

Министерство науки и высшего образования РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление 06.04.01 Биология

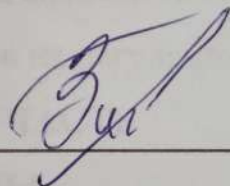
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

РОЛЬ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО  
ПУТИ NLRP3 ПРИ РАКЕ ЛЕГКИХ

Работа завершена:

« 6 » 05 2020 г.



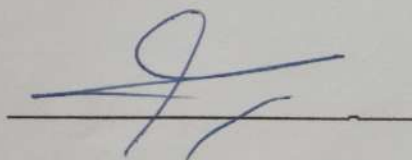
(Зиганшина Г.Р.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

К.б.н., с.н.с.

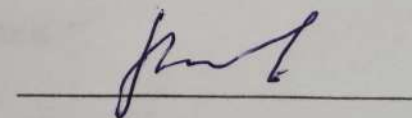
" 15 " 06 2020 г.



(Тезджан Г.)

Д.б.н., профессор

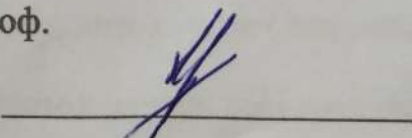
" 6 " 05 2020 г.



(Ризванов А.А.)

Зав.каф. генетики, д.б.н., проф.

" 6 " 05 2020 г.



(Чернов В.М.)

Казань – 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	9
1.1. Рак легкого	9
1.2 Молекулярный патогенез рак	12
1.3 Факторы риска развития рака легких	14
1.3.1 Курение	15
1.4 Роль воспаления при раке легких	
<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	
1.5 Инфламмасома	16
1.6 NLRP3 - инфламмасома	18
1.7 Роль NLRP3- инфламмасы при раке легких	19
1.8 Использование антибиотиков при раке легких	21
1.9 Цефалоспориновая группа антибиотиков	23
1.10 Влияние цефалоспоринов на регуляцию NLRP3 воспаления	26
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	27
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	27
2.1 Клеточная линия, условия культивирования	27
2.2 ПЦР в режиме реального времени	28
2.2.1 Выделение РНК	28
2.2.2 Синтез кДНК	29
2.2.3 ПЦР в реальном времени	30
2.3 Вестерн-блот	31
2.4 Иммуноферментный анализ (ИФА)	32
2.5 Определение жизнеспособности клеток (Аннексин V)	33
2.6 Анализ пролиферации клеток в реальном времени	33
2.7 Анализ цитокинов	33
2.8 Статистический анализ	33

<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	35
3.1 Оценка влияния цефтриаксона на уровень экспрессии NLRP3 и нижестоящих генов методом ПЦР - РВ	35
3.2 Анализ влияния цефтриаксона на экспрессию NLRP3 методом иммуноблоттинга	36
3.3 Определение уровня секреции IL1 $\beta$ и IL18 методом иммуноферментного анализа (ИФА)	37
3.4 Определение влияния цефтриаксона на апоптоз методом проточной цитометрии	39
3.5 Оценка влияния цефтриаксона на пролиферацию клеток в режиме реального времени с использованием матрицы биосенсоров xCELLigence	42
3.6 Определение влияния цефтриаксона на секрецию цитокинов методом мультиплексного анализа	43
<b>ВЫВОДЫ</b>	50
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	51

## ВВЕДЕНИЕ

Рак легких является одним из наиболее распространенных видов рака в мире и наиболее распространенной причиной смерти [Siegel *et al.*, 2014]. Одним из отличительных признаков рака легких является хроническое воспаление, способствующее стимулированию пролиферации, ангиогенезу и метастазированию опухоли, а также обуславливает химиотерапевтическую лекарственную устойчивость [Landskron *et al.*, 2014]. Сигнальный путь NF- $\kappa$ B играет значимую роль в хроническом воспалении [Coussens *et al.*, 2002].

