

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Мелехин Всеволод Викторович

**МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ
ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Макеев Олег Германович

Екатеринбург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Актуальность разработки новых методов диагностики и лечения онкопатологии	14
1.2 Патологическая физиология онкопатологии	15
1.3 Иммуноterapia в онкологии	17
1.4 Протоонкогены и гены-супрессоры опухолевого роста	20
1.5 Ген <i>KLOTHO</i> и продукты его экспрессии	24
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Культуры клеток и их культивирование.....	37
2.2 Генетические конструкции: экстракция ДНК, качественный и количественный ПЦР-анализ.....	39
2.3 Секвенирование.....	40
2.4 Трансфекция	42
2.5 Контроль гиперэкспрессии	43
2.6 Кривые роста и подсчет количества клеток.....	44
2.7 МТТ-тест	47
2.8 Оценка интенсивности восстановления окисленной формы резазурина	49
2.9 Определение активности внутриклеточной лактатдегидрогена	49
2.10 Оценка интенсивности синтеза ДНК	51
2.11 Оценка активности ферментов семейства каспаз.....	52
2.12 Статистическая обработка данных.....	53
2.13 Этические вопросы	53

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ ЛИНИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ РАБДОМИОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА	55
3.1 Исследование кривых роста клеток линии Rd	55
3.2 Оценка результатов МТТ-теста	57
3.3 Оценка интенсивности биоредукции резазурина клетками Rd	59
3.4 Исследование общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в клетках линии Rd.....	61
3.5 Оценка интенсивности синтеза ДНК в клетках линии Rd.....	62
3.6 Оценка активности апоптотических процессов.....	63
3.7 Заключение	64
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ ЛИНИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА.	71
4.1 Исследование кривых роста клеток линии A-172	71
4.2 Оценка результатов МТТ-теста	73
4.3 Оценка интенсивности биоредукции резазурина клетками A-172.....	74
4.4 Исследование общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в клетках линии A-172	75
4.5 Оценка интенсивности синтеза ДНК в клетках линии A-172	76
4.6 Оценка активности апоптотических процессов.....	77
4.7 Заключение	78
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ ЛИНИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА	84
5.1 Исследование кривых роста клеток линии Caco-2	84
5.2 Оценка результатов МТТ-теста	86

5.3 Оценка интенсивности биоредукции резазурина клетками Caco-2.....	88
5.4 Исследование общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в клетках линии Caco-2.....	89
5.5 Оценка интенсивности синтеза ДНК в клетках линии Caco-2.....	90
5.6 Оценка активности апоптотических процессов.....	92
5.7 Заключение	93

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ

ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА ВЫДЕЛЕННЫЕ

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА 100

6.1 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-1 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	101
6.2 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-2 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	102
6.3 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-3 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	103
6.4 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-4 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	105
6.5 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-5 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	106
6.6 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-6 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	108
6.7 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-7 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	109
6.8 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-8 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	111
6.9 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-9 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	112
6.10 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-10 под действием индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы Klotho	113

6.11 Заключение	115
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	129

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – антиген

АФК – активные формы кислорода

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПФР – инсулин-подобный фактор роста

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)

ОП – оптическая плотность

пДНК – плазмидная ДНК

п.о. – пары оснований

ПОЛ – перикисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СОД-2 – супероксиддисмутаза

УФ – ультрафиолет

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ABL1 – abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

APC – ген, мутации которого являются причиной наследственного аденоматоза кишечника (adenomatous polyposis coli)

BAX – Bcl-2-like protein 4

BCL-2 – B-cell lymphoma 2

BH – консервативные белковые домены Bcl homology

BRCA1 – breast cancer type 1 susceptibility protein

BRCA2 – breast cancer type 2 susceptibility protein

CTNNB – белки семейства β -катенин

ddH₂O – вода двойной дистилляции

DLBCL – диффузная крупно В-клеточная лимфома

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DPBS – Dulbecco's phosphate buffered saline

FGF – fibroblast growth factors

HCC – hepatocellular carcinoma

IGF-1 – insulin-like growth factor 1

IGF-1R – рецептор инсулин-подобного фактора роста

KL – ген *KLOTNO*

KL1 – участок внутреннего повтора белка KLOTNO

KL2 – участок внутреннего повтора белка KLOTNO

KL-CV – функциональный вариант секретируемой формы белка KLOTNO

LEF – lymphoid enhancer factors

miR – микро-РНК

MMP – matrix metalloproteinases

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NSCLC – non-small cells lung cancer

qPSR – quantitative PCR

RT-qPCR – reverse transcriptase quantitative PCR

TCF – T-cell factor

ВВЕДЕНИЕ

В 2017 г. в России впервые выявлено более 540 тысяч пациентов онкологического профиля. Заболевания онкологического профиля стали причиной более 290 тысяч летальных исходов, что составляет 15.9% в общей структуре смертности, а онкологические заболевания занимают 2-е место в структуре смертности населения России. К концу 2017 г. на учете в онкологических учреждениях России состояло более 3.63 млн пациентов, что более чем на 111 тыс. превышает аналогичный показатель 2016 г. Показатель заболеваемости в 2017 г. составил 420.3 на 100 тыс. населения, что обусловило прирост заболеваемости за 10-летний период на 22.9% [2]. Данная ситуация отражает общемировую тенденцию, так как онкопатология прочно занимает лидирующие позиции в структуре смертности большинства стран [17, 95].

Высокая распространенность и социальная значимость онкологических заболеваний обуславливает крайнюю актуальность поиска новых подходов к диагностике и лечению онкозаболеваний. Это находит свое отражение в научно-исследовательских базах данных. На состояние 16-го апреля 2019 г. в международной базе ClinicalTrials.gov зарегистрировано более 75 тысяч клинических исследований, определяемых по ключевому слову «Cancer».

Разработка новых способов борьбы с онкопатологией имеет разнонаправленный характер. Несомненно, большое значение имеет профилактика возникновения онкологических заболеваний [37]. Однако снижение заболеваемости в данном сегменте не приближает нас к решению проблематики лечения пациентов данного профиля.

В то же время, в сфере разработки новых методов лечения опухолевых заболеваний обращает на себя внимание комплекс подходов, направленных на усиление иммунного ответа на злокачественно трансформированные клетки. Различные подходы к иммунотерапии демонстрируют высокую

противоопухолевую активность [4, 5, 32, 90], однако результаты клинических исследований в данной области свидетельствуют о существенном вкладе токсичности разрабатываемых средств в тяжелые побочные реакции, вплоть до летального исхода, у подвергшихся терапии пациентов [61, 74, 76].

Генетическая обусловленность механизмов развития онкопатологии, являющихся следствием нестабильности генома, становится предпосылкой к исследованию возможностей применения генетической коррекции в лечении онкопатологии. При этом перспективными мишенями для таргетной терапии являются протоонкогены, гены супрессоры опухолевого роста, а также внутриклеточные сигнальные пути, задействованные в реализации эффектов данных генов. К наиболее известным направлениям можно отнести способы коррекции функциональной активности TP53 [33, 42, 51, 60], белков BCL2 и BAX [26, 63, 93], канонической сигнальной связи WNT [102, 120]. Однако при высокой перспективности применения для лечения некоторых онкозаболеваний, разрабатываемые методы могут быть охарактеризованы как избирательные, повышение активности данных сигнальных систем может проводить к неблагоприятным последствиям в нормальных клетках и тканях [56, 63, 86].

В связи с этим, представляется актуальным исследование механизмов противоопухолевого действия гена *KLOTHO* (*KL*) [57]. Обладая потенциалом гена супрессора опухолевого роста [18, 23, 87, 114, 117], для *KL* не только не выявлено патологического влияния на нормальные клетки [15, 20, 22], но и показано, что гиперэкспрессия гена *KL* способна существенно повышать продолжительность жизни животных [59]. Однако, на сегодняшний день, влияние *KL* на клетки при многих онкологических заболеваниях остается противоречивым или вовсе не исследованным.

Цель исследования – изучить противоопухолевое действие гиперэкспрессии гена *KL* и выявить его механизмы.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* на жизнеспособность и характеристики роста культивируемых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека;
2. Оценить влияние индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* на жизнеспособность и характеристики роста культивируемых клеток глиобластомы человека;
3. Изучить влияние индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* на жизнеспособность и характеристики роста культивируемых клеток рака ободочной кишки человека;
4. Исследовать влияние гиперэкспрессии гена *KL* на клиническом материале – клетках глиобластомы, выделенных из операционного материала.

