

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет (институт)

Кафедра

ЛФ МИ

Медицинская кибернетика и

и информатика

(наименование)

(наименование)

Направление подготовки (специальность) 30.05.03 Медицинская кибернетика

(код и наименование)

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему

Методика геномной оценки резистентности раковых клеток к лекарственной
терапии

Студент

Григорьева Ирина Юрьевна
(подпись, дата) (фио полностью)

Руководитель/научный руководитель

Герасименко С.И.
(подпись, дата) (фамилия, инициалы)

Консультанты (если имеются):

по

(наименование раздела)

(подпись, дата)

(фамилия, инициалы)

по

(наименование раздела)

(подпись, дата)

(фамилия, инициалы)

по

(наименование раздела)

(подпись, дата)

(фамилия, инициалы)

Нормоконтролёр

Дюкина Н.Н.
(подпись, дата) (фамилия, инициалы)

Рецензент инженер физик ГБЗ "ООО"
(должность, место работы)

Биллафисов Е.А.
(подпись, дата) (фамилия, инициалы)

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 25.05.18 № 4)

Заведующий кафедрой М.К.И.

Герасименко С.И.
(подпись) (фамилия, инициалы)

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 22.06.18 № 4)

Секретарь ГЭК

Кривоногов М.И.
(подпись) (фамилия, инициалы)

Пенза 2018

«Утверждаю»

Заведующий кафедрой

«26» февраля 2018 г.

ЗАДАНИЕ на дипломное проектирование

1. Студент гр. 12 АК1 факультета медицинского специальности 30.05.03

Горохова Ирина Юрьевна
(фамилия, имя, отчество)

2. Руководитель проекта Геращенко Сергей Иванович

3. Время дипломного проектирования с 26 февраля 2018 г. по 15 июня 2018 г.

4. Место преддипломной практики кафедра МК и МН ПГУ

5. Тема проекта Методика генотипной оценки резистентности раковых клеток к лекарственной терапии

Тема утверждена приказом ПГУ № 156 а/о от «1» марта 2018 г.

6. Техническое задание на проект (назначение устройства, условия применения, внешние воздействия, специальные требования и т. п.)

Назначение методики заключается в проведении оценки экспрессии генов на предмет их участия в формировании резистентности к лекарственной терапии.

Методика генотипной оценки резистентности раковых клеток к лекарственной терапии предназначена для проведения исследований в генетической лаборатории.

Основные задачи:

- 1) Исследовать существующие методы диагностики резистентности к лекарственной терапии раковых клеток;
- 2) Разработать методику поиска генов, потенциально участвующих в формировании резистентности к лекарственной терапии раковых клеток;
- 3) Провести экспериментальное исследование с использованием методики поиска генов; оценить полученные результаты.

7. Объем и содержание основной части проекта

7.1. Пояснительная записка (перечень вопросов, подлежащих разработке, расчетов, обоснований, описаний)

Введение; 1) Характеристика рака яичников;

2) Способы формирования резистентности к лекарственной

- терапии и анализу методов их обнаружения;
- 3) Разработка методики поиска генов, потенциально участвующих в формировании резистентности раковых клеток к лекарственной терапии;
 - 4) Анализ результатов исследования и оценка участия генов в формировании резистентности раковых клеток к лекарственной терапии; Заключение

7.2. Графическая часть (перечень и содержание чертежей, плакатов)

- 1) Актуальность работы;
- 2) Цели и задачи работы;
- 3) Существующие методы анализа резистентности раковых клеток к лекарственной терапии;
- 4) Формирование гипотезы поиска генов, потенциально участвующих в формировании резистентности по механизму геновой амплификации;
- 5) Методика поиска генов;
- 6) Анализ результатов экспериментов и оценка участия генов в формировании лекарственной резистентности раковых клеток

8. Консультанты и содержание дополнительных разделов (указывается конкретное содержание задания)

8.1. По конструкции устройства не проектируется

Консультант _____

8.2. По технологии не проектируется

Консультант _____

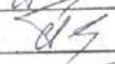
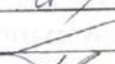
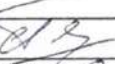
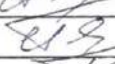
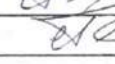
8.3. По экономике и организации производства не проектируется

Консультант _____

8.4. По безопасности жизнедеятельности не манируется

Консультант _____

9. Календарный график по выполнению проекта

Наименование этапов работы	Объем работы	Срок выполнения	Подпись руководителя, консультанта
1. Введение	5%	26.02.18 - 4.03.18	
2. Характеристика риска личников	10%	5.03.18 - 13.03.18	
3. Способы формирования результатности и анализ методов их обнаружения	15%	14.03.18 - 24.03.18	
4. Разработка методики поиска генов	15%	25.03.18 - 8.04.18	
5. Проведение исследования по поиску генов	30%	9.04.18 - 5.05.18	
6. Анализ результатов исследования и оценка влияния генов в формировании результатности	20%	6.05.18 - 26.05.18	
7. Заключение	5%	27.05.18 - 3.06.18	
8. Оформление ПЗ	8%	4.06.18 - 15.06.18	
9. Подготовка презентации и доклада	2%	16.06.18 - 21.06.18	

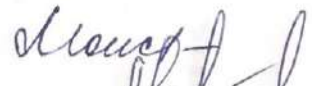
Примечание. Задание по п. 8 должно быть согласовано с руководителем проекта. В случае, если по отдельным дополнительным разделам (см. п. 8) консультанты не назначаются, необходимые задания на проектирование выдает руководитель проекта и вносит в пп. 8.1-8.4.

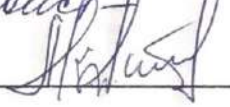
Дата выдачи задания «26» февраля 20 18 г.

Руководитель дипломного проекта  № ПЗ 20.05.03-12 ДР 121.02 ТЗ

Задание к исполнению принял «26» февраля 20 18 г.

Дипломный проект к защите допустить

Декан факультета 

Директор института 

20 ____ г.

РЕФЕРАТ

Пояснительная записка к дипломной работе на тему «Методика геномной оценки резистентности раковых клеток к лекарственной терапии» содержит 71 лист, 19 рисунков, 4 таблицы, 46 источников информации, 1 приложение.

РАК ЯИЧНИКОВ, РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ, РНК, ДНК, ГЕН, ОТ-ПЦР, ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Цель работы заключается в разработке методики геномной оценки резистентности к лекарственной терапии раковых клеток.

Объектом исследования являются методы диагностики механизмов формирования резистентности раковых клеток к лекарственной терапии.

Назначение методики заключается в проведении оценки экспрессии генов с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени на предмет их участия в формировании резистентности к лекарственной терапии.

Разработанная методика геномной оценки резистентности к лекарственной терапии раковых клеток предназначена для проведения исследований в генетической лаборатории.

					ПГУ 30.05.03 – 12ДР121.02 ПЗ			
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	Методика геномной оценки резистентности раковых клеток к лекарственной терапии	Лит.	Лист	Листов
Разраб.		Горохова И. Ю.		30.05.18				
Провер.		Герашенко С.И.		1.06.18			4	71
Реценз.		Бляхарская Е.А.		15.06.18		ПГУ, кафедра МКИИ, гр. 12ЛК1		
Н. Контр.		Янкина Н.Н.		11.06.18				
Утверд.		Янкина Н.Н.		11.06.18				

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
1 ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА ЯИЧНИКОВ.....	10
1.1 Эпидемиология болезни	10
1.2 Этиология и патогенез болезни	13
1.3 Диагностика болезни	21
1.4 Лечение болезни.....	23
2 СПОСОБЫ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ И АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ	26
2.1 Механизмы возникновения устойчивости	26
2.2 Методика определения резистентности с помощью тестов на культурах опухолевых клеток	29
2.3 Методика определения резистентности при помощи тестов с применением позитронно-эмиссионной томографии	30
2.4 Методика определения резистентности при помощи тестов на биомаркеры рака и исследования экзосом	31
3 РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОИСКА ГЕНОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ	37
3.1 Разработка методики поиска генов	37
3.2 Культивирование клеточных культур в двумерных условиях.....	39
3.3 Культивирование клеточных линий в трехмерных условиях	40

3.4	Изолирование экзосом из образцов клеточных линий.....	41
3.5	Подсчет количества экстрацеллюлярных везикул с помощью методов Динамического рассеяния света и Анализа траектории наночастиц	42
3.6	Изолирование мРНК из клеток.....	43
3.7	Изолирование мРНК из экзосом.....	44
3.8	Подсчет количества мРНК в полученных образцах.....	45
3.9	Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией	46
3.9.1	Полимеразная-цепная реакция с обратной транскрипцией.....	47
3.9.2	Полимеразная-цепная реакция в реальном времени	48
4	АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКА УЧАСТИЯ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ	52
4.1	Культивирование клеточных культур в двумерных условиях.....	52
4.2	Культивирование клеточных линий в трехмерных условиях	52
4.3	Изолирование экзосом из образцов клеточных линий.....	53
4.4	Проведение подсчета количества экстрацеллюлярных везикул с помощью методов Анализа траектории наночастиц и Динамического рассеянного света	57
4.5	Проведение изолирования мРНК из клеток и экзосом	59
4.6	Подсчет количества мРНК	60
4.7	Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией	60
4.7.1	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	60

4.7.2 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	62
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	65
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	67
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты анализа траектории наночастиц и динамического рассеяния света клеточной культуры OVCAR8.....	72

ВВЕДЕНИЕ

Рак – это имя, данное группе заболеваний, в процессе развития которых, некоторые из клеток организма начинают делиться без остановки и распространяются в окружающие ткани.

В нормальном состоянии клетки организма человека находятся в постоянном процессе роста и деления. Старые или поврежденные клетки подвергаются запрограммированной клеточной гибели (апоптозу), их место занимают новые. Но данный упорядоченный процесс нарушается, когда развивается опухоль [1].

Среди ведущих причин смерти из-за злокачественных новообразований у женщин остается рак яичников. Ежегодно в России выявляется более 11 тыс. случаев данного заболевания. А так же за последние 10 лет произошел прирост на 8,5% в сравнении со странами Европы, где показатель остается относительно стабильным на протяжении 20 лет.

Бесспорно, химиотерапия и хирургия является основными методами лечения рака яичников. По результатам многих исследований в мире накоплен огромный опыт лечения заболевания, включающий применение различных групп препаратов. В том числе стало ясно, что полихимиотерапия более эффективна, чем монохимиотерапия. Так же стало известно, что в процессе лечения раковые клетки выработали механизмы формирования устойчивости к применяемой терапии [2]. И на первый план вышла другая задача, требующая решения – диагностика возникновения резистентности к применяемой терапии клеток рака яичников.

Во время проведения индукционной химиотерапии у каждой 4-5-ой пациентки наблюдается устойчивость раковых клеток к цитостатическим препаратам, которая определяется прогрессированием роста опухоли или во

время проведения химиотерапии, или в скором времени после ее окончания [3,4].

Существует несколько методов диагностирования устойчивости к терапии раковых клеток. Но исследования в данной области не останавливаются до настоящего времени.

Учитывая актуальность исследования устойчивости к лекарственной терапии клеток рака яичников, считаю целесообразным производить геномную оценку резистентности с помощью клеток данного вида рака.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- 1) осуществить нозологический анализ рака яичников;
- 2) исследовать существующие методы диагностики резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников;
- 3) разработать методику поиска генов, потенциально участвующих в формировании резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников;
- 4) провести экспериментальное исследование с использованием методики поиска генов, потенциально участвующих в формировании резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников, произвести анализ результатов;
- 5) оценить участие генов в формировании резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников.

1 ХАРАКТЕРИСТИКА РАКА ЯИЧНИКОВ

1.1 Эпидемиология болезни

Рак яичников занимает второе место по частоте диагностирования и пятое место среди причин смерти у женщин в мире. В России рак яичников находится на первом месте среди причин гибели у женщин. По данным за 2013-2015 года в Великобритании насчитывалось около 7400 новых случаев заболеваемости ежегодно, что составляет 20 регистрируемых случаев каждый день. В Европе в 2012 году зарегистрировано 65600 новых случаев. В Англии и Северной Ирландии на 2014 год 6 из 10 случаев рака яичников диагностировались на поздней стадии [5]. В 2014 году в Великобритании было зарегистрировано около 4100 случаев смерти от данного заболевания, что составляет 11 смертей каждый день. 43% смертей от рака яичников ежегодно случаются у женщин в возрасте от 75 лет и старше. По имеющимся исследованиям, в 2012 году 152 000 женщин скончались от данной патологии [6].

На долю злокачественных опухолей рака яичников приходится 80-90% эпителиальных опухолей. Из них 42% - серозные карциномы, 17% - муцинозные, 17% - эндометриоидные, 19% - недифференцированные опухоли [7]. Остальные 10-20% приходятся на долю неэпителиальных опухолей рака яичников.

Графическое представление распределения долей эпителиальных опухолей представлено на рисунке 1.1.

На сегодняшний день не существует способа точного прогнозирования развития опухолевого образования. Но удалось выявить ряд факторов, которые могут спровоцировать начало данного процесса. В приводимом далее списке указаны наиболее изученные и предполагаемые факторы риска развития рака:

- наследственность;

Как известно, возникновение рака связано с наличием мутаций в генах. Если мутации происходят в половых клетках, то они могут передаваться

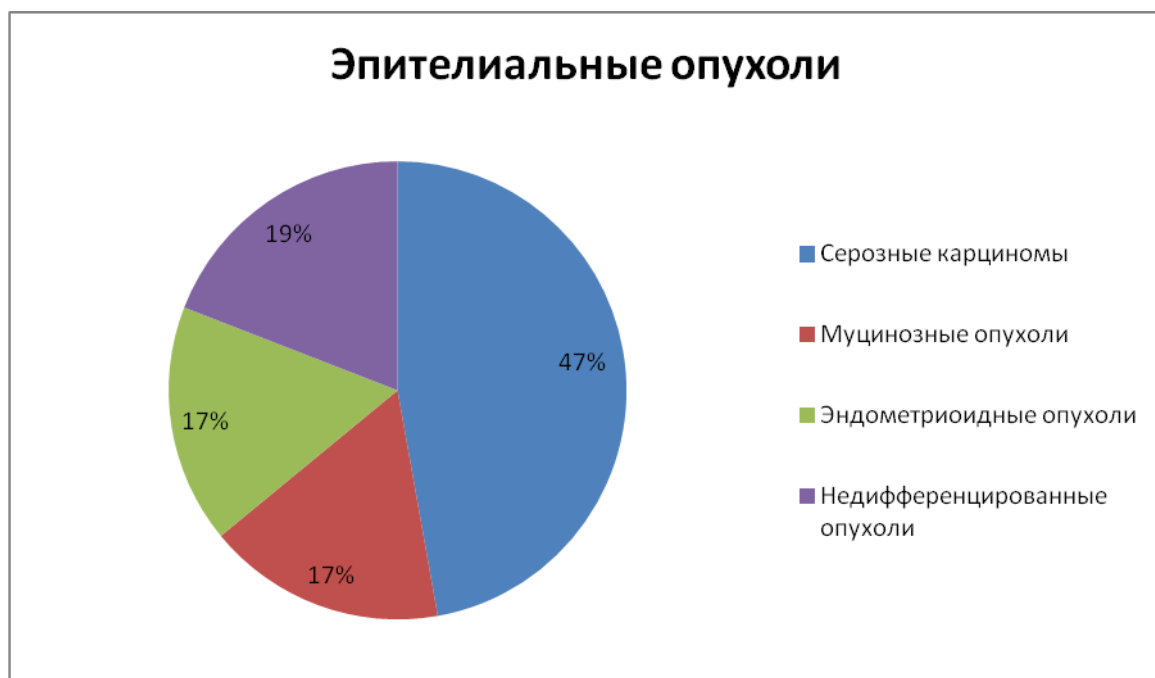


Рисунок 1.1 – Графическое представление распределения эпителиальных опухолей

следующему поколению и повышать риски образования опухоли.

