

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  
Магистерская диссертация

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С  
ИНДУЦИРОВАННЫМИ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МЕМБРАННЫМИ  
ВЕЗИКУЛАМИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

Работа завершена:

«7» 05 2021 г.

(А.С. Пономарев)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

«7» 05 2021 г.

(В.В. Соловьева)

м.н.с., ассистент кафедры биохимии

«7» 05 2021 г.

(З.Е. Гилазиева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«7» 05 2021 г.

(В.М. Чернов)

Казань – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	6
1.1 Внеклеточные везикулы .....	9
1.1.1 Внеклеточные везикулы мезенхимных стволовых клеток и их роль в формировании опухоли .....	12
1.2 Опухолевые сфероиды.....	14
1.2.1 Применение опухолевых сфероидов в персонализированной медицине .	19
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	23
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	23
2.1 Методы работы с эукариотическими клетками.....	23
2.1.1 Культивирование мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека.....	23
2.1.2 Культивирование опухолевых сфероидов .....	23
2.1.3 Окрашивание клеток мембранными красителями .....	24
2.2.1 Определение концентрации белка полученных везикул мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека .....	25
2.2.2 Сканирующая электронная микроскопия мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека .....	26
2.2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека .....	26
2.3 Оценка влияния мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека на клетки опухолевых сфероидов <i>in vitro</i> .....	26
2.3.1 Использование фазово-контрастной микроскопии .....	26
2.3.2 Оценка жизнеспособности клеток.....	27

2.3.3 Взаимодействие мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека и клеток опухолевого сфероида.....	27
2.3.4 Метод количественной оценки экспрессии мРНК генов с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени .....	28
2.4 Статистическая обработка результатов .....	28
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>31</b>
3.1 Получение и исследование морфологии и цитокинового профиля мембранных везикул, полученных с помощью цитохалазина В.....	31
3.1.1 Характеристика индуцированных цитохалазином В мембранных везикул .....	31
3.1.2 Исследование цитокинового профиля мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток, индуцированных с помощью цитохалазина В .....	34
3.2 Исследование влияния индуцированных мембранных везикул на.....	37
морфологию и жизнеспособность опухолевых сфероидов .....	37
3.2.1 Исследование морфологии и жизнеспособности сфероидов на 3 и 7 сутки при добавлении индуцированных мембранных везикул.....	37
3.2.2 Исследование морфологии и жизнеспособности сфероидов при добавлении разного количества индуцированных мембранных везикул.....	39
3.2.3 Исследование морфологии сфероидов при добавлении индуцированных мембранных везикул.....	42
3.3.1 Исследование влияния индуцированных мембранных везикул на опухолевые сфероиды с помощью оценки экспрессии мРНК генов апоптоза .	43
3.3.2 Исследование экспрессии мРНК при добавлении разного количества индуцированных мембранных везикул к опухолевым сфероидам .....	44
3.3 Исследование включения мембранного компонента везикул в состав цитоплазматической мембранны клетки-реципиента.....	48

4.1 Формирование и исследование сфериодов в суспензии при добавлении мембранных везикул.....	52
4.1.1 Исследование морфологии сфериодов в суспензии при добавлении разного количества индуцированных мембранных везикул .....	52
4.1.2 Определение влияния индуцированных мембранных везикул на количество образующихся опухолевых сфериодов в суспензии .....	54
4.1.3 Исследование влияния индуцированных мембранных везикул на опухолевые сфериоды в суспензии с помощью оценки экспрессии мРНК.....	55
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	57
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	58

## **ВВЕДЕНИЕ**

Несмотря на все разнообразие онкологических заболеваний, традиционная терапия для большинства видов опухолей представляется одинаковой и включает такие методы лечения как: хирургия, лучевая терапия и химиотерапия [Krzyszczuk *et al.*, 2018]. Чаще всего для лечения используется комбинация методов. Для злокачественных видов опухолей необходимы агрессивные методы лечения, такие как лучевая терапия и химиотерапия. Однако, данные методы не гарантируют положительного эффекта, так как многие типы опухолей устойчивы к этим видам воздействия. Кроме того, данные подходы имеют побочные эффекты, затрагивающие здоровые клетки. Несмотря на это, химиотерапия остается стандартом лечения онкологических заболеваний, и часто может быть единственной терапией, которую получает пациент.

