

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

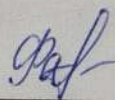
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА АКТИВНОСТЬ NLRP3
ИНФЛАММАСОМЫ НА IN VITRO МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ**

Работа завершена:

« 6 » 05 2020 г.



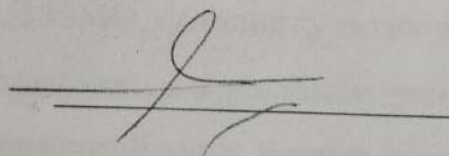
(Фарухшина Э.Р.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

К.б.н., с.н.с.

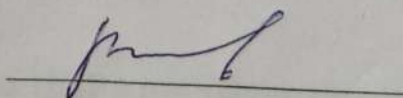
" 15 " 06 2020 г.



(Тезджан Г.)

Д.б.н., профессор

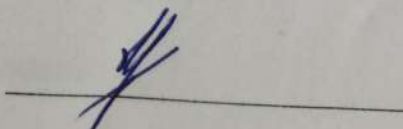
" 6 " 05 2020 г.



(Ризванов А.А.)

Зав.каф.генетики, д.б.н., проф.

" 6 " 05 2020 г.



(Чернов В.М.)

Казань – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Глиобластома	9
1.1.1 Факторы риска развития глиобластомы	11
1.1.2 Изменения молекулярно-сигнальных путей при глиобластоме	11
1.1.3 Сигнальный путь Ras / MAP / ERK	13
1.1.4 Сигнальный путь PI3K / АКТ	13
1.2 Роль воспаления при глиобластоме	14
1.2.1 Инфламмасома	15
1.2.2 NLRP3 –инфламмасома	16
1.2.3 Роль NLRP3-воспаления при глиобластоме	18
1.3 Терапия глиобластом	20
1.3.1 Использование антибиотиков в терапии глиобластомы	21
1.3.2 Азитромицин	22
1.3.3 Роль азитромицина в регуляции NLRP3-инфламмасомы	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Клеточная линия U138MG, условия культивирования	26
2.2 Анализ пролиферации клеток в реальном времени	27
2.3 Определение жизнеспособности клеток с помощью окрашивания Annexin V	27
2.4 Методика проведения ПЦР в реальном времени	28
2.5 Вестерн-блот	31
2.6 Иммуноферментный анализ	32
2.7 Анализ цитокинов	32

2.8 Статистический анализ	33
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Влияние азитромицина на пролиферацию клеток в реальном времени с использованием системы анализа клеток биосенсора xCELLigence (ACEA Biosciences, США)	34
3.2 Влияние азитромицина на жизнеспособность клеток методом проточной цитометрии с помощью окрашивания аннексина V	35
3.3 Влияние азитромицина на уровни экспрессии NLRP3 и нижестоящих генов методом ПЦР-РВ	36
3.4 Анализ экспрессии белка NLRP3 в клетках GBM методом иммуноблоттинга	38
3.5 Определение секреции IL-1 β и IL-18 методом ИФА	39
3.6 Влияние азитромицина на секрецию цитокинов и хемокинов	40
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями нейроэктодермального происхождения, а глиобластома (GBM) является наиболее распространенным и агрессивным диффузным типом глиомы [Silantyev *et al.*, 2019]. Рецепторные тирозинкиназы (RTKs) и их нижестоящие пути, включая пути PI3K/AKT и Ras/MAPK/ERK, участвуют в прогрессировании GBM. Активированная AKT путем PI3K/AKT/mTOR приводит к повышению активности ядерного фактора каппа В (NF- κ B) и транскрипционной стимуляции провоспалительных генов [Pearson *et al.*, 2017]. Хроническое воспаление играет решающую роль в инициации, продвижении и прогрессировании опухоли глиобластомы. Согласно последним соображениям, стволовые опухолевые клетки (CSCs) секретируют цитокины для поддержания пролиферации опухолей GBM и воспалительного микроокружения. Воспалительный каскад инициируется секрецией интерлейкина-1 (IL-1), который синтезируется через белковый комплекс воспаления [Tezcan *et al.*, 2019].