Считается, что только в 3% случаев рак яичников встречается у женщин, в семье которых было диагностировано данное заболевание. Риск развития опухоли в 2,7-3,5 раз выше у женщины, мать или сестра которой имела рак, в сравнении с семьями, где данной патологии никогда не диагностировалось. Возможность возникновения рака повышается, если у пострадавшего родственника заболевание обнаруживалось в раннем возрасте [8]. А так же в семьях с имеющейся историей рака молочной железы риск развития рака яичников имеет наибольшую вероятность [9].

- возраст;

Средний возраст постановки диагноза составляет 54 года. Это значит, что рак встречается у половины женщин ниже данного возраста и у половины старше. Случается, что опухоль диагностируется и в более молодом возрасте. Наибольшее количество женщин с эпителиальным злокачественным новообразованием яичников находится в возрасте 40 лет. Это связано, прежде всего, с изменением гормонального фона [10].

- курение;

Люди, употребляющие табачные изделия или регулярно находящиеся в обществе курящих (пассивное курение), находятся в зоне риска. 3% развития рака яичников связаны с курением. Возможность возникновения патологии увеличивается с увеличением стажа курения [11,12].

- питание;

При проведении исследований с раковыми клетками в лаборатории и на животных моделях было выдвинуто несколько предположений о том, что некоторые соединения могут являться канцерогенами. Однако исследования человеческих популяций на сегодняшний день не дают никаких конкретных данных по этому вопросу. Если сравнивать результаты исследований, можно сделать вывод о том, что здоровые люди и люди с диагностированным раком по-разному усваивают определенные диетические компоненты. Но это не дает гарантии того, что данный диетический компонент ответственен за изменение риска развития рака или вызывает его [13,14].

- гормоны;

Женские половые гормоны, эстрогены, играют важные физиологические роли в женском организме. В период менопаузы у женщин при принятии заместительной гормональной терапии (ЗГТ), увеличивается риск развития рака яичников. По данным в Великобритании 1% случаев заболеваемости связан с применением данного вида терапии [15]. Риски увеличиваются до 53% в случае использования ЗГТ на протяжении более чем 5 лет [16].

- диагноз рака молочной железы;

Риск развития рака яичников на 24% выше у пациентов с диагностированным раком молочной железы или после терапии данного заболевания. Вероятность возникновения опухоли яичников тем выше, чем раньше был выявлен рак молочной железы [17].

- излучение.

Гамма-излучение, рентгеновское излучение, альфа-, бета-частицы, нейтроны могут повреждать ДНК, что иногда влечет за собой образование опухоли. Однако данный фактор в редких случаях может быть связан с возникновением рака яичников [18].

Все приведенные выше факторы не гарантируют появления опухоли при их наличии, но и не отрицают его развития при их отсутствии. Данные факторы создают подходящие условия для прогрессирования заболевания.

1.2 Этиология и патогенез болезни

Вопросы этиологии и патогенеза рака яичников на сегодняшний день до конца не известны и не доказаны. Однако существует мнение, что главная причина опухолевых образований – изменение (повреждение) генетического аппарата клеток.

Нормальные клетки организма становятся раковыми во многом из-за мутаций в генах. Часто необходимо множество мутаций прежде, чем клетка станет раковой. Генетические изменения, которые способствуют развитию рака, имеют тенденцию влиять на три основных типа генов: протоонкогены, гены-супрессоры опухолей и гены восстановления ДНК.

Протоонкогены представляют собой обычные гены, участвующие в нормальном клеточном росте и дифференцировке клеток. Однако когда эти гены изменяются определенным образом (подвергаются мутациям) или более

активны, чем нормальные, они могут стать генами, вызывающими рак (онкогенами), позволяя клеткам расти и выживать, когда они не должны.

Гены-супрессоры по своей сути являются антионкогенами. Они контролируют процессы клеточного деления и апоптоза. Однако отсутствие продуктов синтеза данных генов приводит к началу или прогрессированию роста опухоли.

Гены репарации ДНК участвуют в исправлении ошибок в ДНК. Но накопление наследуемых повреждений ДНК способствует началу образования рака.

Некоторые клетки с измененными (мутированными) генами не подвергаются гибели, а остаются живыми и начинают интенсивно делиться. После нескольких делений в такой клетке закрепляются новые наследственные признаки, она становится атипичной, низкодифференцированной, бесконтрольной и может делиться без остановки, формируя тем самым опухоль [19].

Мутации могут затрагивать различные гены, которые контролируют рост и деление клеток. Некоторые мутации влияют на образование белка до полного прекращения этого процесса. Другие приводят к включению гена и созданию множеств копий одного белка, которого в обычных условиях не требуется в таком количестве или на данный момент жизни организма в нем нет необходимости. Мутации меняют белок таким образом, что он перестает выполнять свою функцию [20].

Существует несколько типов рака яичников:

1 эпителиальный тип – самый распространенный тип; опухоли развиваются из клеток, покрывающих внешнюю поверхность яичника. Большинство из них являются доброкачественными. Данный вид включает несколько подтипов рака яичников:

- серозный тип рака яичников – бывает высоко- и низкодифференцированный; для серозного высокодифференцированного рака яичников под микроскопом характерно наличие железистых структур, а так же формирование сосочков, которые растут в кистозную полость или на поверхности опухоли; данный подтип представляет наиболее распространённую форму эпителиального рака и составляет 6 из 10 регистрируемых случаев; серозный низкодифференцированный рак яичников встречается реже; клетки для данного подтипа отличаются слабой степенью дифференцировки; макроскопическое строение серозного типа эпителиального рака напоминает внешний вид «цветной капусты» с наличием множества камер на разрезе [21];

Микроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.2.

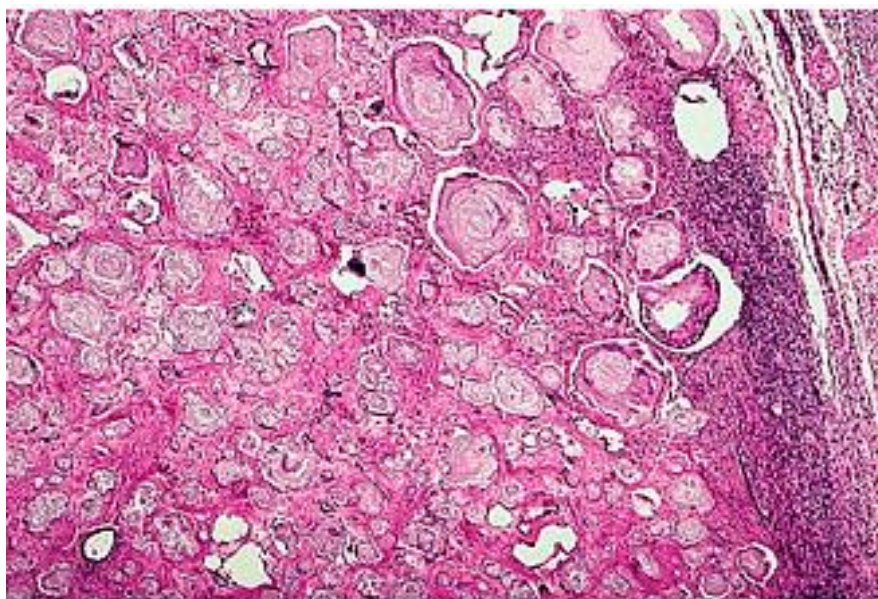


Рисунок 1.2 – Гистологическая картина серозного типа рака яичников

- муцинозный тип рака яичников – начинается из эпителия кишечного или эндоцервикального типа с выраженными признаками внутриклеточного

образования слизи; 70% всех муцинозных новообразований составляют доброкачественные опухоли, могут достигать больших размеров, заполняя всю брюшную полость; имеют гладкую внешнюю поверхность, на разрезе представляют однокамерные или многокамерные кисты; тягучие, бесцветные, слизеподобные массы [22];

Микроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.3.

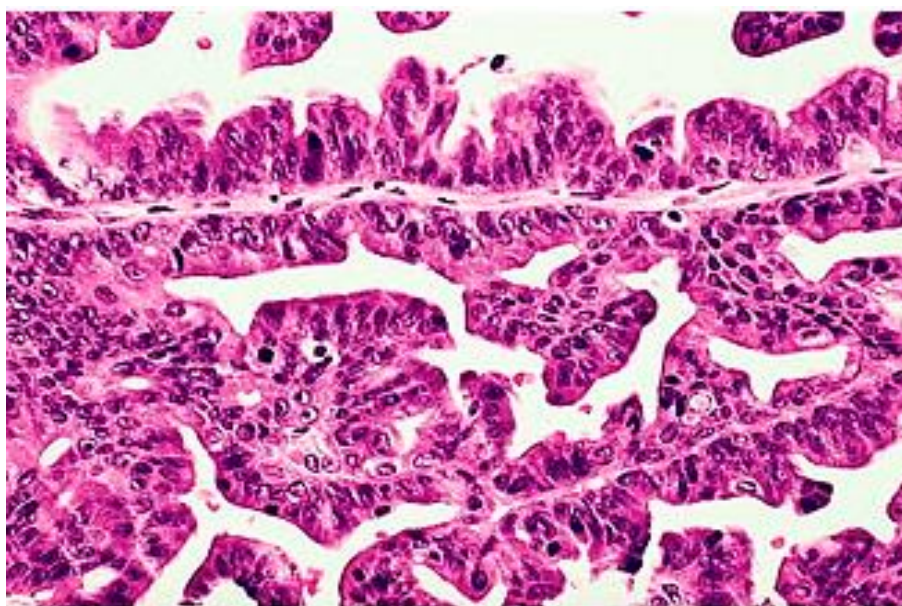


Рисунок 1.3 – Гистологическая картина муцинозного типа рака яичников

- эндометриоидный тип рака яичников – наибольшему риску появления данного подтипа рака подвержены женщины с диагностированным эндометриозом; тип клеток, составляющих данный вид рака, представляет клетки эпителия, которые выстилают полость матки [23];

Микроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.4.

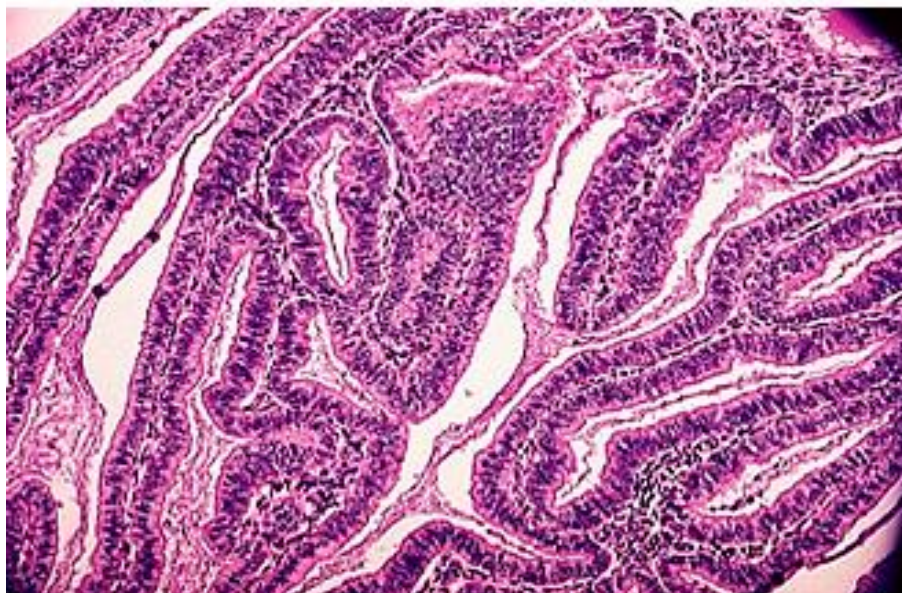


Рисунок 1.4 – Гистологическая картина эндометриоидного типа рака
яичников

- светлоклеточный тип рака яичников – опухоли данного типа встречаются в 4% случаев и характеризуются односторонним поражением; клетки имеют светлую цитоплазму и кубическую форму [23];

Микроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.5.

- опухоль Бреннера – данный тип новообразований диагностируется в 1-2% случаев; чаще представляет двустороннее поражение с размерами от небольших до огромных (20-30 см в диаметре); это четко очерченный узел, плотный с мелкобугристой поверхностью; микроскопическое строение опухоли напоминает фиброму яичника; предположительно образование способно выделять стероидные гормоны, которые обеспечивают эстрогенный или андрогенный эффект опухоли;

- переходно-клеточный тип рака яичников – опухоли данного типа представлены клетками переходного типа.

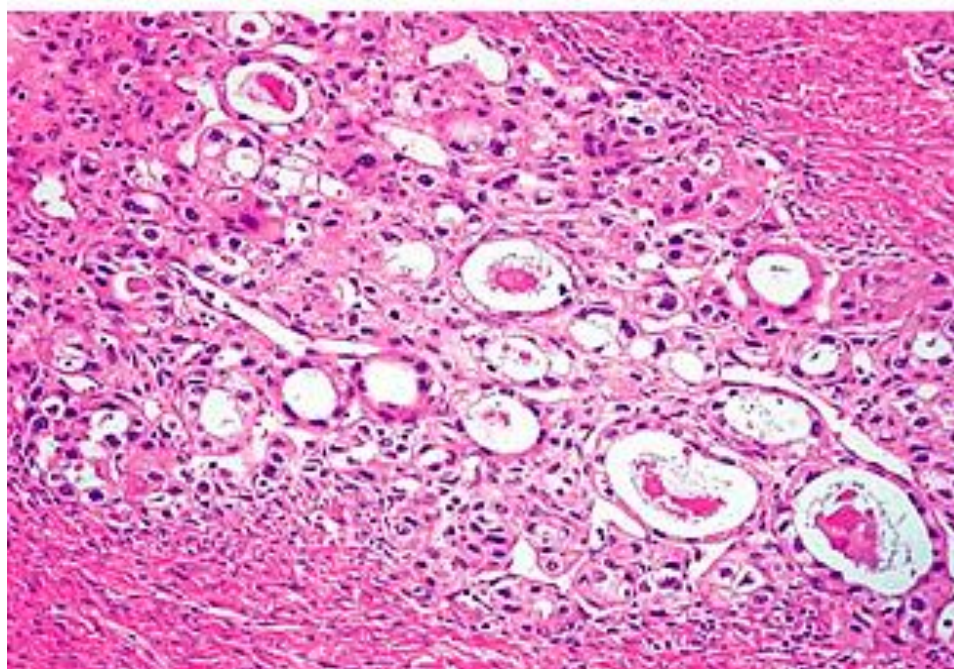


Рисунок 1.5 – Гистологическая картина светлоклеточного типа рака
яичников

2 опухоли зародышевых клеток – данный тип рака встречается в клетках, которые занимаются образованием яйцеклеток; чаще встречается у молодых женщин; наиболее распространенными злокачественными новообразованиями зародышевых клеток являются дисгерминомы и тератомы;

- дисгерминома – является широко распространённым типом злокачественных опухолей яичников, встречается в 20% случаев у женщин в возрасте до 20 лет; связана с гипоплазией половых органов, на поздних стадиях возможно прорастание в прилежащие ткани; макроскопически представляет округлое плотное образование с гладкой капсулой; чаще имеет односторонний характер образования различного размера; для микроскопического строения характерно наличие крупных клеток со светлыми ядрами и четкими границами; метастазы обычно распространяются в лимфоузлы брюшной аорты и общей подвздошной артерии, а так же в печень, легкие и кости;

Макроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.6.



Рисунок 1.6 – Макроскопическое строение дисгерминомы яичника

- тератома – тип опухоли, которая может содержать участи тканей или органов, являющихся нетипичными для расположения новообразования; чаще всего включает в себя волосы, мышечную, хрящевую, костную, железистую, жировую или нервную ткань; чаще диагностируется в детском или юношеском возрасте; причиной развития опухоли является нарушение эмбриогенеза, затруднение в продвижении эмбрионального эпителия к местам закладки гонад; различают зрелые тератомы (включают несколько дифференцированных тканей), незрелые (обнаруживаются ткани эмбрионального строения, которые являются производными трех зародышевых листков), злокачественные тератомы (зрелые или незрелые формы тератом, которые сочетаются с хориокарциномой, семиномой или эмбриональным раком); зрелые тератомы бывают солидного и кистозного строения; солидные тератомы представляют плотный, бугристый или гладкий узел; кистозная форма является крупным

гладким узлом, содержащим слизь или кашицеобразную массу, в полостях обнаруживаются зубы, волосы, хрящевые или костные включения;

Макроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.7.

