

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА
ИММУННЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ,
АКТИВИРОВАННЫХ МОНОЦИТАРНЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ
КЛЕТКАМИ *IN VITRO*

Работа завершена:

« 7 » 06 2023 г.




(Ю.П. Маясин)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
к.б.н., старший преподаватель

« 8 » 06 2023 г.



(К.В. Китаева)

Научный руководитель
м.н.с. НИЛ «Генные и клеточные технологии»

« 8 » 06 2023 г.



(И.Ю. Филин)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

« 8 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань-2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Онкологическое заболевания	8
1.1.1 Особенности рака	8
1.1.2 Глобальная статистика и прогноз по онкологическим заболеваниям.....	10
1.1.3 Меланома.....	11
1.1.4 Антигены меланомы.....	15
1.2 Противоопухолевый Т-клеточный иммунитет.....	16
1.2.1 Опухоль-ассоциированные антигены.....	17
1.2.2 Внеклеточные везикулы.....	19
1.2.3 Фаза индукции	20
1.2.4 Эффекторная фаза.....	21
1.2.5 Дендритные клетки.....	22
1.2.6 Т-лимфоциты.....	25
1.3 Иммунотерапия меланомы дендритными клетками.....	30
1.3.1 Терапия на основе аутологичных ДК	31
1.3.2 Нацеленные на ДК пептидные вакцины	32
1.3.3 Терапия на основе экзосом дендритных клеток.....	32
Заключение	33
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Приготовление основных растворов и буферов.....	34
2.2 Условия культивирования клеточных культур	35

2.3 Выделение опухоль-ассоциированного антигена	36
2.3.1 Получение лизата из опухолевых клеток.....	36
2.3.2 Выделение цитохалазин-индуцированных мембранных везикул из опухолевых клеток	36
2.3.3 Оценка морфологии циМВ методом сканирующей электронной микроскопии.....	37
2.4 Выделение белка и расчет концентрации	37
2.5 Оценка экспрессии трансгена ГМ-КСФ в клетках меланомы М14 при помощи вестерн-блот анализа.....	39
2.6 Получение и культивирование моноцитарных дендритных клеток	42
2.6.1 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека.....	42
2.6.2 Криоконсервирование фракции МКПК	43
2.6.3 Генерация моноцитарных ДК из МКПК	43
2.6.4 Оценка поглощения циМВ дендритными клетками методом конфокальной микроскопии.....	44
2.6.5 Нагрузка моДК опухолевым антигеном и цитокиновым коктейлем.....	45
2.6.6 Анализ иммунофенотипа и жизнеспособности полученных моДК	46
2.7 Антиген-презентация моДК в культуре мононуклеарных клеток периферической крови	47
2.8 Анализ иммунофенотипа популяций МКПК-резидентных Т-лимфоцитов после антиген-презентации	47
2.8.1 Индукция апоптоза опухолевых и нормальных клеток при ко- культивации с активированными МКПК.....	48
2.8.2 Оценка индуцированного МКПК апоптоза в клеточных культурах меланомы и МСК.....	49

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1 Определение концентрации опухоль-специфичных антигенов при помощи калибровочной кривой	50
3.2 Сканирующая электронная микроскопия циМВ.....	50
3.3 Вестерн-блот анализ экспрессии белка ГМ-КСФ в нативных и модифицированных клетках меланомы М14	51
3.4 Получение моноцитарных дендритных клеток	52
3.5 Конфокальная флуоресцентная микроскопия	53
3.6 Иммунофенотипирование дендритных клеток.....	54
3.7 Иммунофенотипирование МКПК-резидентных популяций Т-лимфоцитов после взаимодействия с загруженными антигеном моДК.....	57
3.8 Оценка противоопухолевого действия активированных МКПК.....	67
3.9 Оценка специфичности цитотоксического действия активированных МКПК в культуре МСК	70
ВЫВОДЫ	72
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	73