Научная новизна. Впервые показан эффект противоопухолевого действия гиперэкспрессии гена *KL* на культивируемые клетки эмбриональной рабдомиосаркомы человека, глиобластомы человека, а также культивируемые клетки рака ободочной кишки человека. Впервые был показан противоопухолевый эффект гиперэкспрессии гена *KL* на клетки глиобластомы человека на клиническом материале. В работе впервые исследуется влияние *KL* на напряженность окислительно-восстановительных реакций в опухолевых клетках. Впервые проведена оценка интенсивности синтеза ДНК в опухолевых клетках в условиях гиперэкспрессии гена *KL*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана и обоснована концепция применения гиперэкспрессии гена *KL* для ингибирования роста культивируемых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы, глиобластомы и рака ободочной кишки человека.

Показано, что индуцированная гиперэкспрессия гена *KL* подавляет активность окислительно-восстановительных процессов, а также ингибирует интенсивность синтеза ДНК и обладает апоптогенным действием в клетках эмбриональной рабдомиосаркомы и глиобластомы человека. Предложена обобщенная гипотеза механизмов противоопухолевого действия гиперэкспрессии гена *KL*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что индуцированная гиперэкспрессия секретируемой формы *KL* может быть использована как перспективный подход к разработке новых методов лечения онкопатологии.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 70-й Всероссийской юбилейной научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2015 г.); 2-м Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, 2015 г.); I Международной (71-й Всероссийской) научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2016 г.); XV юбилейной Всероссийской научно-практической конференции «Поленовские чтения» (г. Санкт-Петербург, 2016 г.); II Международной (72-й Всероссийской) научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2017 г.); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (г. Екатеринбург, 2018 г.); Всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий» (г. Санкт-Петербург, 2018 г.); IV Международной научно-практической конференции

молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», посвященной 100-летию со дня рождения ректора Свердловского государственного медицинского института, профессора Василия Николаевича Климова (г. Екатеринбург, 2019 г.).

Публикации: по теме диссертации опубликовано 19 работ. Из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК 4, в том числе 2 в зарубежных журналах.

Продукты интеллектуальной собственности: по теме диссертации отправлена заявка на патент на изобретение РФ (№2019115534, приоритет от 21.05.2019, название: «Способ ингибирования роста опухолевых клеток»).

На защиту выносятся следующие положения:

1. Гиперэкспрессия гена *KL* подавляет жизнеспособность и пролиферативную активность культивируемых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека;
2. Ген *KL* подавляет жизнеспособность и пролиферативную активность культивируемых клеток глиобластомы человека;
3. Гиперэкспрессия гена *KL* способна инициировать кратковременный эффект ингибирования жизнеспособности и пролиферативной активности клеток рака ободочной кишки человека;
4. Индуцированная гиперэкспрессия *KL* подавляет жизнеспособность культивируемых клеток глиобластомы человека, выделенных из операционного материала пациентов;
5. Противоопухолевое действие гиперэкспрессии гена *KL* сопряжено с влиянием на напряженность окислительно-восстановительных процессов, интенсивность синтеза ДНК и активность апоптотических процессов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах и состоит из введения, 6 глав, общего заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 28 таблицами, 16 рисунками. Список литературы включает 122 источника, из которых 7 отечественных и 115 зарубежных.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность разработки новых методов диагностики и лечения онкопатологии

По данным Московского научно-исследовательского института им. П. А. Герцена, в России в 2017 г. впервые выявлено более 540 тысяч пациентов онкологического профиля. Онкопатология стала причиной более 290 тысяч летальных исходов, что составляет 15.9% в общей структуре смертности. Тем самым, онкологические заболевания занимают 2-е место в структуре смертности населения России, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. К концу 2017 г. на учете в онкологических учреждениях России состояло более 3.63 млн пациентов, что более чем на 111 тыс. превышает аналогичный показатель 2016 г. Показатель заболеваемости в России составил 420.3 на 100 тыс. населения, что обусловило прирост заболеваемости за 10-летний период на 22.9% [2].

Данная ситуация отражает общемировую тенденцию: в большинстве развитых и развивающихся стран мира онкопатология является одной из лидирующих причин смертности. При этом в странах центральной и западной Европы, Скандинавии, США, Японии, Австралии и пр. онкологические заболевания занимают первое место в структуре причин смертности [17]. По прогнозам, в США в 2019 г. ожидается более 1.76 млн новых случаев рака и более 606 тыс. летальных исходов по причине онкопатологии. Однако в США, как и в некоторых других развитых странах (в отличие от РФ) ежегодно регистрируется стабилизированное либо снижающееся состояние заболеваемости и снижение смертности на 1.4-1.8%. В целом, в интервале 1991-2016 гг. в США показатель смертности снизился на 27% [95].

Такая положительная динамика может быть связана, с одной стороны, с повышением эффективности профилактических мероприятий, направленных на борьбу с заболеваниями данного сегмента. Стоит отметить, что в настоящее время продолжается активная разработка новых способов профилактики [37]. С другой стороны, немаловажный вклад вносит введение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения, которые позволяют раньше выявлять заболевание и значимым образом повышать эффективность применяемых лечебных подходов.

В виду высокой распространенности и социальной значимости, интенсивность исследований по разработке новых способов борьбы с онкопатологией приобрела беспрецедентный характер. Так, в международной базе ClinicalTrials.gov, на 16 апреля 2019 г., зарегистрировано 75644 клинических исследований, определяемых по ключевому слову «Cancer».

В совокупности, представленные данные свидетельствуют о высокой актуальности разработки новых подходов в сфере онкологии во всем мире и в России, в частности.

1.2 Патологическая физиология онкопатологии

В основе злокачественного перерождения клеток лежат характерные генетические изменения, часто представляющие собой целый комплекс последовательных мутаций, затрагивающих протоонкогены и гены супрессоры опухолевого роста. Первоначальные генетические изменения касаются только одной клетки, которая получает способность к неконтролируемому росту. Тем самым, вся масса клеток опухоли является моноклональным образованием [3].

Несмотря на то, что онкопатология имеет крайне высокую вариабельность, обусловленную, во-первых, различным происхождением

клеток, тканей и органов, вовлекаемых в процесс и, во-вторых, различиями в генотипических и фенотипических изменениях опухолевых клеток. Выделяют и ряд общих фундаментальных биологических характеристик, свойственных для любого злокачественного онкопатологического заболевания. К таковым можно отнести генетическую нестабильность, повышенную пролиферативную активность опухолевых клеток, угнетение процессов роста и дифференцировки интактных клеток, потерю структурной организации ткани, повышенную интенсивность ангиогенеза, инвазионный характер роста и способность к метастазированию [3].

Типовые изменения также характеризуют и фенотипические признаки клеток, выявляемые при культивировании. В культуре злокачественно перерожденных клеток могут наблюдаться: отсутствие контактного торможения, низкая требовательность к ростовым факторам, сниженная потребность в субстрате для прикрепления и неограниченная способность к пролиферации [3].

Типовые изменения обменных процессов в опухолевых клетках неразрывно связаны с некоторыми особенностями развития опухоли. Первичная опухоль достигает в диаметре лишь 0.1-0.2 мм и на неопределенное время стабилизируется в таком состоянии. Это связано с тем, что на данном этапе рост количества опухолевых клеток не сопровождается повышением активности микроциркуляторного русла. Тем самым, развитие опухоли ограничивается барьером субстратного дефицита в питательных веществах и кислорода, в результате этого процессы клеточного деления уравниваются их гибелью. Данная фаза опухолевого развития может продолжаться неограниченный срок. Однако на данном этапе генетически нестабильные клетки приобретают новые генотипические и фенотипические изменения. При этом клеточные клоны, получающие то или иное преимущество в борьбе за питательные вещества и кислород, замещают другие клоны. Тем самым, происходит активное эволюционное развитие

первичной опухоли, результатом которого являются такие изменения клеток, как например, повышение энергетического обмена, в первую очередь, за счет анаэробного гликолиза, повышение интенсивности транспортных систем клетки, снижение чувствительности к апоптогенным факторам, маскировка измененного антигенного портрета клетки и пр. В конце концов, это может привести к «случайному» накоплению мутаций, катализирующих неоангиогенетические процессы в патологическом очаге. Этот ключевой момент в развитии злокачественного новообразования имеет название – ангиогенное переключение. После того, как начинает формироваться новое сосудистое русло, питающее опухоль, снижается субстратный дефицит и опухоль приобретает способность к практически неограниченному росту [3].