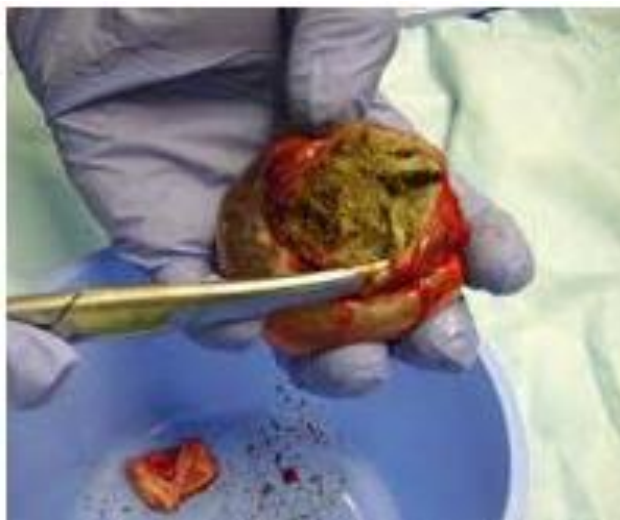


Рисунок 1.7 – Макроскопическое строение тератомы яичника

3 гранулезно-стромальноклеточный тип – редкий класс опухолей, развивающихся из соединительной ткани яичников; встречается с одинаковой частотой как в репродуктивном возрасте, так и в более старшем возрасте; могут быть мягкими или плотными образованиями солидного характера, цвет зависит от содержания липидов в опухоли, или иметь кистозное строение с содержанием внутри серозной жидкости и кровяных сгустков;

4 рак маточной трубы – злокачественное новообразование фаллопиевых труб; частота встречаемости составляет 0,1-1% от всех злокачественных опухолей женской репродуктивной системы; причины образования до конца не известны, предположительно выделяют частые случаи воспаления придатков, бесплодие, а так же возраст 45-50 лет; в последнее время рассматривается теория вирусной этиологии вируса папилломы человека и вируса герпеса II;

гистологический тип рака маточных труб представляет аденокарциному (серозную, муцинозную, светлоклеточную, эндометриоидную, переходноклеточную, недифференцированную);

Макроскопическое строение данного типа рака представлено на рисунке 1.8.



Рисунок 1.8 – Макроскопическое строение рака маточной трубы

5 пограничные опухоли яичников – представлены аномальными клетками, которые образуются в ткани, покрывающей яичник; чаще всего затрагивают женщин в возрастном диапазоне 20-40 лет; в последнее время увеличилось количество женщин с данным диагнозом в связи с усовершенствованием методов диагностики [24].

1.3 Диагностика болезни

На сегодняшний день не существует методов ранней диагностики рака яичников. Начальные этапы развития опухоли для пациентки проходят

бессимптомно, поэтому в 80% случаев патология обнаруживается при распространении повреждения на окружающие ткани и органы (брюшину, метастазы в легких и печени, костях).

- лабораторная диагностика;

Наиболее распространенным и надежным методом диагностики рака яичников является обнаружение опухолевого маркера СА 125. Более чем у 80% больных отмечено увеличение данного показателя.

Однако у данного метода существуют недостатки. Концентрации СА 125, выявляемые у пациентов с I стадией заболевания, практически не отличаются от концентраций в контроле, что дает не точный результат. В то время, как при II, III и IV стадиях показатели увеличены. В периоды ремиссии заболевания контролирование уровня СА 125 является необходимым, так как увеличение концентрации может свидетельствовать о рецидиве заболевания. Нормальные показатели СА 125 в период ремиссии должны быть максимально приближены к нулю. Увеличение количества СА 125 должно стать поводом для проведения комплексного углубленного исследования с целью обнаружения возобновления патологии.

- инструментальные исследования.

Самым распространённым и информативным инструментальным методом диагностики рака яичников является ультразвуковое исследование (УЗИ). Специфичность, чувствительность и точность данного метода достигают 80-90%, а так же данный метод является наиболее безвредным, безболезненным и быстрым. Для более подробной и углубленной диагностики на данный момент применяются компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ).

Обязательным этапом диагностики рака яичников является проведение рентгеновского исследования органов грудной клетки с целью обнаружения

метастазов в легких. Данный способ помогает установить или опровергнуть наличие рака яичников с той или иной вероятностью.

Так же одним из способов проведения диагностики является осуществление лапароскопии или лапаротомии с целью получения гистологического материала для проведения гистологического исследования [22].

1.4 Лечение болезни

Основными методами лечения рака яичников являются хирургический метод лечения и химиотерапия. Притом практически каждое лечение рака яичников состоит из комбинации данных методов с учетом типа и стадии заболевания.

- хирургическое лечение;

Основной целью хирургической операции является удаление как можно большего объема первичной опухоли и метастазов. Поэтому это довольно объемная операция, которая состоит из удаления матки, двустороннего удаления фаллопиевых труб и яичников, а так же большого сальника. В случаях, когда пациентка хочет сохранить детородную функцию, а так же стадия заболевания позволяет, возможна односторонняя резекция маточной трубы и яичника.

Так же существует операция по уменьшению объема имеющейся опухоли. Данная хирургическая операция может проводиться в случае стабилизации или положительной динамики на фоне химиотерапии [25].

- химиотерапия;

Методика представляет собой лечение рака путем использования химических лекарственных веществ, воздействующих на опухоль с целью прекращения деления клеток или с целью их убийства.

Существует системная и региональная химиотерапия. Системной химиотерапия называется в том случае, если лекарственное вещество вводится внутривенно или внутримышечно, препарат поступает в кровоток и действует на раковые клетки по всему телу. Во время региональной химиотерапии воздействие оказывается непосредственно на опухоль. Для лечения рака яичников применяется внутрибрюшинная региональная химиотерапия. Лекарство доставляется к опухоли через трубку [25].

В качестве терапии первой линии для рака яичников используются комбинации на основе препаратов платины - паклитаксел с карбоплатином АUC6 каждые три недели. Данная терапия включает 6 курсов. Карбоплатин может использоваться так же с гемцитабином, доцетакелом и липосомальным доксорубицином, однако сочетание карбоплатина именно с паклитакселом стоит на первом месте по уровню доказательности эффективности [25,26].

- лучевая терапия;

Данное лечение подразумевает использование высокоэнергетических рентгеновских лучей или других видов излучения, которые оказывают губительное действие на раковые клетки или предотвращают их рост. Для лечения рака яичников может использоваться внутрибрюшинная лучевая терапия, суть которой заключается в помещении радиоактивной жидкости через катетер непосредственно в живот пациентки [25].

- иммунотерапия и вакциноterapia.

Являются достаточно новыми методами. В 2013 году успешно были проведены исследования в виде двухэтапной иммутерапии рака яичников, состоящей из дендритных клеток и Т-клеточной терапии. Результат показал клинические улучшения в 75% случаев. На данный момент ведутся исследования с целью усовершенствования данного метода [25].

Таким образом, рак яичников занимает одно из лидирующих мест в России и мире по причинам, приводящим к смерти. Как и для других видов

рака, этиология и патогенез заболевания остаются до конца не выясненными. Диагностирование патологии на ранних этапах является невозможным. А так же в процессе лечения заболевания существует риск развития резистентности клеток рака яичников к применяемой терапии.

2 СПОСОБЫ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ И АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ

2.1 Механизмы возникновения устойчивости

Почти в 50% всех случаев заболеваний раком резистентность к химиотерапии уже существует до начала лечения. В таком случае говорят о резистентности опухоли *de novo*. Данная форма резистентности указывает на имеющуюся генетическую предрасположенность к невосприимчивости лекарственных средств. Если же устойчивость к препаратам развивается в процессе лечения, то ее называют приобретенной резистентностью, и она является результатом мутаций.

Существует несколько механизмов возникновения лекарственной резистентности клеток рака:

- дефект белка, транспортирующего лекарство в клетку;
- репарация ДНК;
- уклонение от иммунного ответа;
- генная амплификация.

В процессе терапии мутированные раковые клетки, не уничтоженные препаратами в ходе лечения, изменяют свои свойства и становятся устойчивы к препаратам химиотерапии. После данных мутаций резистентные раковые клетки способны делиться до нескольких тысяч и миллионов, что влечет за собой прогрессирование заболевания.

Одним из наиболее изученных механизмов резистентности рака к лекарственным средствам является сокращение накопления лекарственного средства за счет увеличения оттока его из клетки. АВС-переносчики представляют собой транспортные белки, присутствующие в клетках человека,

и необходимы для транспортировки через клеточную мембрану молекул сахаров, полипептидов, ионов неорганических молекул, а так же противоопухолевых лекарственных средств. Наибольшее количество данных белков содержится в клетках эпителия печени и кишечника, где они функционируют для осуществления переноса токсических веществ в желчный проток и просвет кишечника [25]. Так же данные белки играют важную роль в поддержании гематоэнцефалического барьера. Но одновременно с этими физиологическими процессами, данные белки способствуют возникновению лекарственной устойчивости клеток рака. Два транспортера - белок MDR1 с множественной лекарственной устойчивостью и белок MRP1 с множественной лекарственной устойчивостью – обнаружены в клетках многих видов рака, резистентных к химиотерапии. Они обладают широкой субстратной специфичностью и способны вытеснять из клеток ксенобиотики, включая алкалоиды винка, эпи подофиллотоксины, антрациклины, таксаны и ингибиторы киназы. Таким образом, они защищают раковые клетки от многих химиотерапий первой линии [26].

Еще одним способом приобретения лекарственной резистентности является восстановление поврежденной ДНК в ходе воздействия противораковой терапии. Это достигается с помощью системы репарации ДНК (DDR), которая активируется благодаря действию PIKK-киназ ATM и ATR в ответ на повреждение [26,27]. Платиновые химиопрепараты (цисплатин) оказывают действие на цепь ДНК, повреждая ее. Опосредованный способ воздействия заключается в ингибировании топоизомераз, которые представляют собой ферменты, катализирующие изменения топологии ДНК путем разрыва одной или двух цепей ДНК, переноса фрагмента и последующей сшивки данной брешы [28]. Однако резистентность к лекарствам на основе платины часто возникает из-за восстановления нуклеотидных иссечений и гомологичной рекомбинации. Следовательно, ДНК-разрушительная терапия

будет успешной при невыполнении механизмов DDR. Этого можно достичь при использовании ингибиторов PARP – фермента репарации. По данным проведенных исследований клетки всех опухолей с дефектами в системе репарации ДНК являются чувствительными к данному ингибитору [29, 30].

Раковые клетки имеют способность к уклонению от иммунного ответа. Главной задачей иммунной системы является выявление и уничтожение мутированных клеток. Этот процесс контролируется молекулами гистосовместимости HLA I и II, которые находят и презентуют поврежденные клетки гуморальному иммунитету, в особенности CD8+. Другой механизм воздействия на измененные клетки задействует NK-клетки и антителзависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность без экспрессии HLA. Но данные механизмы способны не только выступать в защиту организма от раковых клеток, но в определенный момент способствуют прогрессии опухоли. В процессе активного образования противоопухолевых антител их число становится достаточным для того, чтобы экранировать опухолевые агенты так, что они становятся не узнаваемы иммунной системой [31]. Таким образом раковые клетки уклоняются от иммунной реакции, что приводит к дальнейшему росту опухоли.

Генная амплификация заключается в том, что раковые клетки способны воспроизводить сотни копий определённого гена, который кодирует белок, наличие которого может до полной неэффективности снизить действие лекарственного препарата. А так как синтез белка невозможен без РНК, является необходимым исследование и этих структур в том числе. Проведение такого исследования является относительно сложным, так как РНК представляют собой довольно хрупкие нестабильные структуры, которые не могут долго храниться даже внутри клетки и могут деградировать при изменении значений pH или температур [31].

В настоящее время резистентность раковых клеток к химиотерапии диагностируется обычно в процессе лечения, когда после длительного введения препарата ожидаемой реакции на него не происходит. Но существует так же еще три способа обнаружения резистентности опухоли к терапии: тесты на культурах опухолевых клеток, тесты на позитронно-эмиссионной томографии и тесты на биомаркеры рака.

2.2 Методика определения резистентности с помощью тестов на культурах опухолевых клеток

С 1950-х годов начались разработки методов для прогнозирования реакции опухоли на терапию. Для этих исследований использовалась свежая раковая ткань. Получить результат получилось не сразу, но по мере совершенствования методов проведения данного исследования, это удалось.

Данное исследование состоит из двух этапов: вначале необходимо подготовить культуры клеток, на втором этапе производится непосредственное изучение эффекта препарата.

Подготовка клеток может иметь разную продолжительность и зависит от типа используемых клеток. Для исследования эффекта препарата после инкубации используется несколько методов. В 1970-х годах широко использовался метод измерения включений тимидина в ДНК раковых клеток. Данная методика оценивает ингибирующее действие лекарственного препарата на рост клеток опухоли [32].

В таблице 2.1 представлена схема процедуры проведения анализа.

Обычно для понимания зависимости доза-эффект тестируется несколько доз препарата. Концентрация лекарственного средства в тестах аналогична концентрации лекарств, применяемых *in vivo* во время лечения.

Методы основаны на измерении молекулярных процессов в раковых клетках, выявлении их активности, тем самым указывая на рост или смерть

клеток. Основная ценность этих методов заключается в обнаружении внутренней резистентности раковых клеток [33].

Данный вид исследования может проводиться не только с твердыми опухолями, но и с гематологическими типами рака.

Таблица 2.1 – Схематичное представление проведения процедуры анализа раковых клеток на резистентность к лекарственной терапии

День 1	Подготовка клеточной культуры	Размещение клеточной культуры в питательной среде в микропланшетах
День 2-6	Обработка клеточной культуры лекарственным препаратом	Инкубация клеточной культуры с лекарственным препаратом в концентрации равной концентрации, применяемой <i>in vivo</i>
День 7	Оценка жизнеспособности клеток	Измерение метаболической активности в клеточной культуре

2.3 Методика определения резистентности при помощи тестов с применением позитронно-эмиссионной томографии

Диагностика лекарственной резистентности при лечении в прошлом была трудной. Единственным доступным методом был контроль размера опухоли. Решение было найдено с использованием метода ядерной медицины, позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Метод используется для выявления локализации рака и определения метаболической активности неопластической ткани [34].

В основе методики лежит способность живых тканей накапливать радиоактивные вещества при введении их в организм. Высокочувствительный компьютерный томограф улавливает излучение от протонно-электронной пары и преобразует его в изображение. Раковые клетки способны к большому поглощению бета-лучей, а значит к большому испусканию фотонов, следовательно, свечение в области опухоли будет выше.

Мониторинг реакции на лечение требует ПЭТ-сканирования до и после терапевтического вмешательства. Первое сканирование - для постановки активности опухоли, второе сканирование может показать терапевтический эффект после 1 или 2 циклов лечения.

Однако общепринятые критерии расчета ответов все еще отсутствуют, что затрудняет сравнение результатов различных исследований. Количественная оценка значений ПЭТ может зависеть от некоторых технических, биологических и физических факторов, которые необходимо учитывать при расчетах. Поэтому международные рекомендации по испытаниям ПЭТ необходимы для обеспечения качества и количественной точности результатов [35]. В настоящее время проводятся многочисленные исследования, чтобы сделать ПЭТ-тестирование приемлемым для обычного клинического использования.