Инфламмосомы представляют собой группу внутриклеточных мультимерных белковых комплексов, которые активируют воспалительную каспазу-1 [Franchi *et al.*, 2009]. Активированная каспаза-1 конвертирует цитокины pro-IL-1 β и pro-IL-18 в их зрелые и биологически активные формы, что приводит к проникновению иммунных клеток в опухолевые участки. Кроме того, активная каспаза-1 расщепляет гасдермин D (GSDMD) и образует поры в плазматической мембране, тем самым запуская пироптоз и приводя к высвобождению цитокинов и образованию молекулярных паттернов опасности (DAMP) для дальнейшей активации воспаления [He *et al.*, 2015]. NLRP3 является наиболее характерным признаком воспаления и связан с несколькими воспалительными заболеваниями, включая рак [Yin *et al.*, 2018]. Одним из первичных сигналов активации NLRP3-инфламмосомы является нарушение функции митохондрий. Большое количество митохондрий является отличительным признаком CSC. Была выявлена

положительная корреляция между активностью NLRP3-инфламмосомы и агрессивностью опухоли GBM, а также увеличением количества CSCs [На ET, 2014]. Следовательно, ингибирование распространения CSCs стало предметом исследований для нового терапевтического подхода к лечению GBM.

Было установлено, что некоторые антибиотики из семейства тетрациклинов и эритромицинов обладают побочными эффектами, негативно влияющих на функционирование митохондрий [Bonuccelli *et al.*, 2017]. Поэтому было сделано предположение, что данные антибиотики могут иметь многоцелевое назначение для ликвидации CSC. Было доказано, что азитромицин, производное эритромицина, эффективно блокирует новый митохондриальный биогенез [Lamb *et al.*, 2014]. Поскольку GBM является, в первую очередь, митохондриальным метаболическим заболеванием, предполагается, что азитромицин может оказывать терапевтический эффект против GBM [Sotgia F, 2018]. Несколько исследований выявили ингибирующее действие азитромицина на активность NLRP3-воспаления на неопухолевые патологии [Choi *et al.*, 2014]. Однако, потенциал азитромицина в модуляции NLRP3-инфламмосомы и его терапевтический эффект при GBM остаются неизвестными. Поэтому в этом исследовании мы стремились исследовать влияние азитромицина *in vitro* на активацию воспалительных процессов NLRP3 в CSC, содержащих клеточную линию GBM, U138MG.

Цель работы – исследование влияния азитромицина на активацию NLRP3-инфламмосомы в клеточной линии глиобластомы, U138MG, содержащие стволовые опухолевые клетки *in vitro*.

Задачи работы:

1. Анализ экспрессии мРНК криопирин (NLRP3), прокаспазы-1 (pro-CASP1), проинтерлейкина 1 бета (pro-IL-1 β) и проинтерлейкина 18 (pro-IL-18) в обработанных азитромицином клетках глиобластомы (GBM) методом ПЦР-РВ;


2. Анализ экспрессии белка NLRP3 в обработанных азитромицином клетках GBM методом иммуноблоттинга;
3. Выявить влияние азитромицина на секрецию интерлейкина 1 бета (IL-1 β) и интерлейкина 18 (IL-18) методом ИФА;
4. Выявить влияние азитромицина на жизнеспособность клеток методом проточной цитометрии окрашиванием аннексином V;
5. Выявить влияние азитромицина на пролиферацию клеток в реальном времени с использованием биосенсорной системы анализа клеток xCELLigence (ACEA Biosciences, США);
6. Выявить влияние азитромицина на секрецию цитокинов и хемокинов методом мультиплексного анализа.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Фарухшина Элина Ромилевна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	ДИССЕРТАЦИЯ .Фарухшина
Название файла	ДИССЕРТАЦИЯ .Фарухшина.docx
Процент заимствования	6.74 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.97 %
Процент оригинальности	92.30 %
Дата проверки	08:08:30 29 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	29.05.20  Подпись проверяющего

