

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

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

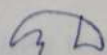
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**Исследование противоопухолевых и
иммуномодулирующих свойств мезенхимных
стволовых клеток со сверхэкспрессией
интерлейкина 2**

Работа завершена:

«20» мая 2019 г.




Чулпанова Д.С.

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., в.н.с., ст. преподаватель кафедры генетики КФУ

«6» июня 2019 г.

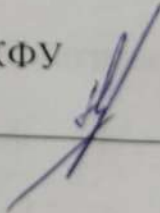


Соловьева В.В.

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор кафедры генетики КФУ

«6» июня 2019 г.



Чернов В.М.

Казань-2019

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 8 |
| 1.1 Мезенхимные стволовые клетки в терапии онкологических заболеваний..... | 8 |
| 1.1.1 Взаимодействие между опухолью и МСК..... | 8 |
| 1.1.2 Использование генетически модифицированных МСК в терапии онкологических заболеваний | 10 |
| 1.2 Цитокины в терапии онкологических заболеваний | 12 |
| 1.2.1 Интерлейкин-2 | 14 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 17 |
| 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 17 |
| 2.1 Культуры клеток и культивирование..... | 17 |
| 2.2 Дифференцировка МСК в адипоциты, хондроциты и остеобласты | 18 |
| 2.3 Получение рекомбинантных лентивирусов | 18 |
| 2.4 Генетическая модификация и селекция | 19 |
| 2.5 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени | 20 |
| 2.6 Вестерн-блот анализ..... | 21 |
| 2.7 Иммунофенотипирование | 22 |
| 2.8 Детекция апоптоза и некроза | 22 |
| 2.10 Анализ пролиферативной активности клеток | 23 |
| 2.11 Просвечивающая электронная микроскопия | 23 |
| 2.12 Мультиплексный анализ..... | 24 |
| 2.13 Анализ активации МКПК..... | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2.14 Совместное культивирование опухолевых клеток и МСК | 25 |
| 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 27 |
| 3.1 Экспрессия IL2 не влияет на жизнеспособность, иммунофенотип и пролиферативную активность МСК | 27 |
| 3.2 МСК со сверхэкспрессией IL2 сохраняют фенотип и свойства мезенхимной стволовой клетки | 29 |
| 3.3 Экспрессия IL2 влияет на ультраструктуру МСК | 31 |
| 3.4 Сверхэкспрессия IL2 может оказывать влияние на уровень секреции других цитокинов | 33 |
| 3.5 Кондиционированная среда МСК-IL2 может стимулировать пролиферативную активность опухолевых клеток | 35 |
| 3.6 МСК-IL2 могут стимулировать ангиогенез и способность к инвазии опухолевых клеток | 36 |
| 3.7 Кондиционированная среда от МСК-IL2 активирует мононуклеарные клетки периферической крови <i>in vitro</i> | 38 |
| 3.8 Совместное культивирование МСК-IL2 снижает пролиферацию и вызывает апоптоз клеток нейробластомы SH-SY5Y | 42 |
| ВЫВОДЫ | 45 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 46 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 49 |

ВВЕДЕНИЕ

Препараты на основе рекомбинантных цитокинов все чаще используются в иммунотерапии онкологических заболеваний. Одним из первых цитокинов, одобренных для клинического применения, является интерлейкин 2 (англ. interleukin 2, IL2). Данный цитокин обладает выраженным противоопухолевым действием благодаря целому ряду свойств, включая влияние на процессы программированного клеточного роста, дифференцировку и другие клеточные функции [Conlon *et al.*, 2019]. Интерлейкин 2 играет ключевую роль в иммунорегуляции, показано, что внутривенное введение высоких доз рекомбинантного IL2 вызвало 3 полных и 5 частичных ответов у 23 пациентов с метастатическим раком почки [West, 1989]. После терапии с использованием низких доз ИЛ2 трое из 18 пациентов (17%) с метастатическим раком почки достигли ответа: один полного, 2 частичного [Stoter *et al.*, 1989]. Использование IL2 так же одобрено для лечения пациентов с метастатической меланомой [Davar *et al.*, 2017].

Однако, несмотря на свой потенциал, иммунотерапия с использованием рекомбинантного IL2 сталкивается с несколькими проблемами, например, короткий период полувыведения IL2 и нежелательные побочные эффекты от введения. Независимо от метода введения, IL2 моментально выводится из циркуляции посредством почечной фильтрации, период его полувыведения составляет минуты [Donohue and Rosenberg, 1983]. Введение IL2 в высоких дозах может привести к развитию синдрома повышенной проницаемости капилляров, который тесно связан с возрастающей проницаемостью сосудов, гипотензией, отеком легких, гибелью клеток печени и отказом почек [McDermott and Atkins, 2004]. Помимо этого, IL2 способен стимулировать регуляторные Т-клетки, ослабляющие опухоль- и вирус-специфические иммунные ответы [Boyman *et al.*, 2006].

