина в отношении клеток A431 при помощи МТТ-теста;
- 2) Оптимизировать состав питательной среды для проведения анализа миграционной способности клеток A431 методом повреждающего штриха;
- 3) Определить миграционную активность клеток A431 под воздействием биназы и доксорубицина при монообработке и в сочетаниях;
- 4) Охарактеризовать сочетанное антимиграционное действие биназы и доксорубицина в отношении инвазивных клеток A431.

ВЫВОДЫ

1) Определена цитотоксическая активность биназы и доксорубицина в отношении клеток А431 при помощи МТТ-теста. Биназа в выбранном диапазоне концентраций не проявила выраженное токсическое действие. Доксорубин оказал токсическое действие на клетки в выбранном диапазоне концентраций, и его IC_{50} составила 0.013 мкг/мл.

2) Охарактеризовано влияние содержания фетальной сыворотки в среде на миграционную и пролиферативную активность клеточной линии А431. Среда α -МЕМ с 5 % содержанием FBS была выбрана в качестве оптимальной для проведения оценки миграционной активности;

3) Продемонстрировано влияние биназы и доксорубицина на миграционную активность клеток А431 при монообработке и в сочетаниях. Наиболее выраженные антимиграционные свойства проявляла биназа при монообработке в концентрациях 10 мкг/мл и 50 мкг/мл;

4) Охарактеризовано сочетанное действие биназы и доксорубицина на миграционную активность клеток эпидермоидной карциномы А431. Комбинации препаратов оказывают преимущественно антагонистическое действие. Аддитивный эффект установлен для сочетания 50 мкг/мл биназы и 0.005 мкг/мл доксорубицина.