

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: 06.03.01 - Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ПРИРОДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ БИОПЕЧАТИ МИОБЛАСТОВ**

Работа завершена:

«13» 06 2023 г.



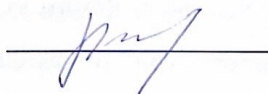
(А. К. Юферова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

«13» 06 2023 г.



(А.А. Ризванов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«13» 06 2023 г.



(А. Р. Каюмов)

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. История развития 3D-биопечати.....	8
1.2. Механизмы 3D-биопечати.....	8
1.2.1. Механизм струйной биопечати.....	9
1.2.2. Механизм лазерной биопечати	11
1.2.3. Механизм экструзионной биопечати.	13
1.3. Биочернила.....	16
1.3.1. Альгинат.....	17
1.3.2. Желатин.....	17
1.3.3. Коллаген.....	18
1.3.4. Синтетические биочернила.....	19
3.4 Заключение	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1 Выделение миобластов из мышечной ткани лошади.....	22
2.2 Методика культивирования миобластов лошади	24
2.3 Проточная цитофлуорометрия.....	24
РАХ7	25
2.4 Дифференцировка миобластов лошади	25
2.5 Методика иммуногистохимического анализа клеток на наличие внутриклеточного маркеров миобластов.....	26
2.6 Методика иммуногистохимического анализа клеток на наличие внутриклеточного маркеров миобластов Методика определения жизнеспособности выделенных миобластов лошади	27
2.7 Методика определения индекса пролиферации миобластов лошади	28
2.8 Методика получения миотуб в культурах миобластов <i>in vitro</i>	28
2.9 Методика криоконсервации миобластов лошади.....	28
2.10 Культивирование на микроносителях	29
2.11 Методика создания гидрогелей для биопечати	29
2.12 Методика печати на биопринтере CELLINK INKREDIBLE+.....	30
2.13 Окрашивание CMFDA и DAPI	31

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Выделение миогенных прогениторных клеток лошади из скелетной мышцы, и определение их способности образовывать миотубы.	32
3.2 Определение внутриклеточных маркеров миобластов в выделенных клетках и их идентификация методом проточной цитофлуорометрии, оценка пролиферативной активности и жизнеспособности клеток	33
3.3 Оценка способности культивируемых клеток дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях	38
3.5 Подбор материалов для разработки гидрогелей.....	40
3.6 Подготовка гелей для биопечати на основе альгината натрия и желатина.....	42
3.7 Применение разрабатываемых биочернил для 3D печати	44
3.8 Биопечать клеток на биопринтере CELLINK INKREDIBLE+	46
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49

MuB и Myf4 – миеогенные фактор 3 и миеогенный регуляторный

MyoD1 – белок-фактор регуляторный 3-го класса

MyoD – фактор транскрипции, регулирующий дифференциацию клеток
предшественников мышц

РББ – фосфатный буферный окислитель физиологический раствор

PI – Раствор флуоресцентной красителя Пибиде провидия (поли-диэтилен-
гликоль)

MyoD и Myf4 – Факторы транскрипции

4-MEM – Сыворотка питательная среда для выращивания клеток
человека и животных, с определенными биохимическими компонентами
глюкоза и инсулин как дополнительные компоненты

4-MEM – среда питательная среда для выращивания клеток человека

4-MEM – среда питательная среда для выращивания клеток человека

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- DMCO – сероорганическое соединение диметилсульфоксид
- ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота, органическое соединение, четырёхосновная карбоновая кислота
- c-met – тирозин-протеинкиназа Met или рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR)
- Dapi – 4',6-диамидино-2-фенилиндол, флуоресцентный краситель
- in vitro* – технология выполнения экспериментов или иных работ в искусственных условиях
- Ki67 – белок, маркер пролиферативной активности
- Myf5 и Mfr4 – миогенный фактор 5 и миогенный регуляторный
- MyoD – миобласт определяющий белок
- PAX7 – фактор транскрипции, регулирующий пролиферацию клеток предшественников мышц
- PBS – фосфатный буферизованный физиологический раствор
- PI – Раствор флуоресцентного красителя йодида пропидия (англ *propidium iodide*)
- Sox8 и Sox15 – Факторы транскрипции
- α -MEM – Стерильная питательная среда для выращивания культур клеток человека и животных, с определёнными биохимическими показателями биологии и медицине вне живого организма
- LDW – метод прямого лазерно-индуцированного переноса вещества
- C2C12 – иммортализованная линия клеток миобластов мышцы

ВВЕДЕНИЕ

3D-биопечать - это революционная технология, которая способна произвести переворот в области медицины. Это процесс, который предполагает использование технологии 3D-печати для создания трехмерных структур, имитирующих биологическую структуру живых тканей и органов. Эта технология используется для разработки и создания клеточных конструкторов, которые в дальнейшем используются в трансплантационной терапии. Наиболее важным фактором трехмерной биопечати является возможность создания структур из живых клеток или отдельных биологических веществ. Технология биопечати способна изменить методы лечения заболеваний и травм, поскольку она позволяет создавать ткани и органы, заменяющие живые, с учетом индивидуальных особенностей пациентов [Lee *et al.*, 2015].

