

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 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНОГО
ПИВАЛОИЛПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ НА
АКТИВАЦИЮ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NLRP3 В КУЛЬТУРЕ
КЛЕТОК НСТ-116 И А549**

Работа завершена:

"7" 05 2021 г.

(Р.Р. Гафаров)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
к.б.н., ст.преп.

"7" 05 2021 г.

(Е.Е. Гаранина)

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

"7" 05 2021 г.

(В.М. Чернов)

Казань–2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Пировиноградная кислота, гликолиз и связь с воспалением	11
1.2. Инфламмасомы и история их открытия	17
1.3 Структура инфламмасом	19
1.4 Механизм активации NLRP3 - инфламмасомы	20
1.5 Инфламмасомы в клеточных популяциях и линиях	23
1.6 Активация воспаления и иммунного ответа	26
1.7 Инфламмасомы в качестве терапевтической мишени	28
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Используемые клеточные линии	33
2.2 Условия культивирования и праймирование	33
2.2.1 Обработка клеток	33
2.3 Выделение тотальной РНК и белков	33
2.4 Реакция обратной транскрипции	34
2.5 ПЦР в реальном времени	35
2.6 Иммунооблоттинг	36
2.7 Иммуноферментный анализ	38
2.8 Окрашивание Аннексином V	39
2.9 MTS-тест	40
2.10 Мультиплексный анализ	40
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	42
3.1 Оценка экспрессии генов активации инфламмасомы NLRP3 в клеточных линиях методом ПЦР-РВ	42
3.2. Анализ экспрессии белков NLRP3 и CASP1 <i>in vitro</i> методом вестерн блота	44

3.3. Оценка уровня секреции цитокинов IL-1 β и IL-18 методом ELISA(ИФА).	46
3.4. Оценка жизнеспособности клеток и детекция апоптоза с помощь окрашивания Annexin V.....	48
3.5. Определение оценки активности митохондриальных дегидрогеназ методом MTS-теста.....	52
3.6. Анализ секреции цитокинов и хемокинов в культуральных супернатантах.....	53
ВЫВОДЫ	55
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Микроокружение опухоли формируется за счет различных составляющих, которые включают воспалительные молекулы, лейкоциты, про-воспалительные цитокины и опухолевые клетки [Li *et al.*, 2017], которые способны стимулировать ангиогенез, рост опухоли и процессы метастазирования [Li *et al.*, 2017].

В последнее десятилетие внимание ученых привлекают инфламмасомы, мультимерные белковые комплексы, играющие ключевую роль в регуляции воспаления [Martinton *et al.*, 2002]. Активация инфламмасом происходит в ответ на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), а также молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями [He *et al.*, 2018]. Среди всех инфламмасом, активируемых NOD-подобными рецепторами, NLRP3 инфламмасома является наиболее изученной с точки зрения врожденного иммунитета [Shaw *et al.*, 2011]. Однако, было показано, что нарушение регуляции экспрессии NLRP3 обуславливает различные патологические изменения, включая и онкопроцессы [Bauernfeind *et al.*, 2009].

Пировиноградная кислота является органической кетокислотой, обладающая свойствами как кетонов, так и карбоновых кислот. Пировиноградная кислота, а точнее соли пировиноградной кислоты – пируваты, являются очень важным соединением и конечным продуктом в процессе гликолиза.

Гликолиз участвует в иммунных ответах живых организмов [Krawczyk *et al.*, 2010; Masters *et al.*, 2010; Tannahill *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2010]. Подавления гликолиза агонистами, приводит к созреванию и активации дендритных клеток (DC) [Everts *et al.*, 2014; Krawczyk *et al.*, 2010]. При высоких концентрациях глюкозы Toll-подобными рецепторами (TLR) наблюдается повышение секреции про-воспалительного цитокина IL-1 β по NLRP3-зависимому механизму [Zhou *et al.*, 2010]. Ингибирование гликолиза в макрофагах приводит к угнетению экспрессии гена цитокина IL-1 β при

обработке липополисахаридом (LPS) [Masters *et al.*, 2010; Tannahill *et al.*, 2013]. Также было изучено, что стимулы инфламмасомы NLRP3 повышают концентрацию цитрата и гликогенитических метаболитов, таких как лактат и фосфоенолпируват (PEP) [Moon *et al.*, 2015], однако было неясно, начинается это увеличение концентрации до или после активирования инфламмасом. В 2021 году, была предложена модель зависимой от ферментации молочной кислоты активирования воспалительной реакции NLRP3. Было выявлено, что ферментация молочной кислоты впоследствии гликолиза очень значима для активирования NLRP3 инфламмасомы, но реакция окисления пирувата в последствии гликогенитического потока - нет. В таком случае лактат-зависимое фосфорилирование протеинкиназы R (PKR) является ответственным в контроле того, что гликолиз управляет активацией воспалительной реакции NLRP3 инфламмасомы. Ингибирование окисления пирувата перепрограммирует метаболизм пирувата от спровоцированного пируватом митохондриального дыхания вплоть до цитоплазматической ферментации молочной кислоты и, вследствие этого, повышает активирование NLRP3 инфламмасомы.

Репрограммирование метаболизма пирувата в митохондриях и цитоплазме может являться новой стратегией лечения ряда нозологий, связанных с NLRP3 инфламмасомой [Lin H.-C. *et al.*, 2021]. Производное соединение пировиноградной кислоты, под названием этилпируват (EP) оказался более эффективным и безопасным, чем пируват натрия. В 2017 году при взаимодействии таких соединений, как арилиденариламин и пивалоилпировиноградная кислота, произошел синтез такого соединения, как 3-гидрокси-4-пивалоил1,5-дифенилзамещенные 2,5-дигидро-пиррол-2-оны, обеспечивающие противоопухолевый, ноотропный, противомикробный эффект [Зыкова С.С., 2017].

Целью работы является оценка влияния производного пиваилоилпировиноградной кислоты (ISA-88) на активацию NLRP3

сигналинга в культуре опухолевых клеток A549 и НСТ-116, а также в культуре клеток нормальных фибробластов.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- 1) Оценить уровень экспрессии генов и белков активации инфламмасомы NLRP3 в клеточных линиях A549, НСТ-116, нормальных фибробластах методами ПЦР в режиме реального времени и вестерн блюта.
- 2) Определить уровень секреции цитокинов IL-1 β и IL-18 в клеточных линиях методом иммуноферментного анализа.
- 3) Оценить жизнеспособность клеток и детекцию апоптоза в клеточных линиях при помощи Annexin V.
- 4) Проанализировать активность митохондриальных дегидрогеназ методом MTS-теста.
- 5) Установить различия в секреции цитокинов и хемокинов в обработанных клетках методом мультиплексного анализа.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Гаффаров Руслан Раисович
Самоцитирование

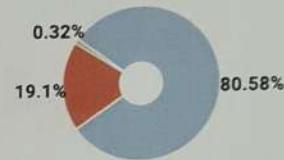
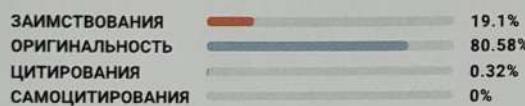
рассчитано для: Гаффаров Руслан Раисович

Название работы: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ПИВАЛОИЛПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВАЦИЮ
СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NLRP3 В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НСТ-116 И А549

Тип работы: Магистерская диссертация

Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 20.05.2021

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); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль
поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU;
Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов;
Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович

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.