Понимание фундаментальных механизмов, лежащих в основе канцерогенеза, позволяет сформулировать векторы развития в разработке перспективных противоопухолевых средств.

1.3 Иммуноterapia в онкологии

За последние десятилетия существенным образом изменилось понимание многих фундаментальных биологических вопросов, связанных с проблематикой появления и развития онкопатологии. Обращает на себя внимание значительное количество работ, ориентированных на применение иммунных реакций для борьбы с онкопатологией [4, 5]. Иммуноterapia рака может быть разделена на два направления: специфическую и неспецифическую. К последней относят неспецифическую активацию иммунных реакций организма, посредством антиген-презентирующих клеток и Т-лимфоцитов. С этой целью могут быть использованы цитокины, интерфероны, либо моноклональные антитела к ингибиторам иммунного ответа [16, 106]. Выраженная противоопухолевая активность, заключающаяся в ингибировании пролиферации и индукции клеточной

гибели, отмечается у рекомбинантного интерферона-альфа и интерлейкина-2, эффективность которых показана в отношении таких заболеваний как карцинома почки [38], меланома [13, 14, 52], лейкемия [39], фолликулярная неходжкинская лимфома [96] и саркома Капоши [41]. Однако низкая клиническая эффективность и высокий риск развития побочных эффектов у повышенных дозировок используемых цитокинов определили отказ от дальнейшего исследования данных соединений в варианте монотерапии. Между тем, в настоящее время продолжаются активные исследования неспецифической иммунотерапии, включающей сочетание применения рекомбинантных цитокинов с ингибиторами ключевых точек иммунного ответа [90].

Как отмечается в работе P. Sharma и J. P. Allison [90], данный подход, в некоторых случаях, способен существенным образом повышать эффективность противоопухолевой терапии и индуцировать стойкую ремиссию онкологических заболеваний. Однако в большинстве случаев, эффективность неспецифической иммунотерапии дискуссионна [72, 112]. Неспецифическая иммунотерапия, не обладая таргетированным эффектом, сопровождается системным влиянием на организм и связанными с этим значительными побочными эффектами, возможность преодоления которых является актуальной проблемой сегодняшнего дня [61, 74]. Несмотря на это, данные работы вносят большой вклад, как в практическую медицину, так и в понимание фундаментальных вопросов связи канцерогенетических механизмов с иммунной системой.

Специфическую иммунотерапию, в свою очередь, подразделяют на пассивную и активную. Пассивная специфическая иммунотерапия заключается в применении моноклональных антител непосредственно к опухолевым антигенам, либо в применении адаптивной клеточной терапии с использованием аутологических опухоль-специфичных лимфоцитов [36, 88]. Комплекс данных подходов может быть охарактеризован большей

эффективностью [32, 71]. Применение методов может способствовать получению у значительной доли пациентов стойкой ремиссии. Однако, одновременно с этим, в ходе клинических исследований регистрируется высокая токсичность исследуемых терапевтических агентов [111], связанная с повышенным риском индукции воспалительных реакций различной локализации и степени тяжести, в том числе с летальным исходом из-за побочных эффектов разрабатываемых препаратов [76].

Активная специфическая иммунотерапия представлена использованием аутологичных дендритных клеток, способных к презентации опухолевых антигенов (АГ) [4], либо иммунизацией посредством вакцин, содержащих те или иные опухолевые АГ [99]. В 2010 г. была одобрена клеточная вакцина на основе дендритных клеток для клинических исследований для лечения рака простаты – Sipuleucel-T [49]. Результаты многоцентрового клинического исследования позволили выявить увеличение средней продолжительности жизни пациентов на 4 месяца. Однако в работе не было отмечено ни регрессии опухолевого процесса, ни роста иммунного ответа организма на онкопатологию [74].

Нельзя не отметить перспективность использования онколитических вирусов, продемонстрировавших, в некоторых случаях, высокую эффективность, при относительно малой выраженности побочных явлений. Между тем, положительная динамика, в том или ином проявлении, отмечалась только у четверти пациентов, включенных в клинические исследования, а значимое увеличение продолжительности жизни выявлено менее чем у 6% пациентов [85]. Тем самым, остается открытым вопрос о механизмах, лежащих в основе выявленной специфичности действия.

Нельзя не отметить также, что иммунотерапевтические методы относятся к высоко ресурсоемким направлениям, применение которых в широкой медицинской практике сопряжено с множеством технологических вопросов, не имеющих однозначного ответа на сегодняшний день [50].

Таким образом, несмотря на высокую значимость исследований, касающихся иммунотерапии онкопатологии, как с точки зрения фундаментальных биологических вопросов, так и с позиции практической медицины, сохраняется высокая актуальность поиска новых подходов к диагностике и лечению онкологических заболеваний.

1.4 Протоонкогены и гены-супрессоры опухолевого роста

Одной из ключевых характеристик злокачественно перерожденных клеток является комплекс генетических изменений, проявляющийся в изменении экспрессии ключевых генов, участвующих в регуляции клеточного цикла и индукции программируемой гибели клеток. Даже краткое описание протоонкогенов, генов-супрессоров опухолевого роста и их значения для канцерогенеза потребовало бы написания объемной монографии, посвященной этому вопросу. Поэтому в данном разделе представлено поверхностное рассмотрение материалов, контекст которых имеет актуальность для настоящей работы.

Уже несколько десятилетий продолжаются многочисленные исследования гена *TP53*, являющегося одним из наиболее известных генов-супрессоров опухолевого роста [42, 60]. Экспрессия *TP53* играет важнейшую роль в поддержании клеточного гомеостаза. Как известно, активность *TP53* находится на крайне низком уровне в нормальных клетках, однако существенно повышается при воздействии на клетки онкогенных стресс-факторов или повреждений ДНК, индуцируя клеточную гибель и, тем самым, защищая организм от онкопатологии. В свою очередь, мутации гена *TP53*, вызывающие структурно-функциональные изменения белкового продукта, способны ингибировать этот предохранительный механизм. Отмечается, что в более чем половине случаев многих онкозаболеваний обнаруживаются мутации данного гена [42]. При этом значимыми могут

быть не только изменения экзонной части гена, но и мутации в области интронов, влияющие на процессинг и сплайсинг. В обзорной работе Donehower L. A. и Lozano G. показано, что в модельных экспериментах на лабораторных животных *TP53* влияет на развитие подавляющего большинства онкологических заболеваний [33]. Последние исследования свидетельствуют о том, что *TP53*, кроме прямого влияния на опухоль путем индукции апоптоза [7], также оказывает косвенное влияние на механизмы канцерогенеза посредством контроля метаболических процессов и действия на микроокружение клеток [51].

В международной базе клинических исследований ClinicalTrial.gov на 12 апреля 2019 г. зарегистрировано 417 клинических исследований, так или иначе, связанных с *TP53*. Целью данных работ является попытка восстановления активности *TP53* каким-либо способом, что позволит индуцировать гибель опухолевых клеток и, тем самым, добиться опухолевой регрессии. Однако, несмотря на значительные успехи исследований этой области, необходимо понимать, что данные разработки могут быть нацелены только на те случаи онкопатологии, когда регистрируется подавление экспрессии *TP53*, тогда как около половины опухолей не сопровождаются подобными изменениями [19].

Стоит отметить, что помимо *TP53* есть ряд других генов, участвующих в подавлении программируемой гибели в опухолевых клетках. Наибольшего внимания заслуживают гены, кодирующие белки семейства B-cell lymphoma-2 (BCL2) [84]. Предполагается, что гены и белки, представляющие данное семейство, также могут быть мишенью для новых противоопухолевых препаратов [63]. Семейство BCL2 входит в группу белков, имеющих в своем составе от 1 до 4 консервативных доменов Bcl homology (BH). Также в группу BH-белков входят такие семейства белков как BAX и BH3-only, повышение активности которых приводит к индукции клеточной гибели. Особенностью белков группы BAX, способной обусловить их апоптогенную

активность является их локализация в мембране митохондрий, эндоплазматического ретикулума и ядра. Образую в мембранах олигомерные конструкции (например, BAX/BAX), они существенным образом повышают проницаемость мембран и, тем самым, способствуют высвобождению в цитоплазму различных соединений, в том числе, апоптогенных факторов вроде цитохрома С. Между тем, белки BCL2 обладают ингибирующим действием на функциональную активность BAX, делая последних невосприимчивыми к апоптогенным факторам [29].