Развитие технологии 3D-биопечати было обусловлено потребностью в более эффективных способах создания тканей и органов, заменяющих ткани и органы пациентов. Традиционные методы тканевой инженерии предполагали выращивание клеток на подложках, которые затем имплантировались в организм. Однако эти методы были ограничены сложностью тканей и органов, а также необходимостью постоянного снабжения клетками [Kačarević *et al.*, 2018]. 3D-биопечать предложила решение этих проблем, позволив создавать сложные структуры, которые могут быть адаптированы к конкретным пациентам.

Сегодня 3D-биопринтинг используется в различных областях, включая тестирование лекарств, тканевую инженерию и регенеративную медицину. Одним из наиболее перспективных применений 3D-биопечати является область регенеративной медицины, где она используется для создания замещающих тканей и органов для пациентов. В настоящее время исследователи работают над печатью широкого спектра тканей, включая кожу, кости, хрящи и даже такие органы, как сердце и печень [Cui, 2015].

Еще одно применение 3D-биопечати - тестирование лекарств, где она используется для создания 3D-моделей человеческих тканей для тестирования эффективности и токсичности лекарств. Это позволяет исследователям тестировать лекарства в более реалистичной среде, чем традиционные двумерные клеточные культуры, что может привести к более точным результатам и уменьшить потребность в испытаниях на животных [Xiang *et al.*, 2022].

Потенциал 3D-биопечати огромен, и исследователи только начинают знакомиться с вероятными возможностями. В будущем 3D-биопринтинг может быть использован для создания заменяемых органов для пациентов, устраняя необходимость в донорах органов и снижая риск отторжения. Она также может быть использована для создания персонализированных методов лечения рака, когда опухоли печатаются и тестируются на реакцию на различные препараты *in vitro* до начала лечения *in vivo* [Kačarević *et al.*, 2018]. На данный момент область биопечати стремительно развивается и оказывает влияние на исследования и промышленное производство в медицине, биологии и других областях.

Целью данной работы явилось изучение особенностей получения, культивирования и биопечати миобластов из мышечной ткани лошади, а также получение природных гидрогелей для последующей разработки технологии выращивания «мяса в пробирке» в условиях лаборатории за счет 3D моделирования. Для решения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1) Выделить миогенные прогениторные клетки лошади из скелетной мышцы и определить способность образовывать миотубы миобластами;
- 2) Определить внутриклеточный маркер миобластов в выделенных клетках и идентифицировать их методом проточной цитофлуорометрии, оценить пролиферативную активность и жизнеспособность клеток;

3) Оценить способность культивируемых клеток дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях;

4) Определить способность миобластов культивироваться на микроносителях;

5) Разработать гидрогели из природных компонентов для успешной биопечати мышечных клеток.

1.2. Механика 3D-биопечати

Преклоняющаяся печать позволяет распечатать клеточный материал диффузно или равномерно в слое, моделируя точную трехмерную структуру. Так как биопечать является компьютеризованным процессом [Fey et al., 2010], она отличается высокой точностью и управляемостью всех технологических процессов. В 3D-структуре можно легко регулировать микро среду, условия и направление развития клеток. За счет новой технологии 3D-биопечати расширяется как универсальная методика выращивания и контроля вида стволовыми клетками [Luo et al., 2015].

Существует множество технологий 3D-биопечати, которые в зависимости от принципа работы можно разделить на три подгруппы: экструзионная биопечать, лазерная биопечать и цифровая биопечать [Luo et al., 2015].

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Юферова Алина, Ризванов Альберт Анатольевич
Самоцитирование
рассчитано для: Юферова Алина, Ризванов Альберт Анатольевич
Название работы: РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ
БИОПЕЧАТИ МИОБЛАСТОВ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

СОВПАДЕНИЯ	3.09%	СОВПАДЕНИЯ	3.09%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	96.91%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	96.91%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 29.05.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 29.05.2023 12:06

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.1-24
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; СМИ 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.