2.4 Методика определения резистентности при помощи тестов на биомаркеры рака и исследования экзосом

Опухолевые маркеры (биомаркеры рака) уже привлекли внимание в качестве диагностических инструментов для выявления рака и показателей роста опухоли в начале прошлого века. Основной поиск был сосредоточен на конкретных молекулах, собранных из крови. Несколько маркеров, таких как карциноэмбриональный антиген (СЕА) и альфа-фетопротеин (АФП), нашли свое применение в клинические лаборатории для ранней диагностики рака.

Затем были обнаружены другие маркеры, однако большинство из них не являлось специфичными для опухолей [36]. До недавнего времени в клинической практике использовались только несколько маркеров опухолей, например, простат-специфический антиген (ПСА) при раке предстательной железы, СА 125 при раке яичника, тиреоглобулин при раке щитовидной железы и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) в хорионэпителиоме. В случаях с ними было показано, что после успешного лечения показатели содержания маркеров падали до очень низких уровней. Однако до сих пор неизвестно, насколько достоверно маркеры могут отражать жизнеспособную массу опухоли. Патобиология опухолевых маркеров до сих пор не совсем понятна. По-прежнему трудно понять, почему опухолевые маркеры не были исследованы в большей степени в огромном количестве предыдущих исследований химиотерапии [37].

Потенциальными биомаркерами для прогнозирования реакции лекарственного средства являются несколько белков, которые играют роль в механизмах лекарственной устойчивости. Такими клеточными факторами являются резистентные белки, которые могут быть определены иммуногистохимией. Лабораторные эксперименты с клеточными культурами рака легкого показали, что существуют корреляции между резистентными к лекарственным средствам клетками и несколькими резистентными белками. Определение резистентных белков в биопсиях раковых клеток представляется возможным способом выявления внутренней резистентности к лекарственным средствам [38].

Однако в конце XX еще один способ диагностики рака стал возможен при открытии особых внеклеточных везикул - экзосом, которые являются переносчиками генетической информации между клетками организма. В отличие от экзосом нормальных клеток, экзосомы, выделяемые раковыми клетками, способны влиять на потенциалы не только проксимально

расположенных клеток, но так же и на отдаленно расположенные ткани. Основываясь на их способности менять микроокружение опухоли, регулируя иммунитет, ангиогенез и метастазы, растет интерес к определению клинической значимости экзосом при раковых заболеваниях. В частности они являются ценными биомаркерами рака [38,39].

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы, которые выделяются в межклеточное пространство всеми видами клеток организма [39]. Они представляют собой мелкие (30-100 нм) внеклеточные везикулы с мультивезикулярным эндосомным происхождением. Они состоят из липид-бислойной мембраны, окружающей небольшой цитозоль, и лишены клеточных органелл. Внутреннее содержимое экзосом находится в сильной зависимости от места их образования. В том числе на состав везикул влияет, была здорова или больна породившая их клетка [40]. Экзосомы содержат различные молекулярные составляющие их клетки. Белки: в частности аннексины (регулируют процессы слияния мембраны экзосомы и мембраны клетки), ГТФазы Rab (необходимый компонент в процессах образования экзосом), рецепторы и молекулы адгезии (участвуют в узнавании клетки-мишени и присоединении к ней соответственно), белки ESCRT (представляют эндосомный комплекс сортировки и необходимы для внутриклеточной транспортировки белков и РНК), трансмембранные белки CD63, CD81, CD9 (иногда) из семейства тетраспанинов являются главными маркерами экзосом, на своей мембране экзосомы несут белки МНС (главного комплекса гистосовместимости) и белки теплового шока (белки стресса) HSP60, HSP70, HSP90, роль которых заключается в поиске антигенов и презентовании их гуморальному иммунитету.

Помимо белков экзосомы переносят генетический материал: матричные РНК, которые содержат информацию об аминокислотной последовательности

белков [41], малые РНК [42] и ДНК. Нуклеиновые кислоты, транспортируемые таким образом, являются более стабильными и устойчивыми к денатурации.

Графическое представление состава экзосом представлено на рисунке 2.1.

Процесс образования экзосом начинается с впячивания внутрь мембраны ранней эндосомы. В результате эндоцитоза в эндосому так же попадают антигены, которые затем связываются с белками главного комплекса гистосовместимости на поверхности экзосомы. ДНК, РНК и белки попадают внутрь экзосомы из цитоплазмы. Рецепторы экзосомы такие же, как и у клетки, где она образовалась. Далее в зависимости от липидов, которыми промаркирована мембрана эндосомы, может быть два пути: если мембрана эндосомы содержит лизобифосфатидиловую кислоту – ее содержимое будет уничтожено, если мембрана помечена церамидами – экзосома будет вытолкнута наружу. На данном этапе главную роль играют белки ГТФазы Rab.

Схема образования экзосом представлена на рисунке 2.2.

На сегодняшний день механизм поглощения экзосом клетками-реципиентами изучен слабо. Известно, что данный процесс включает эндоцитоз [43].

Экзосомы играют важную роль в связи между клетками, перенося их содержимое. Межклеточная связь, опосредованная экзосомами, не только участвует в регуляции нормальных физиологических процессов, но также и в патологических процессах многих заболеваний, включая рак. Они секретируются большинством типов клеток и высвобождаются в жидкости, такие как моча, плазма, слюна, сыворотка крови, лимфа, слезная жидкость, желчь, околоплодные воды и грудное молоко.

Из-за их стабильного присутствия в большинстве жидкостей организма и сходства их содержимого с родительскими клетками экзосомы имеют большой потенциал для использования в качестве инструмента проведения биопсии жидкости для диагностики различных заболеваний, включая рак. Экзосомы

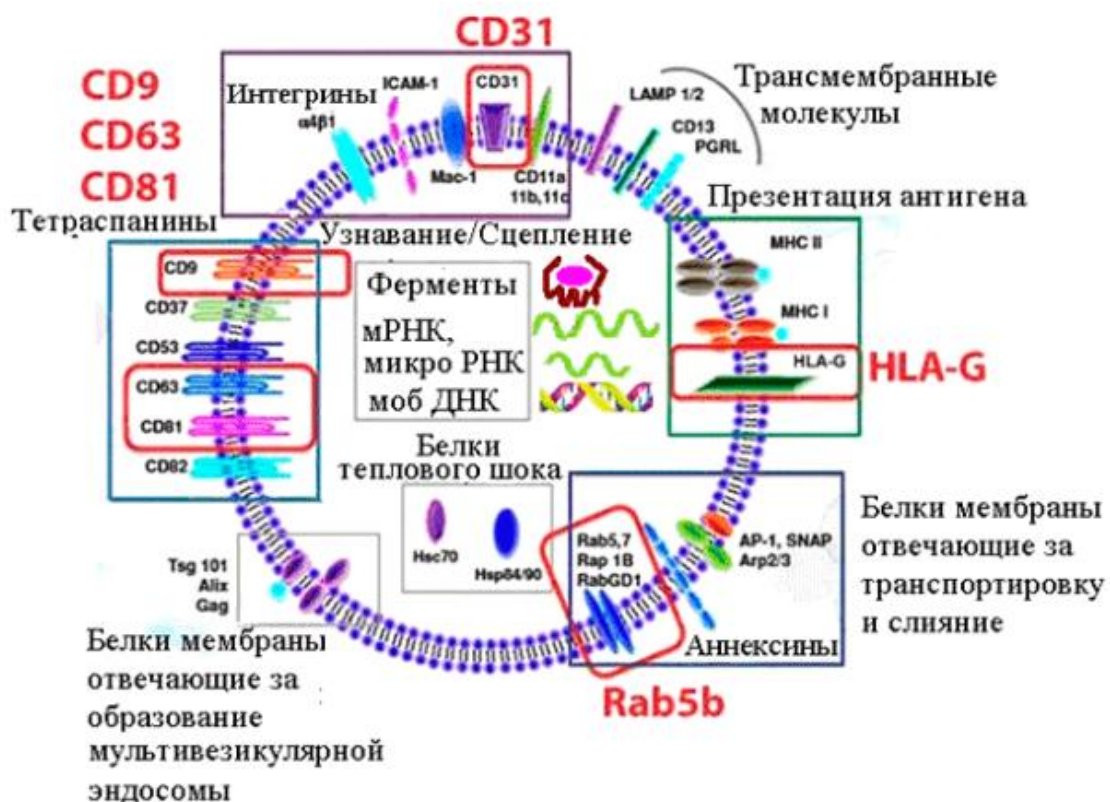


Рисунок 2.1 – Компоненты экзосом

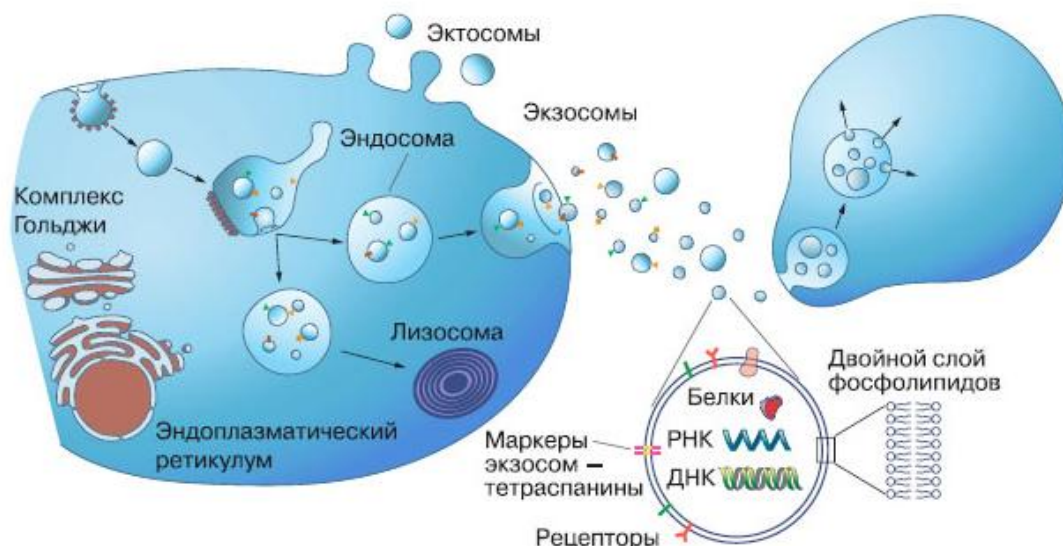


Рисунок 2.2 – Образование экзосом

могут регулировать функцию отдаленных клеток, высвобождая содержимое вдали от места происхождения, и могут влиять на процессы в клетках-реципиентах, особенно способствуя взаимодействию между несколькими типами клеток в микроокружении опухоли [44].

Таким образом, одной из главных проблем в лечении рака яичников является его устойчивость к применяемой терапии. На сегодняшний день не существует ранних методов выявления резистентности клеток рака к лекарственным препаратам.

С учетом роли экзосом в развитии раковой опухоли и способности их переносить и сохранять в стабильном состоянии нуклеиновые кислоты, экзосомы являются ценным и удобным материалом для исследования процессов формирования резистентности раковых клеток к лекарственной терапии по механизму генной амплификации.

3 РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОИСКА ГЕНОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ

3.1 Разработка методики поиска генов

По данным экспериментов, проводимых ранее, было обнаружено преобладание экспрессии матричной РНК (мРНК) в клетках и экзосомах клеток рака яичников с резистентностью к лекарственной терапии (OVCAR8/ADR) и клеток с резистентностью к лекарственной терапии, подверженных обработке доксорубицином в процессе эксперимента (OVCAR8/ADR+Dox), в сравнении с парентальными клетками рака яичников. Это стало предположением о том, что данные мРНК могут участвовать в возникновении лекарственной резистентности клеток рака яичников по механизму генной амплификации.

Был проведен анализ функций генов, последовательности которых заключены в мРНК. Данные анализа представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Функций генов

Гены	Функции
TMSB4X	Кодирует актин-секвестрирующий белок, который играет роль в регуляции полимеризации актина. Белок также участвует в пролиферации, миграции и дифференцировке клеток.
RPL30	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом 60S-субъединицы. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков L30E. Расположен в цитоплазме.
TFF1	Кодирует секреторные белки, выраженные в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта. Их функции не определены, но они защищают слизистую от повреждений.
MT2A	Антиоксиданты, защищают от гидроксильных свободных радикалов, важны для гомеостатического контроля металла в клетке, роль в детоксикации тяжелых металлов, некоторые полиморфизмы этого гена связаны с повышенным риском развития рака.
F2R	Кодирует белок, участвующий в регуляции тромботического ответа.
MT1A	Антиоксиданты, защищают от гидроксильных свободных радикалов, важны для гомеостатического контроля металла в клетке, роль в детоксикации тяжелых металлов.

RPL31	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом 60S-субъединицы. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков L30E.
RPL6	Кодирует белковый компонент 60S рибосомной субъединицы.
RPS10	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом субъединицы 40S. Белок принадлежит семейству рибосомных белков S10E. Расположен в цитоплазме.
RN7SL1	Опосредует котрансляционное введение секреторных белков в просвет эндоплазматического ретикулума.
ANP32B	Многофункциональный белок, работающий как фактор прогрессирования клеточного цикла, а также фактор выживаемости клеток. Требуется для перехода от G1 к S-фазе. Антиапоптотический белок, который функционирует как ингибитор каспазы-3.
CSDE1	Требуется для внутреннего инициирования трансляции РНК человеческого риновируса.
EIF4B	Необходим для связывания мРНК с рибосомами; способствует активности АТФазы и активности, связанной с АТФ-зависимой РНК.
SNRPE	Белок, кодируемый этим геном, является основным компонентом U маленьких ядерных рибонуклеопротеинов, которые являются ключевыми компонентами сплайсома для предварительной мРНК-обработки.
RPS6	Кодирует цитоплазматический рибосомальный белок, который является компонентом субъединицы 40S. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков S6E. Это основной субстрат протеинкиназ в рибосоме с подмножествами пяти С-концевых сериновых остатков, фосфорилированных различными протеинкиназами. Фосфорилирование индуцируется широким спектром стимулов, включая факторы роста, агенты, способствующие росту опухоли, и митогены.
RPL35A	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом 60S-субъединицы. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков L35AE. Он расположен в цитоплазме. Требуется для пролиферации и жизнеспособности гемопоэтических клеток; Нокдаун RPL35A в гемопоэтических клеточных линиях приводит к снижению пролиферации клеток, увеличению апоптоза, снижению биогенеза зрелой 60S-рибосомной субъединицы и аномальной обработке большой рибосомной субъединицы рРНК.
RPL18	Кодирует белок, принадлежащий к семейству рибосомных белков L18E, белок является компонентом 60S-субъединицы.
RPS14	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом субъединицы 40S. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков S11P. Расположен в цитоплазме.
EIF1	Ген, кодирующий белок, осуществляющий транспорт РНК.
RPL8	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом 60S-субъединицы. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков L2P. Расположен в цитоплазме.
PLCG2	Белок, кодируемый этим геном, представляет собой трансмембранный сигнальный фермент, который катализирует превращение молекул, важных для передачи сигналов от рецепторов фактора роста и рецепторов иммунной системы через клеточную мембрану.
RPS24	Кодирует рибосомальный белок, который является компонентом субъединицы 40S. Белок принадлежит к семейству рибосомных белков S24E. Расположен в цитоплазме.

По данным таблицы можно сделать вывод о том, что большая часть генов кодирует образование рибосомальных белков, которые, как известно, участвуют в процессах синтеза белка. Некоторые гены ответственны за пролиферацию, прогрессирование клеточного цикла, миграцию и выживаемость, что способствует прогрессированию развития опухоли.

С учетом этого была выдвинута гипотеза о том, что определенные мРНК, синтезированные на основе ДНК, содержат информацию о последовательности белка, который способствует формированию лекарственной резистентности клеток рака яичников.

С целью проверки настоящего предположения была разработана методика, состоящая из приведенных далее этапов:

- 1 Культивирование клеточных культур в двумерных условиях;
- 2 Культивирование клеточных линий в трехмерных условиях;
- 3 Изолирование экзосом из образцов клеточных линий;
- 4 Подсчет количества экстрацеллюлярных везикул с помощью методов Динамического рассеяния света и Анализа траектории наночастиц;
- 5 Изолирование мРНК из клеток;
- 6 Изолирование мРНК из экзосом;
- 7 Подсчет количества мРНК в полученных образцах;
- 8 Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией.

