

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  
Бакалаврская работа

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ  
ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МЕМБРАННЫХ  
ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С  
СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ TRAIL

Работа завершена:

«04» июня 2022 г.



(Т. В. Пухальская)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

«5» 06 2022 г.




(В. В. Соловьева)

Научный руководитель:

к.б.н., н.с

«5» 06 2022 г.



(Д. С. Чулпанова)

И. о. заведующего кафедрой

д.б.н., доцент

«6» 06 2022 г.



(А. Р. Каюмов)

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Мезенхимные стволовые клетки.....	7
1.2 МСК в терапии онкологических заболеваний.....	8
1.2.1 Направленная миграция МСК .....	8
1.2.2 Доклинические и клинические исследования МСК для терапии онкологических заболеваний .....	9
1.3 Апоптоз и его индукция.....	12
1.3.1 Внешний и внутренний пути апоптоза .....	13
1.3.2 Сигнальный путь TRAIL.....	14
1.4 Внеклеточные везикулы .....	17
1.4.1 Преимущества внеклеточных везикул .....	18
1.4.2 Методы выделения внеклеточных везикул.....	20
1.5 Терапия онкологических заболеваний с использованием TRAIL.....	21
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	23
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	23
2.1 Культуры клеток и культивирование.....	23
2.2 Генетическая модификация и селекция.....	24
2.3 Дифференцировка МСК в адипоциты, хондроциты и остеобласты .....	24
2.4 Детекция апоптоза и некроза в МСК .....	24
2.5 Анализ пролиферативной активности МСК.....	25
2.6 Выделение индуцированных цитохалазином В мембранных везикул ..	25
2.7 Сканирующая электронная микроскопия.....	26

2.8 Вестерн-блот анализ .....	26
2.9 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени .....	27
2.10 Иммунофенотипирование.....	29
2.11 Анализ поверхностных и внутриклеточных маркеров иМВ .....	29
2.12 Анализ экспрессии рецепторов смерти на опухолевых клетках .....	30
2.13 Детекция апоптоза и некроза в опухолевых клетках при совместном культивировании везикул и опухолевых клеток.....	30
2.14 Анализ изменения экспрессии проапоптотических и антиапоптотических генов опухолевыми клетками .....	31
2.15 Статистический анализ.....	31
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>32</b>
3.1 Получение и характеристика стабильной культуры мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией TRAIL.....	32
3.2 Выделение и характеристика полученных иМВ .....	34
3.3 Анализ чувствительности опухолевых клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 к TRAIL-индуцированному апоптозу .....	38
3.4 Оценка противоопухолевой активности иМВ-TRAIL в культуре опухолевых клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 .....	39
3.5 Оценка уровня экспрессии мРНК генов ключевых регуляторов сигнального пути апоптоза в опухолевых клетках MDA-MB-231 и MCF-7 после инкубации с иМВ-TRAIL.....	41
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>43</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>44</b>



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- APAF-1 — фактор апоптотической протеазы-1 (англ. apoptotic protease activating factor 1)
- CD — кластер дифференцировки (англ. Cluster of differentiation)
- DD — домен смерти (англ. Death domain)
- DISC — Смертельно индуцирующий сигнальный комплекс (англ. Death-inducing signaling complex)
- DR — рецептор смерти (англ. death receptors)
- EGF — эпидермальный фактор роста (англ. epidermal growth factor)
- EMA — европейское медицинское агентство (англ. European Medicines Agency)
- FADD — FAS ассоциированный домен смерти (англ. Fas-associated protein with death domain)
- FasL — Fas лиганд (англ. Fas ligand)
- FDA — управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration)
- FGF — фактор роста фибробластов (англ. fibroblast growth factors)
- c-FLIP — клеточный-FLICE ингибирующий белок (англ. cellular FLICE-like inhibitory protein)
- GBM — глиобластома (англ. glioblastoma)
- GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста (англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
- IL — интерлейкин (англ. interleukin)
- NK — натуральные киллеры (англ. natural killers)
- MOI — множественность инфекции (англ. Multiplicity of infection)
- TME — микроокружение опухоли (англ. tumor microenvironment)
- TNF- $\alpha$  — Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (англ. Tumor necrosis factor  $\alpha$ )
- TNF — Фактор некроза опухоли (англ. Tumor necrosis factor)
- TRADD — TNFR1 ассоциированный домен смерти (англ. TNFR1-associated death domain)
- TRAIL — лиганд суперсемейства фактора некроза опухоли индуцирующий апоптоз (англ. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
- VEGF-A — фактор роста эндотелия сосудов-A (англ. vascular endothelial growth factor A)
- ВВ — внеклеточные везикулы
- ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома
- иМВ — индуцированные цитохалазином В мембранные везикулы
- МСК — мезенхимные стволовые клетки
- ЦПМ — цитоплазматическая мембрана