Кроме подавления проапоптотической активности, белки семейства BCL2 также способствуют клеточной инвазии, миграции и метастазированию [103]. В совокупности представленные данные обуславливают перспективность разработки методов лечения онкопатологии с использованием методов воздействия на гены и белки группы ВН. Результаты доклинических исследований противоопухолевой активности препарата navitoclax, мишенью которого являются белки семейства BCL2, продемонстрировали высокую противоопухолевую активность [26, 93]. Однако в ходе клинических исследований было выявлено тяжелое побочное действие препарата, проявляющееся в виде тромбоцитопении, ограничивающей эффективную дозировку препарата [63, 86]. Возможно, дальнейшие исследования в этой области позволят найти новые пути решения имеющихся проблем.

Важнейшим участником регуляции канцерогенетических механизмов выступает также сигнальный путь WNT, функции которого были первоначально определены для процессов эмбриогенеза [9]. Однако уже в 1980-х гг. было показано его влияние на механизмы канцерогенеза [102]. WNT, реализуя свои функции посредством связи с белком β -катенин (CTNNB), в общем случае, способствует стимулированию клеточной пролиферации и подавлению процессов дифференцировки. Наиболее хорошо влияние WNT на онкопатологию исследовано на примере колоректального

рака. Так, было выявлено, что APC способен к взаимодействию с белком CTNNB, что приводит к снижению активности APC и повышению активности связи TCF/CTNNB и, тем самым, способствует активизации пролиферации и опухолевой прогрессии [55]. Кроме того, опухолевая трансформация клеток может сопровождаться изменением функциональной активности CTNNB [1].

Литературные данные свидетельствуют о том, что многие случаи онкопатологии ассоциированы с мутациями, повышающими активность сигнальной связи WNT/CTNNB [35, 120]. Между тем, использование WNT в качестве мишени для таргетной терапии онкологических заболеваний сопряжено с рядом сложностей, обусловленных тем, что канонический сигнальный путь WNT играет важную неспецифическую роль в поддержании интенсивности клеточного цикла, тогда как блокада данной связи способствует системному истощению пула стволовых клеток организма, индуцируя, тем самым, гипопролиферативные состояния [56]. Кроме того, необходимо отметить, что высоко консервативный WNT находит свое отражение в регуляции клеточных функций тканей различного происхождения. Однако регуляция его активности и, что еще важнее, его нижележащих мишеней, обуславливающих итоговые проявления действия сигнальной связи, может не только различаться в разных тканях, но и обладать противоположными эффектами. Это связано с вовлечением в сигнальный путь WNT таких регуляторов транскрипции, как TCF/LEFs и FOXs, оказывающих воздействия на экспрессию WNT/CTNNB разнонаправленного характера за счет многообразия состава структурно-функциональных вариантов соединений [44].

1.5 Ген *KLOTNO* и продукты его экспрессии

Ген *KLOTNO* (*KL*) располагается в 13q12, включает 5 экзонов [57, 110] и кодирует одноименный белок, который имеет две различные формы: трансмембранную и секретлируемую. Предполагается, что различие реализуется двумя путями: за счет альтернативного сплайсинга, обеспеченного сайтом, расположенным в третьем экзоне, и за счет частичного расщепления трансмембранной формы с образованием усеченной, секретлируемой формы [25]. Трансмембранная форма белка *KLOTNO* у человека состоит из 1012 аминокислот, располагается в клеточной мембране и аппарате Гольджи и включает внутриклеточный, одиночный трансмембранный и внеклеточный домены. Короткий внутриклеточный домен имеет продолжительность в 10 аминокислот, внеклеточный домен состоит из двух участков внутренних повторов (*KL1* и *KL2*) с совпадением последовательностей от 20 до 40% [101]. Между участками *KL1* и *KL2* возможно расположение сайта, участвующего в расщеплении трансмембранной формы [25]. Секретлируемая форма включает 549 аминокислот и выступает в роли циркулирующего гуморального фактора [47, 70, 81, 92]. У человека преимущественно синтезируется секретлируемая форма белка [65, 70].

В 1997 году группой М. Куго-о в ходе исследований [57], проведенных на модели трансгенной линии мышей, была выявлена аутосомная рецессивная мутация, располагающаяся в гене *KL*. Фенотипические проявления данной мутации представлены признаками, сопровождающими процесс старения: снижение продолжительности жизни, уменьшение массы тела, бесплодие, атеросклероз, атрофия тимуса и кожи, остеопороз и эмфизема легких. Также у мышей с мутацией в гене *KL* выявлены гипогликемия и пониженный уровень инсулина в поджелудочной железе, а при иммуногистохимическом анализе гипофиза – снижение продукции

гормона роста, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов. В последующих исследованиях показано, что некоторые одиночные нуклеотидные полиморфизмы в гене *KL* могут привести не только к снижению продолжительности жизни, но и к росту риска развития острого нарушения мозгового кровообращения и ишемической болезни сердца [11, 12]. В обзорной работе Nabeshima Y. [78], наряду с перечисленными, представлены и другие фенотипические проявления низкой экспрессии гена *KL*, такие как снижение двигательной активности, нарушения слуха, атаксия и нарушения походки, остеопороз, эктопическая кальцификация, замедление роста, нарушения полового созревания, стерильность, нарушения дифференцировки В-клеток, нарушения толерантности к глюкозе.

Несмотря на то, что мутации гена *KL*, его экспрессия и активность соответствующего белка, могут оказывать прямое или опосредованное влияние практически на все органы и ткани организма, локализация и свойства клеток, экспрессирующих ген *KL*, весьма разнообразны. Прежде всего, это клетки дистальных канальцев почек и хориоидного сплетения, а также клетки гипофиза, плаценты, предстательной, поджелудочной и парашитовидной желез, скелетной мускулатуры, мочевого пузыря, тонкой и толстой кишки, аорты, яичек и яичников [78]. Возможным следствием тканеспецифической локализации клеток, экспрессирующих ген, является факт значимого снижения его экспрессии и, соответственно, продукции белка KLOTНО у пациентов, страдающих хронической почечной недостаточностью и другими заболеваниями почек [53, 110], сахарным диабетом [10, 80], ишемической болезнью сердца [10].

Небезынтересным представляется наличие на 4 хромосоме неполной копии гена *KL*, со сходной нуклеотидной последовательностью, получившей название в литературе *KLB* (klotho beta). Ген *KLB* кодирует однопроходный трансмембранный белок с последовательностью аминокислот, близкой к белку гена klotho. Однако *KLB* наиболее выражено экспрессируется в таких

тканях как печень, поджелудочная железа и белая жировая ткань [48], а к его известным функциям можно отнести регуляцию синтеза желчных кислот посредством некоторых факторов роста фибробластов [45].

Разумеется, мутации гена не настолько часто встречающееся событие и, с практической точки зрения, большее значение имеют полиморфизмы гена *KL*, а также его регуляция на посттранскрипционном и эпигенетическом уровнях. В настоящее время отсутствуют систематизированные данные о регуляции экспрессии гена *KL*. Известно, что не только патологические, но и физиологические состояния оказывают влияние на регуляцию экспрессии гена. Так, минимальный уровень экспрессии отмечается в пренатальный период, значительное снижение активности *KL* наблюдается также и в старческом возрасте [34, 91]. Структура гена *KL* включает последовательности, принимающие участие в специфической регуляции функциональной активности гена – это CpG-островки в области промотора и первого экзона и 3'нетранслируемый регион (3'UTR) в пятом экзоне. Наличие CpG-островков в области промотора делает возможным репрессию гена посредством метилирования ДНК.

На посттранскрипционном уровне экспрессия гена может регулироваться молекулами микро-РНК (miR). Это было подтверждено для таких молекул, как miR-10b, miR-199a-5p, miR-339 и miR-556, которые оказывают негативное действие на экспрессию *klotho* [43, 73, 83]. Немаловажным является факт участия данных микро-РНК в канцерогенезе, а miR-339 входит в группу miR, количество которых повышается с возрастом. Тем самым, молекула miR-339 может быть связана с реализацией возраст-зависимых изменений экспрессии *klotho*.