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CD	кластер дифференцировки клетки
CTLA4	цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4
DAMP	ассоциированный с повреждениями паттерн
DPBS	фосфатно-слоевой буфер Дюльбекко
FBS	фетальная бычья сыворотка
IFN I/III	интерферон I/III типа
IgE	иммуноглобулин типа E
PD1/2	белок запрограммированной смерти 1/2
Th	Т-хэлперная клетка
TLR	Толл-подобные рецепторы
Treg	Т-регуляторная клетка
АПК	антиген-презентирующая клетка
ГКГС I / II	главный комплекс гистосовместимости класса I / II
ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ГСК	гемопозитическая стволовая клетка
ДК	дендритная клетка
ДМСО	диметилсульфоксид
ИЛ	интерлейкин
кДК	конвенциональная дендритная клетка
МКПК	моноклеарная клетка периферической крови
моДК	моноцитарная дендритная клетка
МСК	мезенхимальная стволовая клетка
ПГЕ-2	простагландин E2
пДК	плазмоцитоидная дендритная клетка
ТКР	Т-клеточный рецептор
ФНО- α	фактор некроза опухоли альфа
циМВ	цитохалазин-индуцированные мембранные везикулы
ЦТЛ	цитотоксический Т-лимфоцит

ВВЕДЕНИЕ

Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток представляют собой новую и многообещающую стратегию борьбы с раком. Дендритные клетки являются уникальными клетками иммунной системы, которые играют ключевую роль в стимуляции и регуляции иммунного ответа и выделяются своей способностью обрабатывать антигены и активировать иммунные клетки.

В лечении рака дендритные клетки используются для активации собственной иммунной системы пациента, с целью уничтожения опухолевых клеток. Для создания противоопухолевых вакцин, часто дендритные клетки дифференцируют напрямую из клеток крови пациента. Затем, эти клетки обрабатываются с опухолевым антигеном и возвращаются обратно в организм пациента. В результате, начинают активно размножаться иммунные клетки, направленные на уничтожение опухолевых клеток.

Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток уже применяются в клинической практике для лечения различных видов опухолей, включая меланому, лимфому, рак мочевого пузыря и рак груди. Однако, несмотря на первоначальные успехи, этот метод лечения все еще находится в стадии исследований и разработок, и требует дальнейшего совершенствования.

Важность и актуальность работы заключается в том, что рак является одним из наиболее распространенных заболеваний в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак является второй по распространенности причиной смерти в мире, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. В 2020 году число новых случаев рака в мире составило более 19 миллионов, а число смертей от рака превысило 10 миллионов.

В этом контексте, противоопухолевые дендритные вакцины представляют собой новый метод лечения рака, который может быть более эффективным и безопасным для пациентов. Этот персонализированный подход может быть индивидуально подстроен под каждого пациента или скомбинирован с другими препаратами для улучшения общей эффективности.

Таким образом, противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток являются важной темой для дальнейших исследований в области онкологии, и могут быть ключевым инструментом в борьбе с раком в будущем.

Целью данной работы является исследование противоопухолевого эффекта иммунных клеток периферической крови, активированных моноцитарными дендритными клетками *in vitro*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Получить и охарактеризовать моноцитарные дендритные клетки из мононуклеарных клеток периферической крови путем направленной дифференцировки
- 2) Выделить опухоль-ассоциированные антигены из нативных и генетически модифицированных клеток меланомы М14 для индукции созревания моноцитарных дендритных клеток
- 3) Проанализировать и сравнить иммуномодулирующую активность зрелых моноцитарных дендритных клеток, индуцированных различными опухоль-ассоциированными антигенами в культуре нативных мононуклеарных клеток периферической крови
- 4) Оценить опухоль-специфическую цитотоксичность активированных мононуклеарных клеток периферической крови в культуре клеток меланомы М14 и стволовых клеток

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Маясин Ю.П., Китаева К.В., Филин И.В.
Самоцитирование
рассчитано для: Маясин Ю.П., Китаева К.В., Филин И.В.
Название работы: ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА ИММУННЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ, АКТИВИРОВАННЫХ МОНОЦИТАРНЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ IN VITRO
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	14.8%	СОВПАДЕНИЯ	14.8%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	85.2%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	85.2%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 29.05.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 29.05.2023 14:04

Структура документа: Проверенные разделы: содержание с.1-3, основная часть с.4-50
Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ, СМН России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Каюмов Айрат Рашитович

ФИО проверяющего

Дата подписи:



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.