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно официальной статистике за 2020 год в Российской Федерации было диагностировано 640 391 случаев злокачественных новообразований (в том числе 256069 и 299967 у пациентов мужского и женского пола, соответственно). По сравнению с 2019 годом впервые число выявленных злокачественных новообразований снизилось на 14.2 % [Каприн с соавт., 2021]. Но даже несмотря на значительный прогресс в области диагностики и терапии онкологических заболеваний, разработка новых, более эффективных и безопасных методов остается актуальной задачей.

Адресная клеточно-опосредованная доставка терапевтических молекул рассматривается как одна из перспективных стратегий лечения онкологических заболеваний [Walker *et al.*, 2019]. В контексте такой терапии мезенхимные стволовые клетки могут быть использованы в качестве вектора для доставки терапевтических препаратов благодаря естественному тропизму к очагам опухолей [Chulpanova *et al.*, 2018].

Избирательная индукция апоптоза в опухолевых клетках является одним из перспективных и развивающихся направлений в современной терапии различных видов онкологических заболеваний. Однако, большое количество опухолей резистентны к традиционной терапии цитостатическими препаратами, направленной на индукцию апоптоза за счет повреждения внутриклеточных комплексов, ответственных за сохранность генома и нормальный процесс апоптоза [Hanahan, Weinberg, 2011]. Резистентность к индукции клеточной гибели является одним из ключевых свойств многих типов опухолевых клеток, и ведет к накоплению мутаций, дальнейшей малигнизации и улучшению выживаемости опухолевых клеток [Koehler *et al.*, 2014; Hanahan, Weinberg, 2011]. Поэтому, поиск альтернативных путей модуляции апоптоза, которые позволят усилить имеющиеся или восстановить утраченную чувствительность клеток, является актуальной задачей. Запуск апоптоза через внешний путь за счет связывания рецепторов фактора некроза



опухоли (англ. tumor necrosis factor, TNF), родственного фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующего лиганда (англ. TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) и лиганда Fas (FasL, CD95), который также является членом суперсемейства TNF, имеет важное значение для запуска апоптоза в опухолевых клетках, но не в здоровых клетках организма [Pistritto *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2017].

Внеклеточные везикулы (ВВ), полученные из МСК (ВВ-МСК), также могут быть использованы для доставки различных биологических молекул к опухолевым клеткам. Использование ВВ-МСК в качестве средства доставки индукторов внешнего пути апоптоза может позволить преодолеть резистентность ряда опухолей к индукции апоптоза рекомбинантными белками и повысить эффективность противоопухолевой терапии.

**Цель работы** — оценить противоопухолевую активность искусственных мембранных везикул мезенхимных стволовых клеток человека со сверхэкспрессией TRAIL.

**Задачи исследования:**

- 1) Получить и охарактеризовать стабильную культуру мезенхимных стволовых клеток со сверхэкспрессией TRAIL (МСК-TRAIL).
- 2) Выделить из МСК-TRAIL и охарактеризовать индуцированные цитохалазином В мембранные везикулы (иМВ-TRAIL).
- 3) Проанализировать чувствительность опухолевых клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 к TRAIL-индуцированному апоптозу.
- 4) Оценить противоопухолевую активность иМВ-TRAIL в культуре опухолевых клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7
- 5) Оценить уровень экспрессии мРНК генов ключевых регуляторов сигнального пути апоптоза в опухолевых клетках MDA-MB-231 и MCF-7 после инкубации с иМВ-TRAIL.



**АНТИПЛАГИАТ**  
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Пухальская Тамара Владимировна  
Самоцитирование  
рассчитано для: Пухальская Тамара Владимировна  
Название работы: Пухальская, антиплагиат  
Тип работы: Дипломная работа  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

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

ЗАИМСТВОВАНИЯ		8.73%	ЗАИМСТВОВАНИЯ		8.73%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		90.3%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		90.3%
ЦИТИРОВАНИЯ		0.97%	ЦИТИРОВАНИЯ		0.97%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 03.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 03.06.2022 17:50

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 (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; 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.