

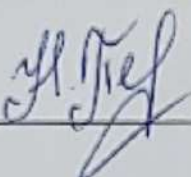
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

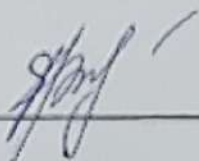
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК РАКА
ЛЕГКОГО

Студент 4 курса
группы 01-805
" ___ " _____ 2022 г.



(Плискина А.И.)

Научный руководитель
к.б.н., доцент
" ___ " _____ 2022 г.



(Дудкина Е.В.)

Заведующий кафедрой
микробиологии
д.б.н., профессор
" ___ " _____ 2022 г.



(Ильинская О.Н.)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Генотерапия рака.....	6
1.1.1 Суицидальная генная терапия рака.....	10
1.2 Методы внесения генетического материала в клетку.....	11
1.2.1 Трансформация.....	11
1.2.2 Трансдукция.....	12
1.2.3 Трансфекция.....	15
1.3 Использование репортерных генов при трансфекции.....	18
1.4 Методы оценки эффективности трансфекции.....	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	22
2.1 Плазмиды и клеточные линии.....	22
2.2 Условия культивирования	22
2.3 МТТ-тест	22
2.4 Трансфекция.....	23
2.5 Флуоресцентная микроскопия.....	24
2.6 Проточная цитофлуорометрия	24
2.7 Статистическая обработка данных.....	25
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	26
3.1 Оценка цитотоксического потенциала биназы по отношению к опухолевым клеткам NCI-H322 и нормальным клеткам WI-38.....	26
3.2 Оптимизация условий трансфекции клеток немелкоклеточного рака легкого и нормальных эмбриональных клеток легкого человека.....	28
3.3 Количественная оценка трансфицированных клеток в популяции.....	31
ВЫВОДЫ.....	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	34

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире рак легких является наиболее часто диагностированным опухолевым заболеванием за последние несколько десятилетий [Bray *et al.*, 2018]. Он является основной причиной смерти от рака у мужчин и второй по значимости причиной смерти у женщин [Schabath, Cote, 2019]. Это связано с отсутствием своевременной диагностики и высокой частотой рецидивов после использования традиционных противоопухолевых методов лечения. Уже устоявшиеся методы хирургии и лучевой терапии являются эффективными лишь на ранних стадиях развития заболевания. Лечение прогрессирующих метастатических опухолей требует применения химиотерапии, гормональной и биологической терапии. Эти методы позволяют добиться подавления быстрого роста раковых клеток, но также воздействуют и на нормальные клетки с высокой скоростью пролиферации. Поэтому одной из основных целей современной медицины является разработка других более безопасных и эффективных стратегий лечения рака. Одним из перспективных направлений в данной области является генная терапия [Montaño-Samaniego *et al.*, 2020]. Целью генной терапии является доставка терапевтических нуклеиновых кислот в раковые клетки для замены мутантных генов или регуляции генетической экспрессии. В качестве терапевтических генов могут быть выбраны различные цитотоксические агенты, олигонуклеотиды, микроРНК или интерферирующие РНК [Montaño-Samaniego *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020].

Суицидальная генная терапия основана на введении в опухолевые клетки вирусного или бактериального гена, позволяющего превратить нетоксичное соединение в летальное лекарство [Duarte *et al.*, 2012]. Бактериальная рибонуклеаза (РНКаза) *Bacillus pumilus* 7P – бионаз представляет собой перспективный цитотоксический агент, который может быть использован для создания на его основе противоопухолевой суицидальной генотерапевтической конструкции. Фермент обладает избирательной цитотоксичностью по отношению к определенным видам

опухолевых клеток [Mitkevich *et al.*, 2013; 2015; 2017], не иммуногенен [Pinskaya *et al.*, 2007] и не требует добавления пролекарств. Это направление в будущем может привести к созданию эффективного нетоксичного метода лечения рака легких, не вызывающего возникновение у опухолевых клеток лекарственной устойчивости. Одним из основных ограничений генотерапевтических подходов является эффективная доставка генетических конструкций в клетки и их дальнейшая экспрессия.

В связи с этим, целью данной работы стала оптимизация условий трансфекции клеток рака легкого для эффективной доставки репортерной генетической конструкции в клетки-мишени. В работе решались следующие задачи:

1) Оценить цитотоксический потенциал биназы в отношении клеток бронхиолоальвеолярной карциномы человека NCI-H322 и нормальных клеток эмбриона легкого человека WI-38;

2) Подобрать оптимальное соотношение трансфицирующего агента и ДНК, количество ДНК и время инкубации для трансфекции клеток NCI-H322 и WI-38;

3) Определить количество трансфицированных клеток в популяции, а также степень цитотоксичности трансфицирующего агента.

ВЫВОДЫ

1) Показано, что биназа обладает цитотоксическим потенциалом по отношению к клеткам бронхиолоальвеолярной карциномы человека NCI-H322 и нормальным эмбриональным клеткам легкого человека WI-38, не проявляя при этом селективности действия. Жизнеспособность опухолевых клеток NCI-H322 и нормальных клеток WI-38, обработанных биназой в концентрации 300 мкг/мл, через 48 ч инкубации снижалась на 26.9 % и 29.5 %, соответственно.

2) Подобраны оптимальные условия трансфекции для эффективной доставки репортерной конструкции в клетки-мишени: для линии NCI-H322 наиболее оптимальным вариантом является соотношение липофектамина к ДНК – 5:1, для WI-38 – 1:1, при количестве ДНК в лунке – 200 нг. Максимальная экспрессия репортерного гена у обеих клеточных линий наблюдалась на 48 ч после проведения трансфекции.

3) Количественная оценка трансфицированных клеток в популяции показала, что трансфекция опухолевых клеток NCI-H322 происходит наиболее успешно, доля TurboGFP-позитивных клеток составила 6 %. Для клеток WI-38 детектировано всего 0.1 % трансфицированных клеток. При этом среди клеток, несущих репортерную конструкцию, около 20-25 % находилось в апоптозе, что указывает на небольшую цитотоксичность трансфицирующего агента – липофектамина 3000.