Рассмотрим каждый из названных этапов подробнее.

3.2 Культивирование клеточных культур в двумерных условиях

Культивирование клеточных линий в двумерных (2D) условиях является наиболее простым способом подготовки клеточных образцов для проведения эксперимента. Высаживание клеток производится непосредственно в раствор питательной среды внутрь культурального флакона. Далее флакон

укладывается таким образом, что одна из наибольших его сторон по площади оказывается полностью погружена в раствор питательной среды со взвесью клеточных образцов. Со временем происходит оседание клеток из раствора на поверхность культурального флакона, образуется монослой клеток.

Важным моментом при использовании данного метода является недопущение чрезмерного роста клеток. Максимальное процентное соотношение свободного пространства между клетками не должно превышать 10-15%.

Для проведения эксперимента использовались клеточные линии рака OVCAR8 и OVCAR8/ADR в растворе питательной среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)+10% Fetal bovine serum (FBS).

3.3 Культивирование клеточных линий в трехмерных условиях

Культивирование клеточных линий в трехмерных (3D) условиях является более предпочтительным и качественным методом. Данным способ позволяет создать более физиологичные и естественные условия для жизни клеток, чем 2D условия культивирования, так как таким образом имитируется нормальная организация тканей человека [45].

Для создания трехмерных условий используются специализированные матриксы, которые имеют ячеистую структуру. Форма и высота ячеек подбирается в зависимости от предпочтений, касающихся роста культуры. Низкое соотношение сторон ячеек (микролун) обеспечивает более быстрый рост культуры, в то время, как матрикс с глубокими ячейками позволяет выращивать образцы в течение длительного периода времени. Коническая форма лунок способствует облегчению доставки кислорода, а плоское дно обеспечивает большее количество агрегатов в лунке [46].

С целью создания 3D условий был использован Conical agarose microwell array (CAMA). CAMA – это матрица для посева, выращивания и оценки

клеточных агрегатов в трехмерной среде. Данная форма представляет собой агарозный гель с ячейками конической формы.

Внешний вид САМА представлен на рисунке 3.1.

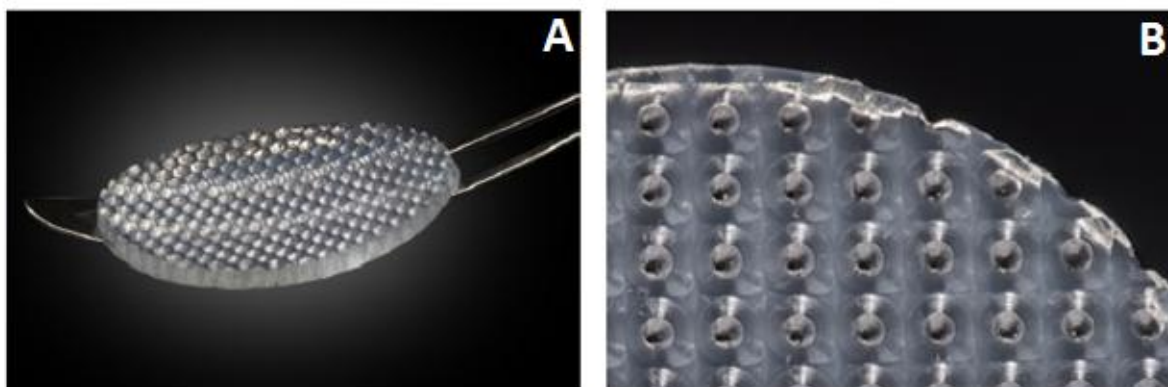


Рисунок 3.1 - Внешний вид САМА (А), внешний вид ячеек САМА (В)

Для посадки клеточных образцов на матрикс производится эквilibрирование клеточных линий OVCAR8 и двух образцов OVCAR8/ADR в растворе GlutaMAXTM DMEM, обедненном FBS. С течением времени клетки оседают из раствора в ячейки матрикса, где продолжают свой рост на протяжении 7 дней.

3.4 Изолирование экзосом из образцов клеточных линий

Для извлечения экзосом необходимо многократное центрифугирование клеточных образцов с последовательным увеличением времени и скорости вращения. Во время этого происходит последовательное выпадение в осадок внеклеточных составляющих в зависимости от их размеров: в первую очередь высвобождаются крупные органоиды (апоптозные тельца), затем меньших размеров (экзосомы), после последнего сеанса центрифугирования остаются необходимые для эксперимента экзосомы.

Выполнение протокола изолирования экзосом для культур OVCAR8, OVCAR8/ADR и OVCAR8/ADR+Dox: сбор и центрифугирование клеток с параметрами центрифуги Megafuge 16R 500/800g и 2000g, последующим центрифугированием надосадочной жидкости центрифугой Avanti J-301 с параметрами 5000g и 12000g, ультрацентрифугой Optima LE-80K с параметрами 30000K и 32000K соответственно.

При этом на каждом из этапов центрифугирования формируются соответствующие фракции экстрацеллюлярных везикул с различными размерами и массой, а также свободноциркулирующая жидкость после ультрацентрифугирования.

3.5 Подсчет количества экстрацеллюлярных везикул с помощью методов Динамического рассеяния света и Анализа траектории наночастиц

Для проведения подсчета количества экстрацеллюлярных везикул были использованы методы Динамического рассеяния света (ДРС) и Анализа траектории наночастиц.

Метод динамического рассеивания света является одним из наиболее популярных способов измерения размера частиц. Суть метода заключается в измерении интенсивности рассеянного света в объеме, содержащем макромолекулы, и анализе его флуктуации в разные моменты времени. Броуновское движение частиц в растворе влечет за собой флуктуацию локальной концентрации частиц. В результате возникают неоднородности показателя преломления, то есть при прохождении лазерного луча происходит изменение интенсивности рассеянного света в среде. Коэффициент диффузии является показателем относительного времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света, его измерение ведется с помощью цифрового коррелятора. Коэффициент диффузии находится в зависимости от размеров частиц, которые рассчитываются с помощью формулы Стокса-Эйнштейна.

Анализ траектории наночастиц представляет метод визуализации наночастиц в растворах, в основе которого лежит отслеживание формы и размера отдельных частиц за счет учета броуновского движения. Так же данная методика подходит для распределения частиц по их материалу и концентрации каждой из фракций наночастиц. В момент помещения коллоидного раствора в камеру прибора частицы находятся под воздействием лазерного луча. Происходит регистрация броуновского движения высокочувствительной камерой. Видеоизображение передаётся на компьютер, где происходит регистрация отдельных наночастиц на каждом кадре и отслеживание их перемещений. Скорость броуновского движения используется в формуле Стокса-Эйнштейна для подсчета размера частиц. При усреднении во всех кадрах интенсивности рассеянного света потенциально наночастицы разделяются по материалам. Концентрация каждой фракции рассчитывается в зависимости от известного количества частиц и объема области наблюдения.

3.6 Изолирование мРНК из клеток

Для выполнения протокола изолирования мРНК из клеток линий OVCAR8, OVCAR8/ADR, OVCAR8/ADR+Dox был применен комплекс для изолирования мРНК из клеток QIAGEN RNeasy Mini Kit. Данный комплекс обеспечивает быстрое изолирование мРНК, которая может использоваться для дальнейших экспериментов.

В состав комплекса входят:

- буфер RLT – буфер, необходимый для лизиса и освобождения РНК;
- буфер RW1- предназначен для очищения и промывания РНК;
- буфер RPE (concentrate) – концентрированный буфер, применяемый для очищения РНК;

– вода без нуклеаз - чистая, проверенная на качество вода, используется в экспериментах, где необходимо обезопасить РНК от денатурации.

В ходе проведения изолирования происходит последовательное добавление буферных растворов и воды в специализированные колонны, где производится разделение, лизис, очищение и промывание мРНК от сопутствующих составляющих. После добавления каждого из растворов необходим сеанс центрифугирования, скорость и время находится в зависимости от этапа проведения изолирования.

3.7 Изолирование мРНК из экзосом

На данном этапе было произведено изолирование мРНК из экзосом, полученных после проведения центрифугирования клеточных линий OVCAR8, OVCAR8/ADR, OVCAR8/ADR+Dox.

Процесс осуществлялся с применением комплекса для изолирования мРНК NORGEN Total RNA Purification kit. Данный комплекс используется для изолирования РНК из многих образцов, таких как клетки, бактерии, дрожжи, вирусы, жидкости организма (плазма, сыворотка, кровь, слюна). Набор способен очистить РНК всех размеров от других видов РНК, сохраняющихся в экзосомах.

Комплекс включает растворы:

- буфер RL – раствор применяется для очистки РНК от протеинов;
- меркаптоэтанол – предотвращает повреждение РНК во время проведения изоляции;
- wash Solution A – осуществляет очищение РНК, промывая ее;
- elution Solution A – способствует непосредственно выделению РНК.

Процесс изолирования соответствует процессу изолирования мРНК из клеток с помощью комплекса QIAGEN RNeasy Mini Kit.

РНК, извлеченная с помощью данной технологии, может в дальнейшем использоваться для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и компьютерной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

3.8 Подсчет количества мРНК в полученных образцах

Для проведения данного этапа было использовано устройство NanoDrop ND-1000. Система предназначена для подсчета концентрации мРНК в исследуемом растворе.

Устройство представляет собой полноспектральный (220-750 нм) спектрофотометр, который исследует образцы с высокой точностью и воспроизводимостью. Методика не предполагает использования дополнительного оборудования (капилляров, кювет), так как подсчет количественного содержания нуклеиновой кислоты мРНК основан на принципе поверхностного натяжения для удержания образца. Один цикл измерения, включающий подготовку образца, измерение и очистку рабочих поверхностей занимает в среднем одну минуту, так как так же не требует дополнительных средств (для очистки рабочей поверхности используется лабораторная салфетка). Для проведения эксперимента используется небольшой объем исследуемого образца – 1-2 мкл.

При помощи данного устройства производился подсчет количества мРНК в образцах, полученных после процедуры изолирования мРНК из клеток и экзосом клеточных линий OVCAR8, OVCAR8/ADR, OVCAR8/ADR+Dox.

Полученные данные были использованы для расчетов при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией.

3.9 Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией

Метод широко применяется для синтеза комплементарной цепочки ДНК (кДНК) на матрице мРНК.

Принцип метода заключается в количественном считывании флуоресцентного сигнала, который изменяется в зависимости от количества ПЦР-продукта. Проведение исследования контролируется в момент прохождения реакции с помощью графика, на котором по оси абсцисс ведется нумерация циклов реакции, по оси ординат отмечается количество продукта реакции. На графике прослеживаются начальные этапы, которые показывают слабый сигнал флуоресценции, так как продукт реакции находится еще в малом количестве, затем наблюдается рост сигнала, что свидетельствует о накоплении продукта реакции, далее следует выход на плато, что объясняется истощением запасов компонентов реакции (праймеры, нуклеотидилтрифосфаты).

Пример построения графика представлен на рисунке 3.2.

Одними из главных составляющих данного этапа эксперимента являются праймеры, которые служат затравками для синтеза новых цепочек ДНК. Праймеры были химически синтезированы для взаимодействия с комплементарной ДНК, полученной в процессе обратной транскрипции на матрице мРНК.

Метод подразделяется на два этапа: на первом этапе происходит создание цепочки ДНК комплементарной имеющейся мРНК, на втором этапе - непосредственное амплифицирование и количественное определение полученных участков ДНК.

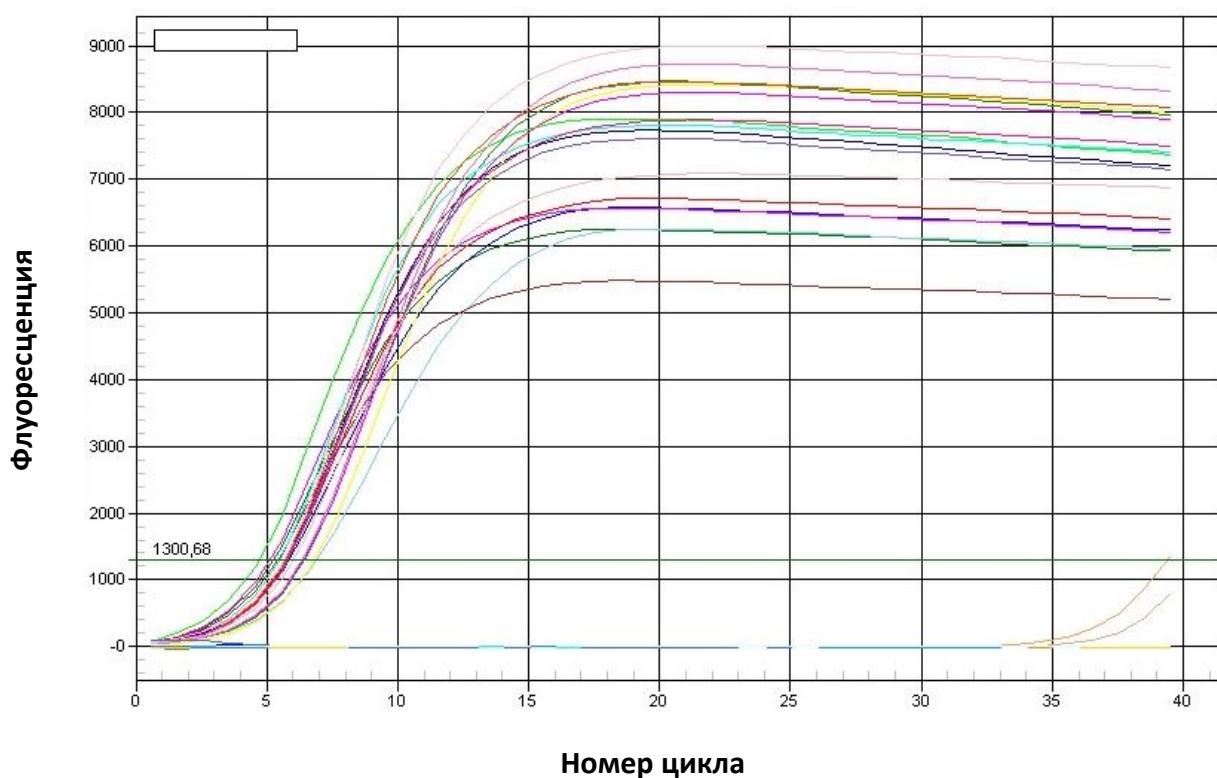


Рисунок 3.2 – Пример графического представления данных проведения реакции ПЦР в реальном времени

3.9.1 Полимеразная-цепная реакция с обратной транскрипцией

Этап представляет собой обнаружение молекул мРНК с известным заранее комплементарным праймеру участком последовательности и образование комплементарной цепочки ДНК в процессе обратной транскрипции на матрице мРНК.

Для проведения эксперимента использовалась система Bio Rad T100 Thermal cycler и следующие реактивы:

- oligo dT – представляет собой одноцепочечную последовательность дезокситимина (dT) и используется для синтеза первой цепи комплементарной ДНК с обратной транскрипцией;
- вода без нуклеаз – чистая, проверенная на качество вода, используется в экспериментах, где необходимо обезопасить РНК от денатурации;

- ревертаза вируса мышинного лейкоза (M-MLV RT) – наиболее часто используемый фермент (обратная транскриптаза), который катализирует синтез ДНК на матрице мРНК;
- M-MLV 5x Reaction Buffer – представляет собой буферный раствор для M-MLV RT;
- дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) – смесь нуклеозидов, соединенных с тремя фосфатами, содержит дезоксиаденозинтрифосфат (dATP), дезоксигуанозинтрифосфат (dGTP), дезоксицитидинтрифосфат (dCTP), дезокситимидинтрифосфат (dTTP) и используется для построения новой цепочки кДНК;
- RiboLock – представляет собой ферментативный ингибитор рибонуклеазы.