Подтверждением гипотезы о *KL* как гене анти-старения стали исследования Kurosui et al. [59], продемонстрировавшие, что гиперэкспрессия *KL*, смоделированная у трансгенных линий мышей EFmKL46 и EFmKL48, увеличивает продолжительность их жизни на 18,8 – 30,8%. Наблюдаемый

эффект может быть связан с повышением способности организма к выведению активных форм кислорода (АФК). Такое действие гена *KL*, по мнению авторов, может быть обусловлено влиянием на связь инсулин/ИПФР-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) [75]. Ингибирование данной сигнальной связи, наблюдаемое у трансгенных мышей с гиперэкспрессией гена *klotho*, приводит к снижению фосфорилированных форм FOXOs. Ядерные FOXOs напрямую связываются с промоторами генов антиоксидантных ферментов каталазы (в том числе митохондриальной марганец-супероксиддисмутазы (СОД-2)), вследствие чего повышается уровень СОД-2 и устойчивость организма к окислительному стрессу [54]. Данный механизм нашел подтверждение при введении смертельной дозы параквата – сильного окислителя, генерирующего большое количество АФК. При этом летальных исходов среди мышей с гиперэкспрессией гена *klotho* выявлено не было [118]. Важным представляется установление отрицательной обратной связи между инсулин/IGF-1 и экспрессией факторов транскрипции C/EBP α и C/EBP β [40, 115].

Также белок KLOTНО в качестве кофактора регулирует активность фактора роста фибробластов 23 (FRF-23), десятикратно повышая его специфическую клеточную чувствительность [58, 104] в отношении ингибиции реабсорбции фосфатов в почках, препятствуя развитию гиперфосфатемии [67]. В свою очередь, угнетение экспрессии гена *KL* посредством нарушения связи KLOTНО/FRF-23, приводит к увеличению уровня 1,25(OH) $_2$ D $_3$ [57] и, соответственно, индуцирует развитие гиперфосфатемии и гиперкальциемии – состояний, способствующих кальцификации кровеносных сосудов [79]. В то же время, снижение уровня 1,25(OH) $_2$ D $_3$ в крови тормозит проявления признаков старения с увеличением выживаемости животных [59, 118]. Также экспрессия гена *klotho*, за счет повышения активности Na $^+$ /K $^+$ -АТФазы, воздействует на метаболизм ионов Na $^+$ и K $^+$ [97].

Белок KLOTНО рассматривается как гуморальный фактор [46, 75] и оказывает антиапоптотическое действие на клетки эндотелия, предотвращая его дисфункцию. Кроме того, KLOTНО способен модулировать вазодилатирующее действие эндогенного ацетилхолина, препятствуя, тем самым, спазму гладкомышечной мускулатуры стенок кровеносных сосудов [89]. Как предполагается, данный эффект связан с влиянием белка KLOTНО на образование эндотелием NO. Это подтверждается снижением экскреции с мочой метаболитов NO у *KL*-дефицитных животных [110].

Таким образом, белок, кодируемый геном *KL*, по-видимому, действует на антиоксидантную систему, эндотелий сосудов, уровень фосфатов и кальция в крови, посредством которых способен оказывать влияние на развитие возраст-зависимых заболеваний и продолжительность жизни. Однако, необходимо отметить, что до сих пор функции *KL*, а также механизмы его эффектов остаются не в полной мере изученными.

Противоопухолевое действие продуктов экспрессии гена *KL* не может не привлекать особого внимания в связи с высокой актуальностью проблемы поиска новых эффективных методов лечения и диагностики онкологических заболеваний.

Первоначально участие *KL* в развитии онкологических заболеваний было показано в 2008 году, когда было обнаружено существенное снижение экспрессии гена *KL* в образцах ткани протоковой карциномы молочной железы в сравнении с соседними нормальными тканями [114]. Тогда было сделано предположение, что достоверное снижение экспрессии гена *KL* может служить критерием для диагностики данного заболевания на ранних стадиях, так как при метаплазии ткани молочной железы в клетках была определена блокада экспрессии гена, обусловленная метилированием промотора [31, 114]. В свою очередь, искусственно созданная гиперэкспрессия гена *KL* в трансформированных клетках молочной железы существенно снижала их пролиферативную активность [87, 114]. Подобные

результаты получены и при действии на злокачественно перерожденные клетки молочной железы растворенной секретлируемой формой белка KLOTNO [114].

Хотя роль *KL* в развитии рака молочной железы, на сегодняшний день, окончательно не определена, предполагается, что подавление пролиферативной активности клеток опухоли может быть связано с *KL*-опосредованными сигнальными путями, оказывающими значительное влияние на течение данного заболевания. К таковым относится, в частности, сигнальный путь инсулин/IGF-1, который способен изменять экспрессию факторов транскрипции *C/EBP α* и *C/EBP β* , тогда как данные факторы определяются как супрессоры развития рака молочной железы [40, 115].

Также отмечается, что сочетание мутации в гене *BRCA2* (617delT) с функциональным вариантом секретлируемой формы белка KLOTNO – *KL-CV* [11] (данная форма имеет две аминокислотные замены, которые обуславливают низкую активность белка) повышает риск развития рака молочной железы [113]. Однако механизмы данной связи остаются неясными.

Роль *KL* в качестве супрессора опухолевого роста, по-видимому, может рассматриваться не только на примере рака молочной железы, поскольку сигнальные пути, через которые *KL* реализует свои эффекты, принимают участие в развитии многих онкологических заболеваний. Близкие механизмы были выявлены при исследовании действия гена *KL* на диффузную крупно В-клеточную лимфому (DLBCL) и Т-клеточную лимфому. В работах Zhou X et al. демонстрируется, что экспрессия *KL* существенно снижена у пациентов данного профиля. Между тем, индуцированная гиперэкспрессия *KL* способствовала апоптогенному влиянию на клетки, а также ингибировала их пролиферацию. В случае с DLBCL также отмечается снижение активности передачи сигналов IGF-1R, что сопровождалось снижением фосфорилирования АКТ и ERK1/2. Данные механизмы представляются как

возможные пути реализации противоопухолевого эффекта *KL* [28, 121]. Также при индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* в опухолевых клетках рака поджелудочной железы, а также при действии на них растворенного белка KL1 отмечалось существенное торможение клеточной пролиферации [8].

Участие гена *KL* в развитии онкопатологии также было показано для рака легкого. В исследовании был использован плазмидный вектор, введенный в клетку способом липосомальной трансфекции. На клеточной линии рака легких А-549 было показано, что индуцированная гиперэкспрессия гена *KL* ингибирует пролиферацию клеток и стимулирует апоптоз. Ингибирование скорости роста в экспериментальной группе клеток А-549, по сравнению с контрольной группой, было выражено в диапазоне от 7% до 20%. Авторами было выдвинуто предположение о действии *KL* на *BAX*, *BCL2* – гены, оказывающие влияние на апоптотические механизмы в клетке [23]. Дальнейшие исследования продемонстрировали возможный синергизм действия KLOTНО и растворимого лиганда CD40 на культуре клеток рака легкого линии А-549. Сочетание KLOTНО и CD40 существенно усиливало действие на клетки опухоли, в большей степени ингибируя пролиферацию и индуцируя апоптоз [108]. Также представляет интерес дозозависимый эффект KLOTНО, выявленный на линии клеток А-549 в форме положительной коррелятивной взаимосвязи между концентрацией KLOTНО и супрессией клеточной пролиферации [22]. Также уровень экспрессии *KL* в опухолевой ткани может свидетельствовать о прогнозе течения заболевания. В работах Usuda et al. (2011) и Brominska B. et al. (2018) показана выраженная взаимосвязь между относительно высокой экспрессией *KL* и благоприятным прогнозом [18, 105]. Однако стоит отметить, что идентификация *KL* как биологического маркера при раке легкого, в настоящий момент времени, дискуссионна, так как результаты других

исследований не показали статистически значимых изменений в уровне экспрессии *KL* у пациентов [82].