Из-за неоднородности злокачественных новообразований традиционные методы лечения бывают не эффективны или обладают положительным эффектом только у некоторых групп пациентов. Примечательно, что эффективность методов лечения зависит от многих индивидуальных факторов, а также возраст пациента и общее состояние здоровья. Это говорит о том, что перед выбором метода терапии следует учитывать особенности организма пациента [Verma, 2012].

Развитие персонализированной медицины представляет большой интерес, так как включает методы профилактики, диагностики и лечения патологического состояния, основанные на индивидуальных особенностях пациента [Pauli *et al.*, 2017]. По данным литературы, можно заключить, что проведение исследований на трехмерных (3D) клеточных культурах лучше соответствует исследованиям *in vivo*, так как они обладают рядом важных свойств, сближающих их с нативной тканью. 3D клеточные модели, в частности сфероиды, могут быть получены от конкретного пациента и с помощью высокопроизводительных методов персонализированной медицины предоставить подходящую терапию данному пациенту с учетом всех его особенностей и внести значительный вклад в понимании биологии онкологии. Но на сегодняшний день существуют

ограничения, которые не позволяют полноценно использовать 3D модели опухоли. К ним можно отнести: небольшой срок культивирования и хранения, а также ограничение в пролиферации первичных опухолевых клеток. Разработка и увеличение выхода данных 3D-моделей опухоли может существенно повысить эффективность скрининга противоопухолевых лекарственных препаратов и оптимизировать технологию скрининга под конкретного пациента. Добавление внеклеточных везикул (мембранных везикул), полученных с помощью цитохалазина В, (иМВ) к первичной культуре клеток пациента, предположительно, будет приводить к временному перепрограммированию клеток, что повысит способность образовывать 3D-модели *in vitro*. Сливаясь с клетками-реципиентами, иМВ способны доставлять трофические факторы роста, которые будут способствовать поддержанию роста и пролиферации опухолевых сфероидов.

**Целью работы** является охарактеризовать влияние индуцированных цитохалазином В мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток жировой ткани человека (иМВ-МСК) на опухолевые сфероиды *in vitro*.

В работе решались следующие задачи:

1. Получить и охарактеризовать препарат индуцированных цитохалазином В мембранных везикул из мезенхимных стволовых клеток жировой ткани человека.
2. Получить и охарактеризовать опухолевые сфероиды клеток колоректального рака методом «висячая капля» и сфероиды клеток аденокарциномы молочной железы суспензионным методом.
3. Количественно и качественно оценить влияние индуцированных цитохалазином В мембранных везикул на полученные опухолевые сфероиды клеток колоректального рака методом «висячая капля» и сфероиды клеток аденокарциномы молочной железы суспензионным методом для влияния (на что?).
4. Оценить возможность слияния индуцированных цитохалазином В мембранных везикул с клетками сфероидов.

5. Определить влияние индуцированных цитохалазином В мембранных везикул на опухолевые сфероиды рака молочной железы.

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Пономарев Алексей Сергеевич

Самоцитирование

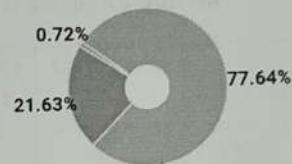
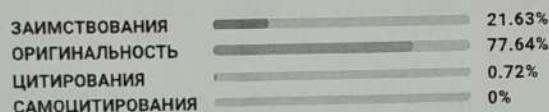
рассчитано для: Пономарев Алексей Сергеевич

Название работы: Пономарев Алексей

Тип работы: Не указано

Подразделение: Казанский Федеральный Университет

## РЕЗУЛЬТАТЫ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 17.05.2021

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.