По этим причинам использование рекомбинантного IL2 в качестве терапевтического агента было относительно невелико. Одной из стратегий, которая может снизить системную токсичность IL2, является использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) и полученных из них внеклеточных везикул в качестве векторов для целевой доставки в опухолевые ниши. Способность миграции МСК к очагам опухолеобразования описана во многих источниках на ксенографтных моделях опухолей человека [Nakamizo *et al.*, 2005; Melzer *et al.*, 2016; Kalimuthu *et al.*, 2018]. Nakamizo с соавторами показали избирательную миграцию МСК к ксенотрансплантату глиомы у ксенографтных мышей при введении в сонную артерию. При этом фибробласты не проявляли описанный для МСК тропизм [Nakamizo *et al.*, 2005].

МСК могут служить векторами для доставки химиотерапевтических препаратов, белков-онкосупрессоров, иммуномодулирующих цитокинов и миРНК [Chulpanova *et al.*, 2018a]. Генетически модифицированные МСК со сверхэкспрессией цитокинов/хемокинов показали свою эффективность в активации клеток иммунной системы и подавлении роста ряда опухолей как *in vitro*, так и на животных моделях *in vivo* [Nakamura *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014].

Показано, что МСК со сверхэкспрессией IL2 повышали уровень инфильтрации мозга NK-клетками на мышинной модели глиомы [Hong *et al.*, 2009], снижали метастазирование и индуцировали апоптоз опухолевых клеток у мышей с моделью рака яичников [Zhao *et al.*, 2011]. You с соавторами показали, что введение МСК из амниотической жидкости, трансфицированных плазмидой, кодирующей кДНК гена IL2, привело к индукции апоптоза клеток рака яичников у модельных мышей *in vivo* [You *et al.*, 2015].

При разработке и внедрении методов генно-клеточной терапии на основе МСК остаются нерешенными вопросы о биобезопасности данного подхода, поскольку трансплантированные МСК могут оказывать как противо-, так и про-опухолевые эффекты, тем самым поддерживая рост опухоли и ее метастазирование. Показано, что МСК стимулируют прогрессию различных типов опухолей, таких как карцинома головы и шеи [Kansy *et al.*, 2014], глиома [Hossain *et al.*, 2015], рак молочной железы [Karnoub *et al.*, 2007] и др.

Цель работы — проанализировать влияние сверхэкспрессии IL2 на биологические свойства мезенхимных стволовых клеток, их противо- и про-опухолевую активность и способность к активации иммунных клеток *in vitro*.

Задачи исследования:

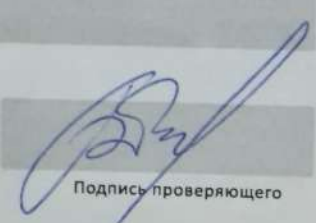
- 1) Получить стабильную линию генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией IL2 (МСК-IL2).
- 2) Проанализировать влияние сверхэкспрессии IL2 на иммунофенотип МСК и их способность к направленной дифференцировке.
- 3) Проанализировать влияние сверхэкспрессии IL2 на пролиферативную активность, жизнеспособность и ультраструктуру МСК.
- 4) Проанализировать иммуномодулирующие свойства МСК-IL2 в культуре мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro*.
- 5) Оценить противоопухолевые свойства МСК-IL2 в культуре опухолевых клеток *in vitro*.
- 6) Провести количественный анализ экспрессии мРНК генов, обладающих про-онкогенными и про-ангиогенными свойствами, в МСК-IL2.
- 7) Провести мультиплексный анализ секреции цитокинов/хемокинов и факторов роста МСК-IL2.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе Антиплагиат.ВУЗ

| | |
|------------------------|--|
| Автор работы | Чулпанова Дарья Сергеевна |
| Подразделение | |
| Тип работы | Магистерская диссертация |
| Название работы | Антиплагиат.docx |
| Название файла | Антиплагиат.docx |
| Процент заимствования | 11,32% |
| Процент цитирования | 0,25% |
| Процент оригинальности | 88,42% |
| Дата проверки | 14:25:25 31 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 | 31.05.19  Подпись проверяющего |