В ходе эксперимента необходимо соединение реактивов в определенном соотношении, а так же добавление расчетного количества мРНК в полученный микс. При соблюдении температурного режима, обеспечиваемого выбранным протоколом работы на устройстве, происходит выстраивание комплементарной цепи ДНК с помощью dNTP. Таким образом, для каждой мРНК строится комплементарная цепь ДНК.

3.9.2 Полимеразная-цепная реакция в реальном времени

После того, как обратная транскрипция закончена, следующие процессы амплификации производятся по стандартной методике ПЦР и включают в себя 30 циклов, состоящих из последовательных процессов денатурации ДНК, отжига, элонгации. Этап проводился с использованием системы Bio Rad MyiQ.

На данном этапе используется особый ПЦР-микс, состоящий из следующих реагентов:

– буфер – создает условия среды для проведения реакции. Раствор содержит ионы для поддержания pH, соли магния, полимеразы, необходимые для реакции, неионный детергент Tween-20 в сочетании BSA (бычьим сывороточным альбумином), который предотвращает налипание компонентов реакции на стенки пробирки;

– дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) – смесь нуклеозидов. Необходима для создания новых амплифицированных участков ДНК;

– термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза) – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК от 3' конца к 5' концу. Так как реакция проходит при высоких температурах, используются термостабильные ферменты, способные сохранять активность при высоких температурах длительное время, такие как Taq-полимераза (*Thermus aquaticus*), Pfu-полимераза (*Pfurococcus furiosus*), Pwo-полимераза (*Pfurococcus woesei*). Необходимо учитывать, что Taq-полимераза более производительна, в то время как Pfu-полимераза и Pwo-полимераза помогают получить более точные результаты. Каждая из полимераз имеет свой диапазон температур, в котором наиболее активна;

– праймеры – последовательности синтетических олигонуклеотидов, состоящие из 18-30 оснований, комплементарных противоположным концам участков ДНК. Прямой и обратный праймеры имеют 3' и 5' штрих концы. Присоединяясь к 3' противоположным концам разных цепей ДНК, являются затравкой для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы;

– вода без нуклеаз – так же необходима для использования с целью исключения риска денатурации нуклеиновых кислот;

– флуоресцентные красители – применяются для визуализации ДНК и амплифицированных участков. Они являются универсальными и

неспецифическими. При добавлении в реакционную смесь взаимодействуют только с двуспиральными молекулами ДНК, игнорируя при этом одноцепочечные. Некоторые красители (SYBR Green Select Master Mix) представляют Мастер Микс, т.е. являются готовой смесью из буфера, дезоксинуклеотидтрифосфатов, ДНК-полимеразы и собственно красителя;

– комплементарная ДНК – ДНК, участки которой необходимо амплифицировать.

Перед первым циклом проводится предварительный прогрев реакционной смеси при температуре 95°C на протяжении 2-х минут. Такой способ называется горячим стартом и позволяет понизить количество неспецифичных продуктов реакции.

Далее наступает стадия денатурации. В это время происходит раскручивание двойной цепочки ДНК при температуре 95°C в течение 15 секунд.

После того, как цепи ДНК разошлись, происходит связывание праймеров с одноцепочечными матрицами ДНК. На данном этапе необходимо понижение температуры до величины на несколько (4-5) градусов ниже, чем температура плавления праймеров. При неправильно выбранной температуре отжига возможны ошибки: при завышенной температуре - недостаточное связывание праймеров с матрицей, при заниженной температуре - связывание не в верном месте или появление ошибочных продуктов реакции. Стадия длится 1 минуту.

Следующий этап называется элонгацией. В этот период происходит репликация матричной цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы при использовании праймеров в качестве затравки. Температура проведения реакции зависит от температуры максимальной активности полимеразы. В данном эксперименте используется Taq-полимераза при температуре 95°C. Продолжительность процедуры составляет 1 минуту.

Через некоторое количество последовательно идущих циклов денатурации, отжига и элонгации, происходит истощение количества реагентов, в связи с этим замедляется рост продуктов реакции.

Результат проведения ПЦР в реальном времени представляется в виде графиков и таблиц. На графиках прослеживается экспрессия искомого гена, а так же с какого именно цикла начинается амплификация участков ДНК. Данный параметр важен, так как является показателем исходного количества матрицы в растворе и эффективность амплификации выбранных участков ДНК. Эти же данные представляются в таблицах в числовом представлении.

Количественная ПЦР является способом, наиболее полно отражающим количество и экспрессию заданных участков ДНК.

По описанной методике проведения исследования поиска генов потенциально принимающих участие в формировании лекарственной резистентности клеток рака яичников, была проведена научно-исследовательская работа.

4 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКА УЧАСТИЯ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

4.1 Культивирование клеточных культур в двумерных условиях

Для проведения эксперимента использовались образцы клеток, полученные при биопсии рака яичников. Образцы были подверженные криоконсервации при температуре -196°C и находились на хранении с 19.07.2015 года пассажем 5. Клетки были разморожены и пересажены в питательные среды GlutaMAXTM DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)+10% Фетальной бычьей сыворотки (FBS). DMEM является стандартной клеточной культуральной средой, которая содержит стабилизированную форму L-глутамина, дипептида L-аланил-L-глутамина, который предотвращает накопление аммиака. Так же в своем составе содержит витамины, добавки, улучшающие рост клеток. Фетальная бычья сыворотка является дополнительным источником белков, углеводов, жиров, факторов роста, ингибиторов роста, витаминов, микроэлементов.

Для контроля над ростом клеток проводилось ежедневное наблюдение за образцами, замена питательной среды проводилась по мере необходимости.

4.2 Культивирование клеточных линий в трехмерных условиях

После того, как клеточные культуры OVCAR8 и OVCAR8/ADR в 2D условиях достигли показателей роста в процентном соотношении 80-85% был произведен перенос клеточных линий в 3D условия. Клеточная линия OVCAR8/ADR была высажена в дубликate, так как один из образцов необходим для создания культуры OVCAR8/ADR+Dox. Был использован САМА и питательная среда GlutaMAXTM DMEM, обедненная FBS.

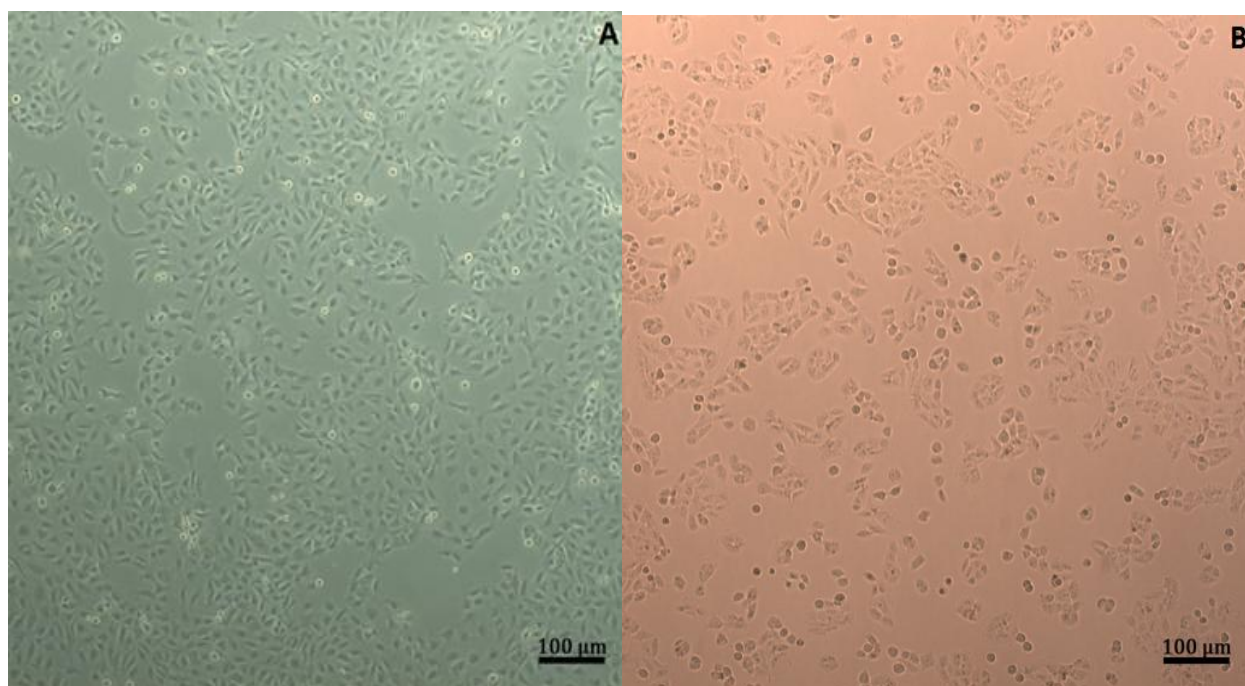


Рисунок 4.1 - Внешний вид клеточных линий OVCAR8 (A) и OVCAR8/ADR (B) в световом микроскопе в условиях 2D

На второй день расположения клеточных линий в матрице была произведена замена раствора питательной среды во всех образцах, а так же был добавлен доксорубицин (антрациклиновый антибиотик; противоопухолевое средство) в один из образцов OVCAR8/ADR для получения культуры OVCAR8/ADR+Dox. Наблюдение и контроль над ростом образцов производился на протяжении семи дней.

На рисунках 4.2-4.4 представлен рост клеток на 1, 3, 7 дни культивирования.

4.3 Изолирование экзосом из образцов клеточных линий

Алгоритм изолирования экзосом из клеточных линий OVCAR8, OVCAR8/ADR и OVCAR8/ADR+Dox осуществлялся в соответствие с протоколом изолирования экзосом из клеток, представленном на рисунке 4.5.

На первом этапе с помощью системы Megafuge 16R было проведено

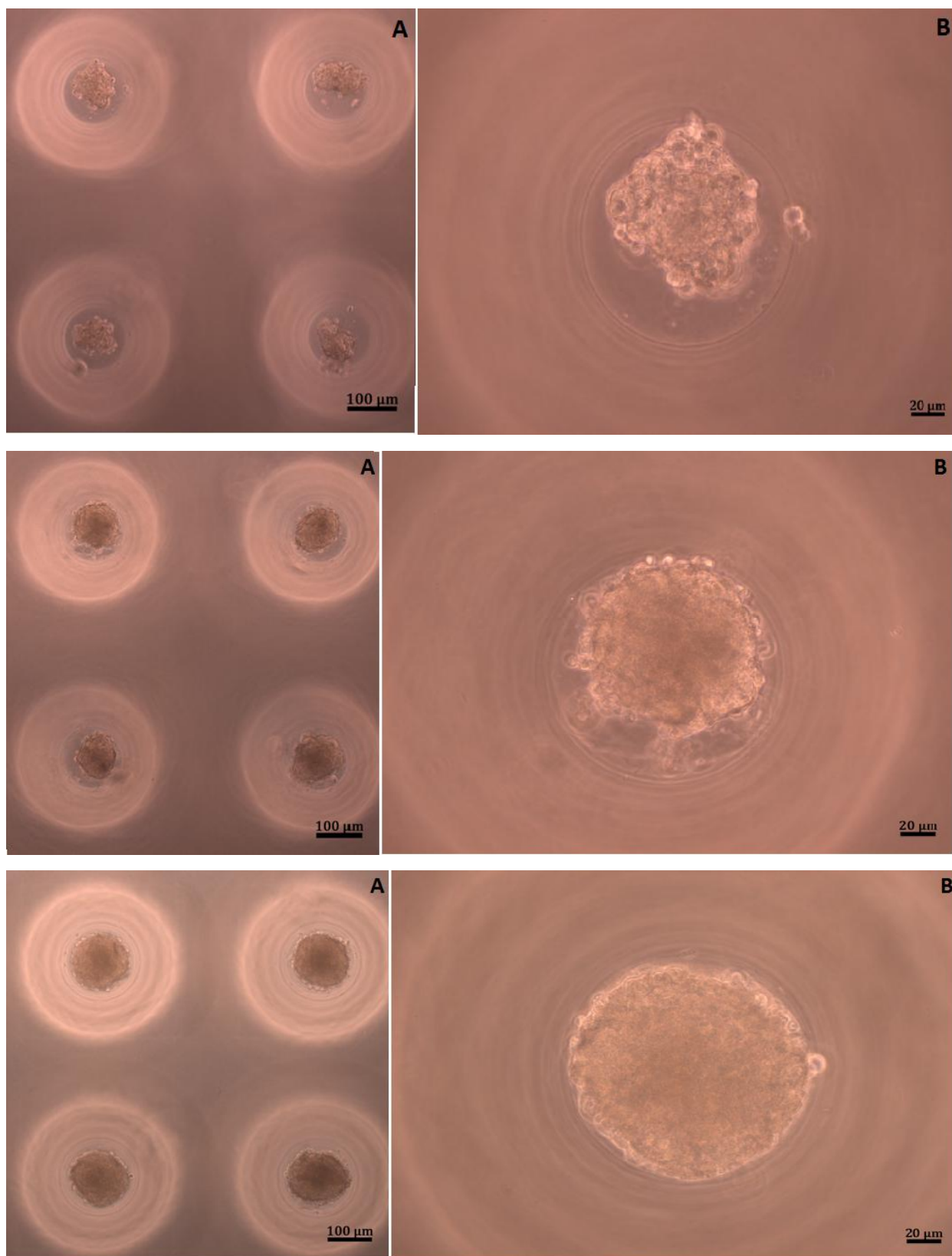


Рисунок 4.2 – Рост клеточной линии OVCAR8 в световой микроскоп на увеличении 5х (А) и 20х (В) на 1, 3, 7 день соответственно

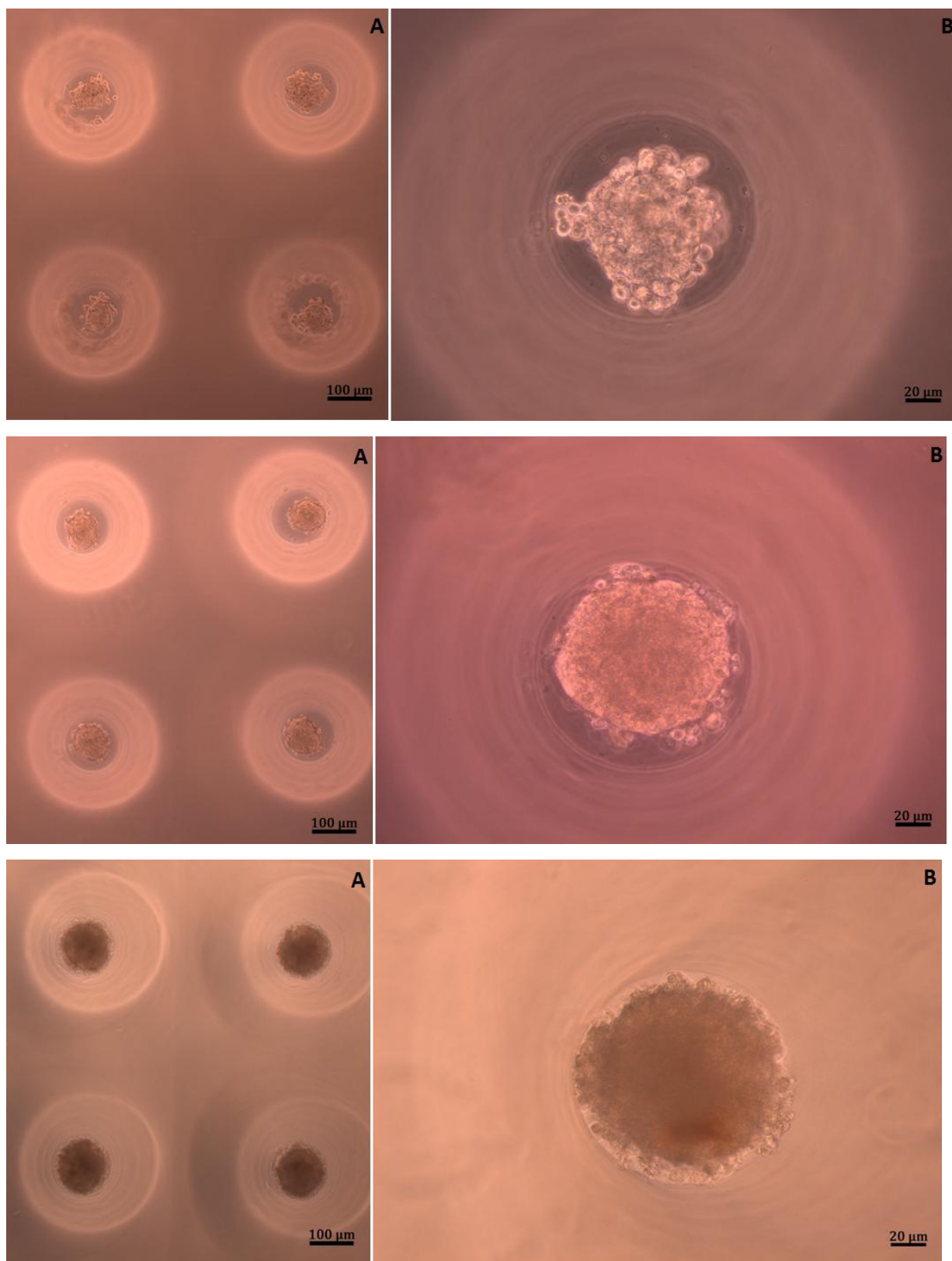


Рисунок 4.3 – Рост клеточной линии OVCAR8/ADR в световой микроскоп на увеличении 5х (А) и 20х (В) на 1, 3, 7 день соответственно