Определено и участие сигнального пути PI3K/AKT в реализации онкосупрессивного действия *KL*. В этом свете представляется немаловажной установленная связь между сниженной экспрессией *KL* в опухолевой ткани и повышенной хемо-резистентностью клеток рака легкого. В исследованиях Wang et al. (2013) показано, что низкая экспрессия *KL* повышает устойчивость клеток к действию цисплатина, а данный эффект может быть ослаблен посредством ингибирования связи PI3K/AKT [109]. Возможно, выявленные проявления также связаны с ингибированием сигнального пути WNT-TCF/CTNNB [22, 28, 98, 100]. Кроме того, в последних исследованиях показано противоопухолевое действие гиперэкспрессии гена *KL* в случае с культурами клеток рака легкого, зарегистрированные эффекты ассоциированы с активностью IL-6, IL-8, P53 и E-кадгерина [24].

В свою очередь, элементом, регулирующим экспрессию *KL* в клетках немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), может являться малая молекула РНК miR-10b, уровень которой повышен в опухолевой ткани и существенно влияет на характеристики клеточного роста. Предполагается, что miR-10b реализует свое действие опосредованно через *KL* [83].

Неканонический белок WNT5A также, возможно, связан с противоопухолевым действием *KL*. На примере меланомы показано, что высокий уровень WNT5A определяет агрессивное течение злокачественного заболевания, способствует метастазированию и повышенной подвижности опухолевых клеток. При этом продукты гена *KL* существенно снижают экспрессию WNT5A и, соответственно, активность злокачественно трансформированных клеток – то есть качественным образом влияют на благоприятный прогноз заболевания [20]. Также предполагается взаимосвязь этих генов с возраст-зависимым течением меланомы. При этом, интересным представляется факт исследования влияния KLOTNO на культуру клеток

меланомы не посредством искусственно моделированной гиперэкспрессии гена, а путем сокультивирования с нормальными фибробластами кожи пациентов молодого и пожилого возраста, различающихся не только степенью экспрессии *KL*, но и за счет паракринной регуляции посредством секретируемого белка [15].

В других исследованиях была показана сниженная экспрессия гена *KL* в клетках рака толстой кишки. За счет введения вирусного вектора моделировали гиперэкспрессию гена, которая сопровождалась ингибированием пролиферативной активности и инвазивного потенциала клеток. Кроме того, было показано, что *klotho* снижает экспрессию таких генов, как *p-IGF1R*, *p-PI3K*, *p-AKT*, *PCNA*, *MMP-2*. Была отмечена связь сниженной экспрессии генов *PI3K* и *AKT*, опосредованной ингибированием сигнальной связи инсулин/*IGF-1R*, с подавлением пролиферативной активности клеток рака толстой кишки [66]. Между тем, существует гипотеза о реализации противоопухолевого действия гена *KL* посредством ингибирования аэробного гликолиза в клетках рака толстой кишки [64]. При исследовании изменений активности различных внутриклеточных сигнальных систем при остеосаркоме определено, что экспрессия *KL* снижается относительно нормальных тканей. Возможно, что это связано с соединениями семейства *NOTCH* и *TNF* [77].

Рассмотренные сведения о взаимосвязи экспрессии гена *KL* с раком молочной железы, легкого и др. указывают на онкосупрессивный эффект гена. Однако несколько противоречивые сведения были получены при определении влияния *KL* на гепатоцеллюлярную карциному (HCC), в образцах ткани которой определяется снижение уровня экспрессии *KL*, связанное с метилированием промоторной области гена [117]. В работе Shuetal. (2013) также продемонстрировано негативное влияние восстановленной экспрессии *KL* на клеточную пролиферацию. Более того, отмечена опосредованная *KL* индукция апоптоза, аутофагии и снижение

миграционной активности клеток опухоли. Экзогенная экспрессия гена *KL* вызывает снижение уровня фосфорилирования IGF-1R, а также влияет на АКТ и ERK. При этом ингибиторы апоптоза и аутофагии выраженно снижали *KL*-опосредованные эффекты клеточной смерти [94]. Одновременно исследование Xie et al. (2013) демонстрирует выраженную взаимосвязь между повышенным уровнем экспрессии *KL* и благоприятным прогнозом течения заболевания НСС [117].

Близкие результаты представлены в статье Tang et al. (2016), в которой отмечается существенное снижение уровня экспрессии *KL* в опухолевой ткани НСС относительно соседних неизмененных тканей при положительной корреляции между уровнем экспрессии *KL* и общей выживаемостью пациентов. При этом гиперэкспрессия *KL* способствовала торможению клеточного роста *in vivo* и *in vitro*, тогда как блокада гена вызывала обратный эффект. Кроме того, была проведена оценка действия гена *KL* на сигнальный путь WNT/CTNNB и показана возможность влияния KLOTNO на снижение экспрессии *CTNNB*, *MYC* и *CCND1*, а также на торможение транспорта белка CTNNB из цитоплазмы в ядро клетки [100]. Реализация онкосупрессивного действия *KL* через сигнальную систему WNT/CTNNB подтверждается работой группы Sun H. et al. (2015) [98].

Напротив, в исследованиях Chen L. et al. (2013) была выявлена связь между высоким уровнем экспрессии *KL* в образцах ткани НСС и низкой общей выживаемостью пациентов с циррозом печени, множественностью опухолевых очагов и венозной инвазией. Более того, повышенная экспрессия *KL* вызывала увеличение миграционной активности клеток опухоли и их резистентности к аноикису [27]. Таким образом, представленные данные относительно влияния гена *KL* на развитие и течение гепатоцеллюлярной карциномы могут быть охарактеризованы как противоречивые. Попытка согласования взаимоисключающих литературных данных предпринята в работе Tang et al. (2016), в которой отмечается высокая концентрация

KLOTNO в сыворотке крови у пациентов с НСС, сочетающаяся с низкой экспрессией этого гена в образцах опухолевой ткани. Объясняя данный феномен, авторы предположили, что растворенный в крови секретируемый белок KLOTNO не попадает в очаг НСС за счет сниженной проницаемости десмопластической стромы, окружающей клетки гепатомы [100]. Возможно, дополнительные исследования в этой области внесут большую ясность в понимание роли гена *KL* в развитии НСС.

При исследовании влияния *KL* на течение рака желудка было выявлено снижение экспрессии гена *KL*, связанное с метилированием промотора как в образцах ткани, взятой от пациентов, так и в пробах соответствующих опухолевых клеточных линий. При этом определен неблагоприятный прогноз течения заболевания при гиперметилировании промотора. Между тем, эктопическая экспрессия *KL* вызывала подавление клеточного роста опухоли и способствовала индукции апоптоза в раковых клетках [107]. В 2013 году исследовательской группой Xie et al. было показано, что восстановленная экспрессия *KL* способна вызывать в клетках рака желудка не только апоптоз, но и аутофагию [117]. Возможно, при раке желудка *KL* может являться мишенью для miR-199a-5p, уровень которой существенно повышен в ткани рака желудка в сравнении с нормальными тканями, что способствует клеточной миграции и инвазии [43].

Lee J. et al. (2010) наблюдали гиперметилирование CpG-островков промоторной области гена, деацетилирование гистонов и снижение экспрессии *KL* при цервикальной карциноме в инвазивной форме и на соответствующих клеточных линиях. При этом эктопически индуцированная экспрессия гена способствовала подавлению клоногенной активности клеток [62]. Другие исследования дополняют полученные данные, сообщая о подавлении посредством *KL* миграционной активности клеток и их способности к инвазии [21]. Авторы данных работ показали и вовлеченность

канонического сигнального пути WNT в реализацию противоопухолевого действия *KL* для цервикальной карциномы.

Также онкосупрессивное действие *KL* было показано на модели клеточных линий фолликулярного рака щитовидной железы FTC133, FTC238. Гиперэкспрессия *KL*, индуцированная в культурах клеток, вызывала снижение уровня станниокальцин-1 и, тем самым, способствовала существенному снижению пролиферативной активности клеток и индукции апоптоза [30].