Инфламмосомы представляют собой белковые комплексы, которые участвуют в активации каспазы-1 и созревании воспалительных цитокинов, IL-1 $\beta$  и IL-18. Одним из хорошо изученных типов воспалений является NLRP3 воспаление [Wang *et al.*, 2016]. Роль NLRP3-инфламмосомы была описана в иммунокомпетентных клетках, таких как мышечные клетки, нейроны или эндокринные клетки, а также в некоторых опухолевых клетках.

Различные факторы, такие как курение сигарет, вдыхаемые частицы, пол, раса и этническая принадлежность, возраст, ожирение, инфекции и другие заболевания легких или обструкция дыхательных путей, способствуют развитию рака легких опосредованно через NLRP3-инфламмосому.

Большинство случаев рака легких осложнены инфекциями легких, инфекциями уха, горла и желудочно-кишечного тракта [Fuks *et al.*, 1986]. Инфекции, связанные с раком легких, чаще всего возникают на фоне хронической обструктивной болезни легких (COPD), обструкции бронхов или вызваны стандартным лечением рака легких с помощью хирургического вмешательства, химиотерапии и лучевой терапии [Akinosoglou *et al.*, 2013].

Послеоперационные инфекционные заболевания в основном лечатся антибиотиками с антипсевдомональной активностью и бета-лактамами антибиотиками, включая антибиотики группы цефалоспоринов [Mandell *et al.*, 2007]; [Lim *et al.*, 2009]. Цефалоспорины делятся на пять поколений.

Каждое новое поколение продемонстрировало более эффективные грамотрицательные антимикробные свойства, чем предыдущее поколение. Цефалоспорины третьего поколения, такие как цефтриаксон, имеют эффективность против бактерий рода *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Pseudomonas aerogenosa*, *P. meningococci*, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу, и *H. influenzae*.

Антибиотики способны модулировать воспалительный путь NLRP3 в эукариотических клетках ввиду сходства митохондриальной ДНК и бактериальной ДНК [Mariathasan *et al.*, 2006]. Кроме того, активация NLRP3-инфламмосомы происходит через Toll-подобные рецепторы, которые являются мишенями для бета-лактамных антибиотиков [Kawai *et al.*, 2011]; [Schroder *et al.*, 2010]. Однако влияние бета-лактамных антимикробных агентов, таких как цефалоспорины, на активацию NLRP3-инфламмосомы воспаления в значительной степени остается неизвестным.

**Цель работы** - исследовать потенциальное модулирующее действие цефтриаксона, 3-го поколения цефалоспоринов, на активации NLRP3-инфламмосомы на модели эпителиальной легочной карциномы *in vitro*.

В рамках цели были поставлены следующие **задачи**:

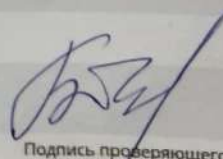
1. Анализ экспрессии мРНК *NLRP3*, *pro-CASP1*, *pro-IL-1 $\beta$*  и *pro-IL-18*: методом ПЦР в реальном времени в обработанных антибиотиком клетках A549.
2. Анализ экспрессии белка NLRP3 в клетках A549 методом иммуноблоттинга
3. Определение уровня секреции IL-1 $\beta$  и IL-18 методом иммуноферментного анализа (ИФА)
4. Анализ секреции цитокинов: и хемокинов в обработанных клетках A549 по технологии xMAP Luminex
5. Определение жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии с использованием красителя Annexin V

## 6. Анализ пролиферации клеток в реальном времени с использованием биосенсорной системы анализа клеток xCELLigence (ACEA Biosciences, США)

# СПРАВКА

## о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Зиганшина Гульшат Равиелевна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	Зиганшина Гульшат магистр антиплагиат
Название файла	Зиганшина Гульшат магистр антиплагиат.docx
Процент заимствования	2.21 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.83 %
Процент оригинальности	96.96 %
Дата проверки	12:16:02 30 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	30 мая 2020г.  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.