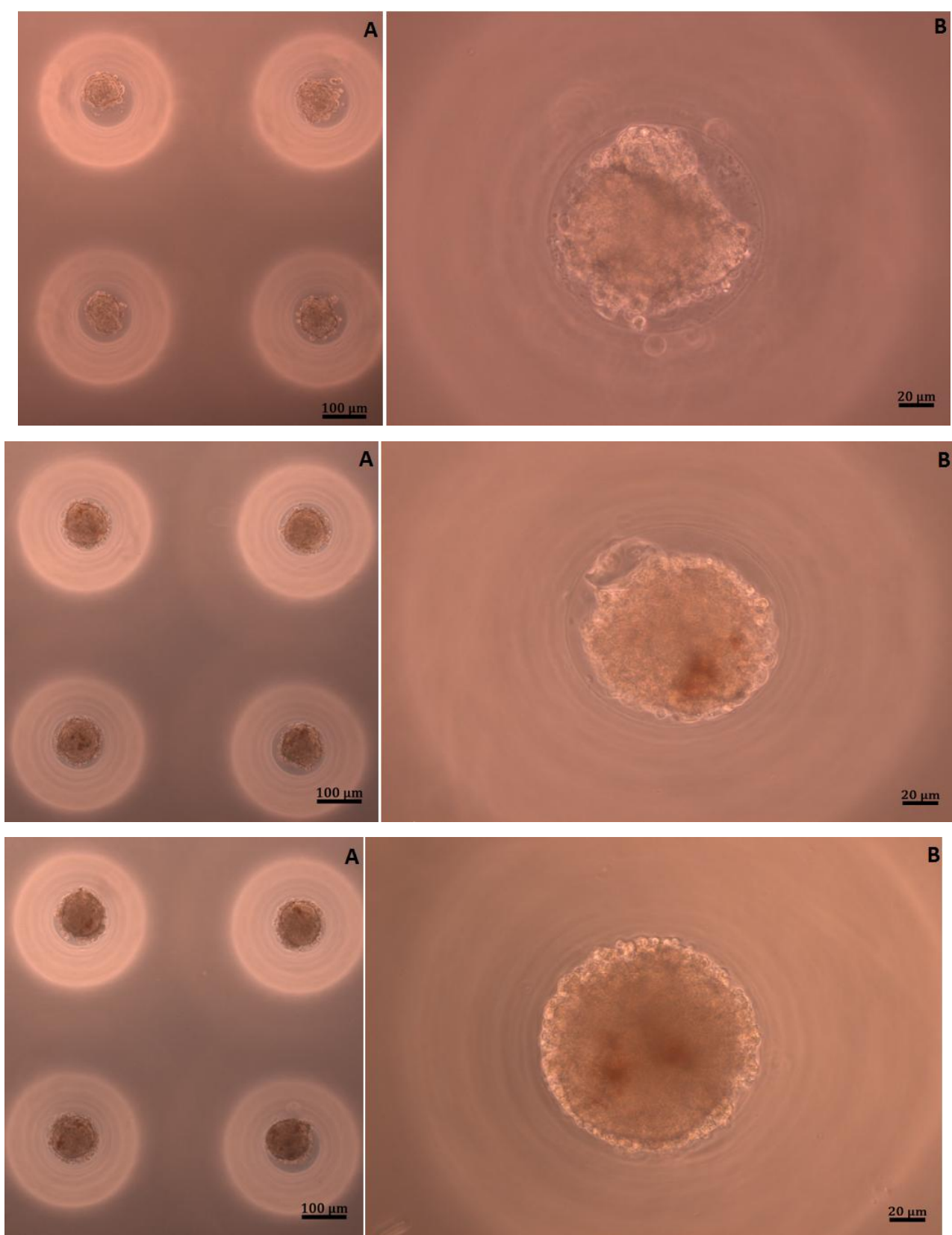


Рисунок 4.4 – Рост клеточной линии OVCAR8/ADR+Dox в световой микроскоп на увеличении 5х (А) и 20х (В) на 1, 3, 7 день соответственно

последовательное центрифугирование в режимах 500/800g в течение 2/10 минут и 2000g в течение 20 минут для удаления мертвых клеток и их обломков. Осадок после проведения центрифугирования был оставлен на хранение при температуре -80°C , надосадочная жидкость использовалась далее. С применением Avanti J-301 и параметрами 5000g в течение 45 минут была получена первая фракция экспериментальных образцов, условно названная EV5, включающая апоптозные тельца. Надосадочная жидкость была использована далее. С помощью центрифуги Avanti J-301 в режиме 12000g в течение 60 минут была получена вторая фракция экспериментальных образцов с условным названием EV12 и включающая эктосомы. На следующем этапе надосадочная жидкость после проведения последнего центрифугирования использовалась в ультрацентрифуге Optima LE-80K с параметрами 30000K и 32000K после чего образовалась фракция, условно названная EV120 и содержащая экзосомы.

Фракций EV5, EV12 и EV120 были доведены до финального объема 150 мл с помощью фосфатно-солевого буфера (PBS) и заморожены при температуре -80°C для дальнейших экспериментальных исследований.

4.4 Проведение подсчета количества экстрацеллюлярных везикул с помощью методов Анализа траектории наночастиц и Динамического рассеянного света

Для проведения исследования с помощью метода Анализа траектории наночастиц были использованы фракции EV5, EV12 и EV120. Образцы помещались в камеру системы Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) with ZetaView. Результат измерений представлялся в виде графиков и таблиц значений.

При проведении исследования с помощью метода Динамического рассеянного света так же были использованы фракции EV5, EV12 и EV120.

Образцы в объеме 20 мкл помещались на рабочую поверхность устройства 180° DLS Dynamic Light Scattering. Результат измерений представлялся в виде

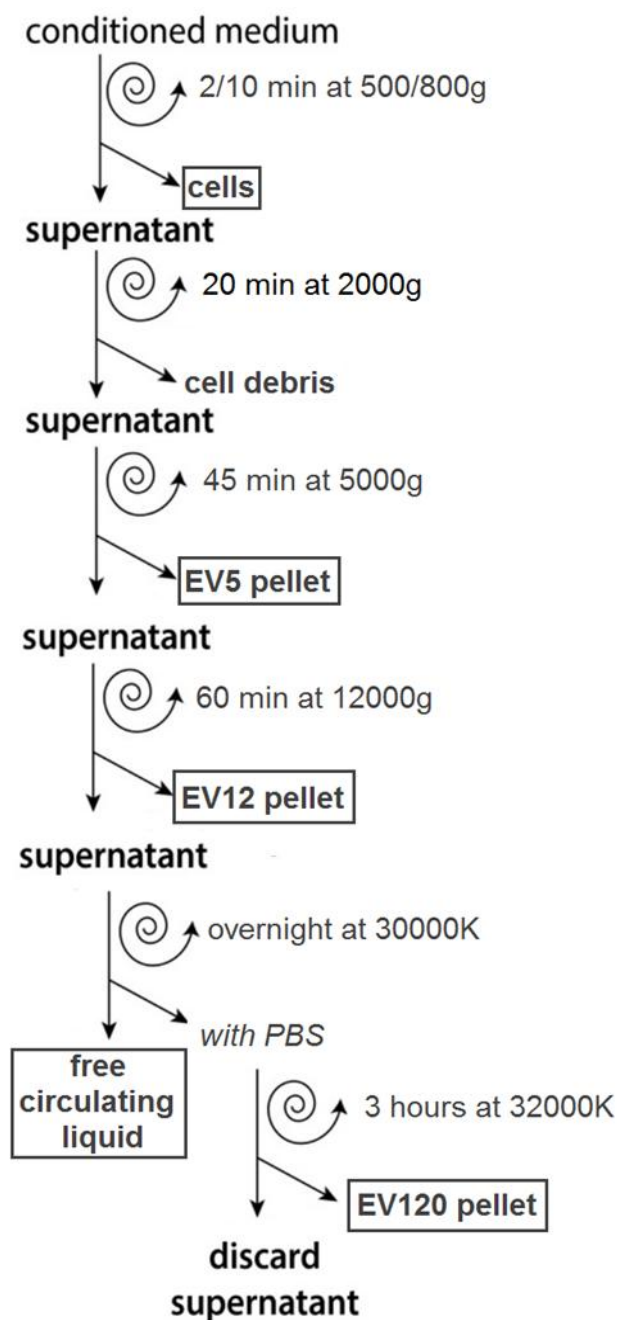


Рисунок 4.6 – Процесс изолирования экзосом

графиков и таблиц значений.

Примеры данных представлены в Приложении А.

По данным проведенных исследований было выяснено, что в соответствии с этапом центрифугирования происходит уменьшение размера частиц, а так же нарастание их концентрации от парентальных клеток к клеткам, обработанным доксорубицином.

4.5 Проведение изолирования мРНК из клеток и экзосом

Проведение изолирования мРНК из клеток и экзосом производится по одинаковым протоколам за исключением использования разных буферов, которые находятся в наборах.

На первом этапе производилось добавление расчетного количества лизирующих буферов, меркаптоэтанола и 95-100% этанола в колонку для изолирования. Полученный раствор отправлялся на центрифугирование. Если за один этап центрифугирования всю взвесь поместить в колонку не удавалось, процесс повторялся два раза. Жидкость после центрифугирования удалялась, осадок оставался на фильтре колонки, на который далее добавлялся буфер RW1 при изолировании из клеток и Wash Solution A при изолировании из экзосом. Затем снова проходил этап центрифугирования. Данный этап было необходимо повторить три раза. Далее колонки просушивались для удаления остатков растворов с помощью центрифугирования на максимальной скорости. Затем колонки сменялись на новые. Внутри были помещены буферы для клеток и экзосом RPE и Elution Solution A соответственно. Произведено центрифугирование в количестве двух раз.

После завершения последнего этапа центрифугирования мРНК, осажденные в раствор после промывания фильтров, были подвержены криоконсервации при температуре -80°C .

4.6 Подсчет количества мРНК

Для проведения исследования использовались образцы изолированной мРНК из клеток и EV5, EV12 и EV120.

Образец раствора с содержанием мРНК был применен в объеме 2 мкл. В процессе исследования раствор помещался на конец волоконно-оптического кабеля (принимающего волокна). Второй волоконно-оптический кабель (исходное волокно) приводился в контакт с образцом таким образом, что между исходным и принимающим волокном содержался только раствор. Импульсная ксеноновая лампа в данном случае служит источником света, а спектрометр используется для анализа света после прохождения его через образец. Устройство производит подсчет количества мРНК в нанограммах в одном микролитре.

В таблицах 4.1 и 4.2 представлено количественное содержание мРНК в исследуемых образцах.

4.7 Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией

Так как компьютерная ПЦР (ПЦР в реальном времени) проводится непосредственно с цепочкой ДНК, было необходимо синтезировать комплементарную ДНК на матрице имеющейся мРНК. Для этой цели выполнялся протокол проведения ПЦР с обратной транскрипцией.

4.7.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Для выполнения протокола на первом этапе было необходимым построить первую комплементарную цепь, в которой азотистое основание урацил, характерное для РНК, будет заменено на азотистое основание тимин, присутствующее в ДНК. Был произведен расчет необходимого количества реагентов Oligo dT и воды без нуклеаз в зависимости от концентрации мРНК

Таблица 4.1 – Концентрация
мРНК, изолированной из клеток
линий OVCAR8,
OVCAR8/ADR и
OVCAR8/ADR+Dox

мРНК клеток
Концентрация, нг/мкл
OVCAR-8
53.8
OVCAR-8/ADR
112.3
OVCAR-8/ADR + Dox
96.7

Таблица 4.2 – Концентрация
мРНК, изолированной из экзосом
клеточных линий OVCAR8,
OVCAR8/ADR и
OVCAR8/ADR+Dox

мРНК внеклеточных везикул		
EV5, нг/мкл	EV12, нг/мкл	EV120, нг/мкл
OVCAR-8		
16.9	14.1	17.7
OVCAR-8/ADR		
6	5.4	3.6
OVCAR-8/ADR + Dox		
6.8	11	12.8

для каждой из клеточных линий. Объем конечного раствора составил 15 мкл. Данный раствор был отправлен в Bio Rad T100 Thermal cycler на 5 минут при температуре 70°C.

Следующим этапом было приготовление Мастер микса, включающего расчётное количество реагентов M-MLV 5x Reaction Buffer, dNTP, RiboLock, M-MLV RT. Полученный Мастер микс в объеме 10 мкл был добавлен к раствору с первой комплементарной цепочкой ДНК.

Финальный объем образцов составил 25 мкл. Экспериментальные образцы были отправлены в систему Bio Rad T100 Thermal cycler на 60 минут и температурном режиме 42°C.

4.7.2 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для выполнения протокола проведения компьютерной ПЦР так же необходимо приготовление расчетного количества Мастер микса, который включает буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты, ДНК-полимеразу, флуоресцентный краситель, прямой и обратный праймеры, воду без нуклеаз, а так же комплементарную ДНК. В данном эксперименте был использован Мастер микс SYBR Green Select Master Mix, который является готовой смесью из буфера, дезоксинуклеотидтрифосфатов, ДНК-полимеразы и собственно красителя SYBR Green.

В специализированные пробирки для проведения компьютерной ПЦР было добавлено 10 мкл SYBR Green Select Master Mix. Следующим шагом было добавление в каждую из пробирок по 0,5 мкл прямого и обратного праймера в зависимости от того, экспрессию какого гена необходимо отследить. Затем в полученный раствор было добавлено 0,9 мкл комплементарной ДНК. Финальный объем содержащегося в пробирках раствора составлял 19,9 мкл. Для лучшего совмещения реакционной смеси было проведено центрифугирование на скорости 800g в течение 5-8 секунд.

Реакционная смесь была установлена в Bio Rad MyiQ. Протокол проведения реакции включал 40 циклов, каждый из которых состоял из этапов денатурации ДНК при температуре 95°C в течение 15 секунд, отжига праймеров при температуре 61 °C в течение 1 минуты, элонгации при температуре 95 °C в течение 1 минуты.

По данной технологии была проведена ПЦР в реальном времени с образцами комплементарной ДНК, синтезированной на матрице мРНК клеток и экзосом клеточных линий OVCAR8, OVCAR8/ADR и OVCAR8/ADR+Dox.