На сегодняшний день остается неясной роль *KL* в развитии рака яичника. В 2008 году группой ученых Lu et al. была отмечена высокая экспрессия секретлируемой формы KLOTНО, связанная с высоким риском неблагоприятного течения заболевания и низкой выживаемостью пациентов [69]. Последующие исследования продемонстрировали способность гиперэкспрессии *KL* подавлять пролиферацию в некоторых клеточных линиях (OvCa432, SKOV3 и ES2). Отмечается, что *KL* подавляет экспрессию рецепторов эстрогенов [68]. Эта взаимосвязь, возможно, играет неоднозначную роль для разных подтипов рака яичника. Однако недавние исследования вносят еще более выраженное противоречие в сложившуюся картину. Так, Yan et al. (2017) показано благоприятное прогностическое значение высокой экспрессии *KL*. Данные подтверждаются исследованиями на культурах опухолевых клеточных линий, в которых демонстрируется отрицательная корреляция пролиферативной активности клеток исследуемых линий с уровнем экспрессии *KL*. Результаты дополняются оценкой влияния экспрессии *KL* на развитие опухоли у мышей в условиях *in vivo*: гиперэкспрессия *KL* способствовала торможению опухолевого роста [119].

Несмотря на то, что функции гена *KL* и механизмы регуляции его активности в настоящее время не в полной мере известны, имеющиеся данные позволяют сделать предположение о практической значимости дальнейшего изучения действия гена на организм, как в нормальных, так и в

патологических условиях. Детальное изучение *KL* способно обеспечить принципиально новый подход к диагностике и лечению онкологических заболеваний.

С точки зрения диагностики онкопатологии, *KL* может рассматриваться как потенциальный биомаркер, изменения в экспрессии которого могут свидетельствовать о наличии трансформированной ткани, а также иметь выраженное прогностическое значение. В свою очередь, лечебный потенциал *KL* в большей степени обусловлен положительными результатами, полученными при изучении противоопухолевой активности гиперэкспрессии гена *KL*, искусственно индуцированной в опухолевых клетках различного происхождения.

Между тем, стоит отметить, что, несмотря на расширяющийся пул информации, касающийся влияния *KL* на внутриклеточные сигнальные системы, регулирующие гомеостаз и жизнедеятельность клеток, остается крайне мало изученной область эффекторного влияния *KL* на такие важнейшие характеристики опухолевых клеток, как активность внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов и синтетическая активность.

ГЛАВА 2

МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клетки и их культивирование

Исследования проведены на культивируемых опухолевых клетках человека различного происхождения. Экспериментальная часть данной диссертационной работы проведена на сертифицированных клеточных линиях: А-172 (глиобластома человека, получена от Института Цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), Rd (эмбриональная рабдомиосаркома человека, получена от ЕНИИ Вирусных Инфекций, Екатеринбург, Россия), Сасо-2 (рак ободочной кишки человека, получена от Института Цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия).

Для клинической части исследования клеточные культуры получали методом ферментативной дезагрегации. Для этого в лабораторию доставляли образцы опухолевой ткани, взятые интраоперационно в стерильных условиях. Взятие опухолевого материала, предназначенного для исследования и утилизации, производилось во время плановых операций в ГКБ № 40 (Екатеринбург, Россия), после получения добровольного информированного согласия пациента. Транспортировка образцов в лабораторию не превышала 4 часов с момента забора материала. Исследования проводили на основании одобрения протокола локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (выписка из протокола №5 от 18 мая 2018 г.).

Критерием включения в исследования послужил установленный диагноз глиобластомы при наличии показаний к оперативному вмешательству. Критерии исключения: наличие ВИЧ-инфекции, гепатита В и С, а также заболеваний, сопровождающихся острой воспалительной реакцией, на момент хирургического вмешательства.

Для транспортировки использовали стерильные одноразовые полипропиленовые емкости с 5-25 мл транспортировочной культуральной среды. При транспортировке пробирки помещали в контейнеры, поддерживающие температуру 4°C.

Образцы ткани под ламинарным потоком воздуха подвергали механическому измельчению до размеров, не превышающих 4 мм³. Измельченные кусочки помещали в культуральные флаконы (Orange, Бельгия) и инкубировали при 37°C, 95% влажности и 5% CO₂ в течение 48 часов (инкубатор Sanyo, Япония). При отсутствии признаков бактериальной или иной контаминации во флаконы добавляли стерильный раствор неочищенной коллагеназы (Биолот, Россия) в концентрации 200 ед./мл. Культуральные флаконы возвращали в инкубатор на 24-48 часов до получения клеточной суспензии. Стромально-клеточную суспензию центрифугировали при 200g 5 минут. Осадок ресуспендировали в рабочей культуральной среде, и полученную таким образом суспензию переносили в свежие культуральные флаконы.

Смену культуральной среды в клеточных культурах проводили каждые 72 часа на 20-100% от общего объема среды во флаконе. При достижении культурой 80-90% конфлюэнтности и более клетки субкультивировали с использованием 0,25% раствора трипсина (Sigma Aldrich, США).

Кроме того, необходимо отметить, что при культивировании клеток возникала методологическая необходимость криоконсервации клеточных линий для их сохранения, с возможностью использования в последующих экспериментах. Между тем, существующие и общераспространенные методы криоконсервации с использованием раствора ДМСО обладают выраженной токсичностью. Данное обстоятельство приобретает высокое значение при планировании исследований, сопряженных с липосомальной трансфекцией, так как комплексы поликатионных липидов, используемые для доставки ДНК, также обладают токсическим эффектом. Результатом сочетания

факторов данных воздействий является снижение эффективности трансфекции.

В связи с этим, был использован метод консервации биологических объектов с использованием клатратов ксенона [6]. Клеточные суспензии в стерильных криопробирках (Sarstedt, Германия) помещали в камеру, в которую нагнеталось избыточное давление ксенона. Требуемое давление должно быть не менее 6 атм. Заданный режим обуславливает сохранение культивируемых клеток при 4°C. При этом, отсутствие ДМСО освобождает клетки от токсического влияния криопротектора. В результате, трансфекция, осуществляемая после консервации, производится на клетках более жизнеспособных, нежели после стандартной консервации с использованием ДМСО. Тем самым, использованный метод консервации клеточных культур косвенным образом сказывается на эффективности липосомальной трансфекции клеток.

2.2 Генетические конструкции: экстракция ДНК, качественный и количественный ПЦР-анализ

Плаزمида Klotho (secreted) разработана лабораторией доктора Hal Dietz университета Джона Хопкинса (США) и любезно предоставлена в рамках договора о межвузовском сотрудничестве (Addgene plasmid # 17713) [12]. Конструкция включает ген секретлируемой формы белка KLOTНО (содержит только первые 3 экзона гена *KL*). Плазмиды выделяли из трансгенной линии *E.coli* с применением коммерческого набора MiniprepKit (D4015, ZymoResearch, США) в соответствии с протоколом производителя. Бактериальную культуру, выращенную в жидкой LB-среде (Sigma Aldrich, США) с добавлением антибиотика ампициллина 75 мкг/мл (Sigma Aldrich, США), обладающего селективным действием по отношению к трансгенному штамму *E.coli*, центрифугировали при 200g 10 минут. Осадок

ресуспендировали в буфере. Затем лизировали бактерии, выделяли плазмидную ДНК с помощью колонок MiniprepKit.

Количественный подсчет пДНК проводили на спектрофотометре (BIO-RAD, США) при длине волны 260 нм. Качественный анализ проводили по соотношению A260/A280. Образцы считали пригодными при A260/A280 = 1.8 ± 0.1. Копийность полученных растворов плазмидной ДНК определяли по формуле (2.1):

$$(\text{ДНК (нг)} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{длина плазмиды (п.о.)} \times 10^9 \times 650) \quad (2.1)$$

Длину плазмиды определили как сумму длин вставки гена sKL (1610 п.о.) и плазмиды pcDNA3.1/V5/His-TOPO (5523 п.о.).

Для ПЦР в качественном и количественном форматах готовили серию разведений с известной копийностью в 1 мкл раствора: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 . Последнее разведение использовали для качественной ПЦР с праймерами к участкам, лежащим на стыке первых двух экзонов гена *KL*: *KL* (forward), CACAACCTCCTCCTGGCTCAT и *KL* (reverse), TCCAGTGAGAGCTTAGGGCA. Величина продукта, нарабатываемого с данных праймеров, составляет 103 п.о. Реакции проводили в 2-кратном буфере Fermentas (Thermo Fisher Scientific, США), 25 мкМ каждого праймера и 2.5 U DreamTaq полимеразы Fermentas (Thermo Fisher Scientific, США). Использовали следующие параметры термоциклирования: 95°C 2 минуты и далее 35 циклов: 95°C 15 секунд, 62°C 15 секунд и финальную элонгацию при 72°C в течение 7 минут.