После проведения эксперимента были получены результаты в виде таблиц и графиков, по данным которых были составлены диаграммы, представленные на рисунке 4.7 и 4.8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения работы было выяснено, что высокая смертность от рака яичников связана, прежде всего, с поздней диагностируемостью заболевания. А так же с тем, что применяемая терапия не всегда эффективна из-за формирования устойчивости к лекарственной терапии клеток рака яичников.

Были изучены существующие способы диагностики резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников. По анализируемым данным было выяснено, что имеющиеся тесты не позволяют быстро и точно определять наличие или отсутствие устойчивости к терапии, не достаточно достоверны, являются довольно дорогостоящими на сегодняшний день, а так же не до конца изучены.

Была разработана методика поиска генов, потенциально участвующих в формировании резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников.

По описанной в работе методике было проведено экспериментальное исследование, в ходе которого были выявлены высокие экспрессии генов TMSB4X, RPL30, RPS24, ANP32B, RPL6, последовательности которых заключены в мРНК клеток и экзосом.

В процессе изучения функций данных генов было выяснено, что гены участвуют в пролиферации, клеточной дифференцировке, работают, как фактор выживаемости клеток, а так же являются рибосомальными белками - участвуют в синтезе белка. Следовательно, можно сделать вывод о том, что найденные гены потенциально могут принимать участие в формировании лекарственной резистентности клеток рака яичника.

Полученные схожие результаты в исследовании экспрессий генов TMSB4X и ANP32B в клетках и экзосомах подтверждают факт, что экзосомы несут в себе генетический состав клеток-родителей, а, следовательно, являясь переносчиком генетической информации между тканями организма, могут быть использованы для исследований механизмов лекарственной резистентности клеток рака яичников.

Описанная в данной работе методика может применяться для геномной оценки наличия или отсутствия резистентности к лекарственной терапии клеток рака яичников.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Chan AW, Song F, Vickers A, Jefferson T, Dickersin K, Gøtzsche PC, et al. Increasing value and reducing waste: addressing inaccessible research. *Lancet*. 2014; 383(9913):257–66;
2. Злокачественные новообразования в России в 2000 году (заболеваемость и смертность)/Под ред. акад. В.И. Чиссова, проф. В.В. Старинского. – М. 2002: 264с.;
3. Саранцева О.С. Первичная и приобретенная химиорезистентность клеток рака яичников к цитостатикам разных классов: дис. канд. биолог. наук. Мос. науч.-исслед. онк. инст. им. П.А. Герцена, Москва, 2001;
4. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K. et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*, 1997;15(5):537-547;
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11–30;
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5–29;
7. Yang D, Sun Y, Hu L, et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(2):186–199;
8. McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*. 2011;43(5):420–432;
9. Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun*. 2014;5:3156;
10. International Agency for Research on Cancer. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 117* (link is external). Accessed January 2017;

11. Brinton L, Marchbanks P, Negri E, et al. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28,114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies (link is external). *LancetOncol*. 2012;13(9):946-56;
12. Faber MT, Kjær SK, Dehlendorff C, et al. Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: a pooled analysis of 21 case-control studies (link is external). *CancerCausesControl*. 2013;24(5):989-1004;
13. Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Fruits and vegetables and ovarian cancer risk in a pooled analysis of 12 cohort studies (link is external). *CancerEpidemiolBiomarkersPrev*. 2005; 14(9):2160-7;
14. Han B, Li X, Yu T. Cruciferous vegetables consumption and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies (link is external). *DiagnPathol*.2014;9:7;
15. International Agency for Research on Cancer. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 105* (link is external). AccessedDecember 2014;
16. Beral V, Million Women Study Collaborators, Bull D, et al. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study (link is external). *Lancet*. 2007; 369(9574):1703-10;
17. Schonfeld SJ, Berrington de Gonzalez A, Visvanathan K, et al. Declining second primary ovarian cancer after first primary breast cancer (link is external). *J ClinOncol*. 2013;31(6):738-43;
18. Schaapveld M, Visser O, Louwman MJ, et al. Risk of new primary nonbreast cancers after breast cancer treatment: a Dutch population-based study (link is external). *J ClinOncol*. 2008;26(8):1239-46;
19. Kelderman S, Ton N.M. Schumacher, John B.A.G. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. 2014; 8(6): 1132–1139;
20. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. 2014; 6(3): 1769–1792; Schonfeld SJ, Berrington de Gonzalez A, Visvanathan K, et al. Declining second primary ovarian

- cancer after first primary breast cancer (link is external). *J Clin Oncol*. 2013;31(6):738-43;
21. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, Silva EG. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:496–504;
22. I.Yu. Davydova, V.V. Kuznetsov, A.I. Karseladze, L.A. Meshcheryakova. N.N. Blokhin. Borderline ovarian tumors: a modern view of the problem // Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow. 2015;3:72-75;
23. Kathleen R. Cho, Ie-Ming Shih. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 287–313;
24. Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment. Patient Version. PDQ Adult Treatment Editorial Board. February. 2018;
25. Seoung JPY, Rhim C, Kim S. Current possible drug therapies for ovarian cancer. *J Cancer Ther*. 2014;5(13):1203–1214;
26. S.V. Boychuk, B.R. Ramazanov. DNA repair system defects – role in oncogenesis and cancer therapy // Kazan State Medical University, Kazan, Russia. – 2014. – Т. 3. – С. 307-314;
27. Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs // *Curr. Med. Chem.* — 2000. — Vol. 7, N 1. — P. 39–58;
28. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // *Nature*. — 2005. — Vol. 434. — P. 913–917;
29. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Schultz RA. DNA repair and mutagenesis. 2nd ed. — ASM Press, Washington, DC, 2006. — 1118 p;
30. Колядина И.В., Поддубная И.В. Иммунобиология рака молочной железы: теории и перспективы (обзор). *Современная онкология*. 2015; 1:12-18;
31. Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 2013;13:1554–1571;
32. Tanneberger St: Gewebekultur und Krebschemotherapie. *Arch Geschwulstforsch*. 1968; 31: 387-400;

33. Weisenthal LM: Fresh-tumor, cell-culture assays for breast cancer. In: Dickson RB, Lippman ME, eds. *Drug and Hormonal Resistance in Breast Cancer*. New York: Ellis Horwood, 1995: 323-349;
34. Larson SM, Schwartz LH: 18F-FDG PET as a candidate for “qualified biomarker”: Functional assessment of treatment response in oncology. *J Nucl Med*. 2006; 47: 901-903;
35. Weber W. Assessing tumor response to therapy. *J Nucl Med*. 2009; 50: 1S-10S;
36. Chang DZ, Kumar V, Ma Y, Li K, Kopetz S: Individualized therapies in colorectal cancers: KRAS as a marker for response to EGFR-targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2009; 2: 18;
37. Volm M, Rittgen W: Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer. *Anticancer Research* 2000; 20: 3449-3458;
38. Yang N, Kaur S, Volinia S, Greshock J, Lassus H, Hasegawa K: Micro RNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 2008; 68: 10307-14;
39. Nawaz M, Fatima F, Nazarenko I, Ekström K, Murtaza I, Anees M, Sultan A, Neder L, Camussi G, Valadi H, Jeremy A. Squire & Thomas Kislinger (2016) Extracellular vesicles in ovarian cancer: applications to tumor biology, immunotherapy and biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13(4):395-409;
40. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol.* 2007; 9: 654–659;
41. Doxakis E. Principles of miRNA-Target Regulation in Metazoan Models. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:16280–16302;
42. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, et al., Belting M. Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 2013;288:17713–17724;

43. Young Hwa Soung, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)*. 2017;9(1): 8;
44. Hodgkinson VC, Eagle GL, Drew PJ, Lind MY, Cawkwell L: Biomarkers of chemotherapy resistance in breast cancer identified by proteomics: Current status. *Cancer Letters*. 2010; 294: 13-24;
45. Yamada KM, Cucieman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D // *Cell*.– 2007.– Vol. 130.– P. 601-614;
46. Thomsen AR, Aldrian C, Bronsert P, Thomann Y, Nanko N, Melin N, Rücker G, Follo M, Grosu AL, Niedermann G, Layer PG, Heslich A, Lund PG. A deep conical agarose microwell array for adhesion independent three-dimensional cell culture and dynamic volume measurement. *Lab Chip*. 2018;18:179–189.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты анализа траектории наночастиц и динамического рассеяния света клеточной культуры OVCAR8

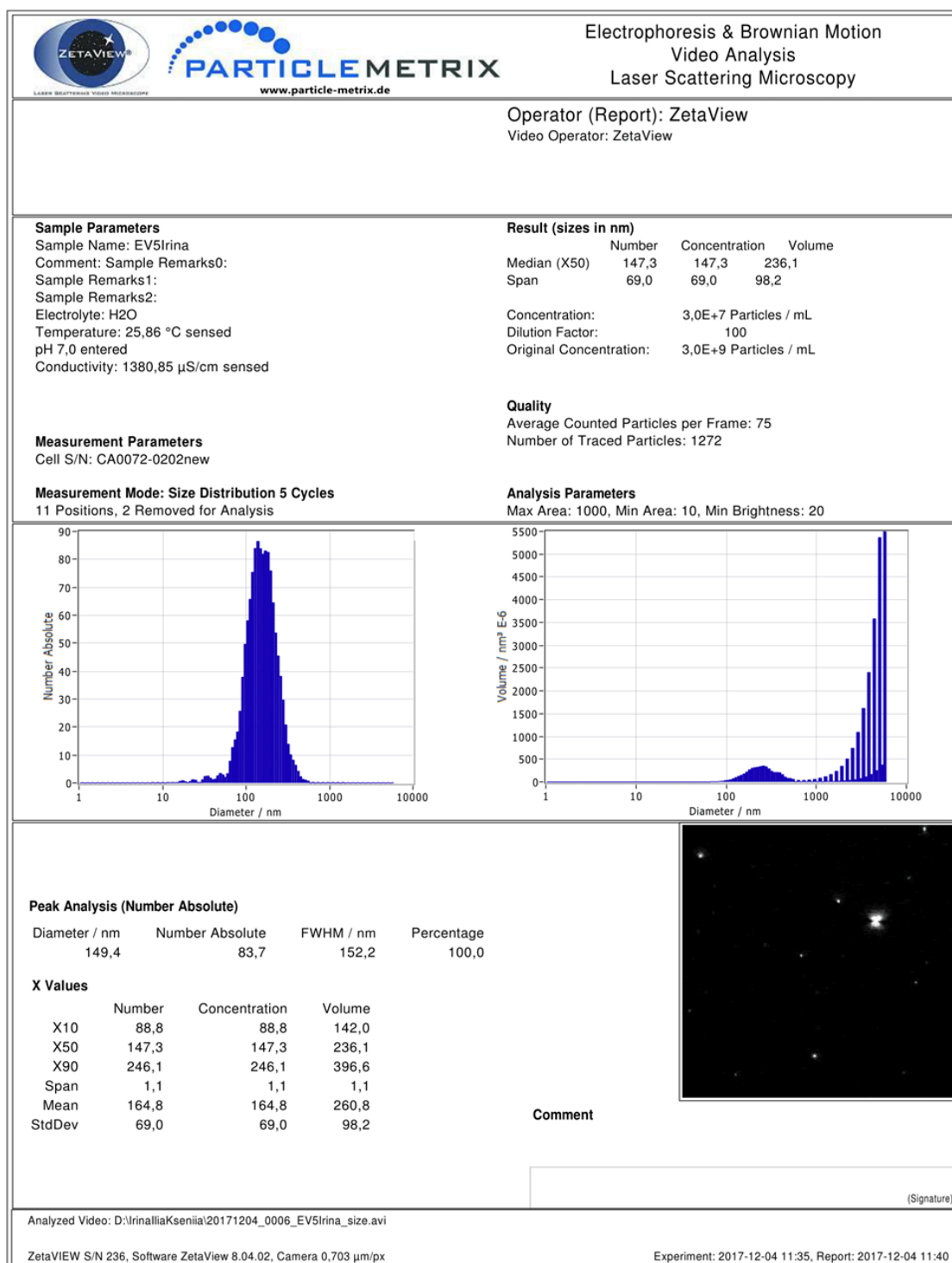


Рисунок А1 - Результат анализа траектории наночастиц
клеточной культуры OVCAR8

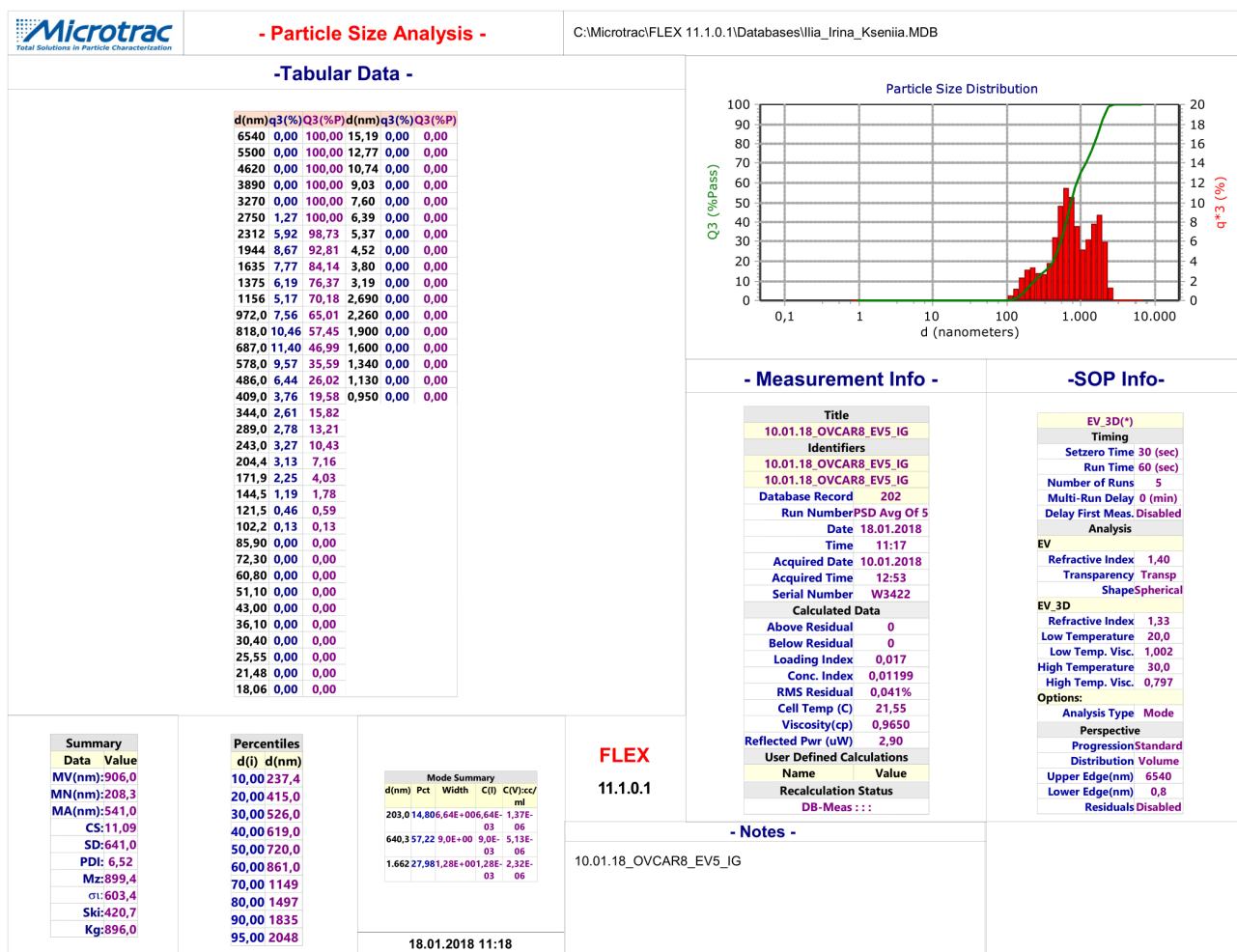


Рисунок А2 - Результат анализа динамического рассеяния света
клеточной культуры OVCAR8