2.3 Секвенирование

ПЦР продукты, полученные в ходе реакции разделяли в 6% полиакриламидном геле с помощью вертикального электрофореза с

использованием камеры (BIO-RAD, США) при постоянном напряжении 150 В течение 30 минут. Окрашивали 1% бромистым этидием и визуализировали в УФ-излучении (рисунок 1А). Оценивали специфичность реакции по отсутствию фрагментов длины отличной от 103 п.о. Вырезали фрагменты нужного размера с помощью скальпеля и помещали в ddH₂O на сутки с целью элюции продукта из геля.

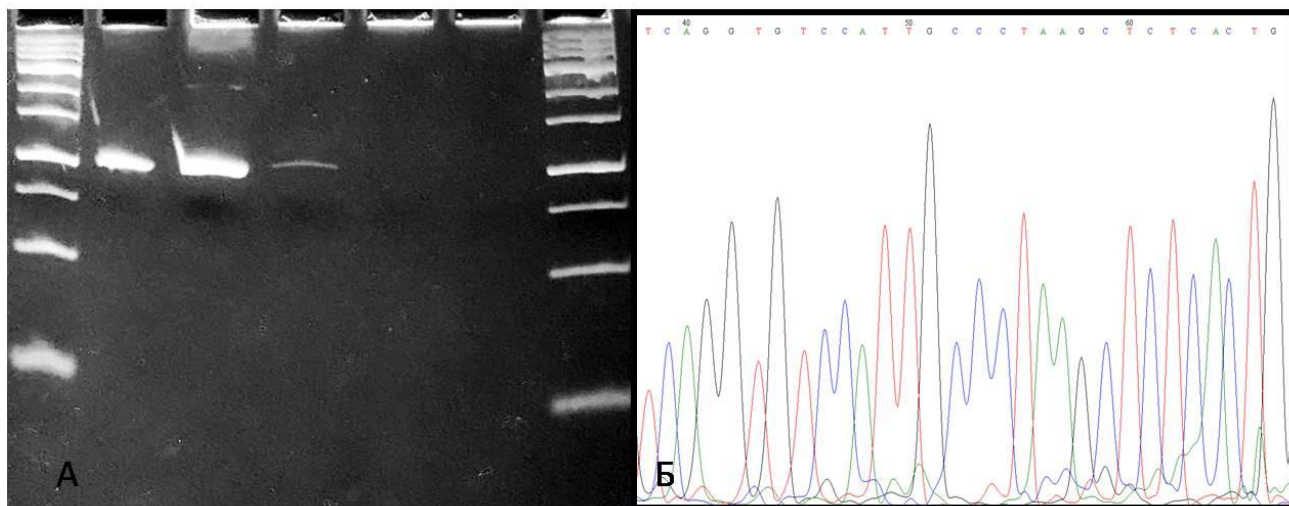


Рисунок 1 – Результаты секвенирования.

А – разделение продуктов ПЦР в полиакриламидном геле по методу вертикального электрофореза; Б – участок сиквенса.

Секвенирование по Сенгеру проводили для шести образцов в прямом и обратном направлениях на секвенаторе ABI-3500 (Applied Biosystems, США). Элюированные ДНК продукты, полученные на предыдущем этапе, добавляли в мастермикс Big Dye terminator sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems, США), содержащий 6.6 мкМ прямого *KL* (forward) или обратного *KL* (reverse) праймера в концентрации. Проводили секвенирующую реакцию согласно инструкции производителя: 96°C 1 минута и далее 25 циклов: 96°C 10 секунд, 60°C 240 секунд. Продукты секвенирующей реакции отмывали с помощью набора силикатных частиц X Terminator (Applied Biosystems, США) согласно инструкции. Капиллярный электрофорез проводили на генетическом

анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США) при постоянном напряжении 8.5 кВ, температуре 60°C. Анализ и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы Sequencing Analysis 6.0 (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности (рисунок 1Б) сравнивали с референсными в базе данных BLAST.

2.4 Трансфекция

Клетки заранее высаживали на необходимые для эксперимента культуральные площади. Трансфекцию проводили после замены рабочей культуральной среды на среду, лишенную фетальной бычьей сыворотки.

Использованная смесь для липосомальной трансфекции включает: плазмидную ДНК с геном *KL*, комплекс поликатионных липидов Escort III (Sigma Aldrich, США) и культуральную среду без сыворотки. Подготовка трансфекционной смеси включает разведение 10 мкл комплекса поликатионных липидов Escort III в 490 мкл свободной от сыворотки среды, растворение 20 нг ДНК в 500 мкл свободной от ФБС среды (данные соотношения объемов реагентов использованы для трансфекции 1 флакона площадью 25 см² или одного 96-луночного планшета). Полученные растворы смешивали между собой, пипетировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут при регулярном помешивании. Для культур контрольной группы трансфекционную смесь готовили аналогичным образом, но без добавления плазмидной ДНК.

Трансфекционную смесь добавляли к клеткам, культуры возвращали в CO₂-инкубатор на 12-18 часов. После этого во флаконах меняли среду на стандартную ростовую, и возвращали их на инкубирование на необходимый для эксперимента срок.

2.5 Контроль гиперэкспрессии

Контроль гиперэкспрессии проведен с использованием разработанного набора праймеров и зондов, нацеленных на стык 1-го и 2-го экзонов гена *klotho*. Трансфецированные культуры трижды отмывали фосфатным буферным раствором PBS и снимали с матрасов по стандартной методике 0.25% раствором трипсина. Полученные суспензии центрифугировали при 200 g в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора PBS, а затем смешивали с раствором TRI Reagent (MRC, США) в соотношении 1:4 и, далее выделяли тотальную РНК согласно инструкции производителя. Сухие осадки РНК растворяли в 10 мкл Rnase free water (Qiagen, Нидерланды), измеряли концентрацию, затем проводили реакцию обратной транскрипции в 1 мкг РНК при 37°C в течение 60 минут с использованием Random гексамеров в 10 мкл смеси (Promega, США), состоящей из 5X буфера для обратной транскрипции, 10 mM dNTP, 100 мкл Mrandomпраймера, 5 U MMLV обратной транскриптазы, 1 Е.Д. Rnasin. Для проведения последующих реакций qPCR использовали 2.5 мкл пДНК в расчете на одну реакцию.

Экспрессию генов изучали методом RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative PCR). Для построения калибровочных графиков использовали серийные разведения плазмидной ДНК с *KL* охарактеризованной копийности, приготовленные на этапе выделения. Для детекции *KL* использовали праймеры для качественной ПЦР с добавлением зонда (CCGTCCCACTCAGGGAGGTCA), меченного FAM. Реакции проводили в uniplex формате с использованием мастермикса (Promega, США) состоящего из 5x буфера, 10mM dNTP, 50 mM Mg²⁺, 6,5 мкМ каждого праймера, 5 мкМ зонда, ddH₂O и 2,5 U GoTaq полимеразы и пДНК нужной копийности. Амплификацию и детекцию флуоресцентного сигнала проводили на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) с параметрами термоциклирования: 95°C

2 минуты и далее 45 циклов: 95°C 15 секунд, 62°C 15 секунд. Анализ кривых накопления сигнала, регистрацию Cq и построение калибровочных графиков проводили в программе LightCycler 96 SW 1.1. В качестве референс-гена использовали ген Abelson (*ABL1*), так как его экспрессия относительно стабильна в разных клетках и мало зависит от прочих факторов. Детекцию *ABL1* проводили с использованием праймеров: *ABL* (Forward) AGCTCCGGGTCTTAGGCTAT, *ABL* (Reverse) TAGTTGCTTGGGACCCAGCC и зонда *ABL* quant, CCAATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATTT, меченого FAM. Калибровочные графики для гена *ABL1* строили по аналогии с *KL* с использованием коммерческих наборов плазмид ABL ControlGene с копийностью 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 . (Qiagen, Нидерланды). Эффективность амплификации фрагментов *KL* и *ABL1* оценивали по формуле (2.2):

$$10^{(-1 / \text{slope})} - 1 \quad (2.2)$$

Анализ экспрессии в опытных и контрольных культурах проводили согласно описанной методики. Находили абсолютное число копий генов *KL* и *ABL1*, экспрессию *KL* соотносили с экспрессией *ABL1*. Результаты сравнения экспрессии гена *KL* в группах исследования представлены на диаграмме (рисунок 2).

2.6 Кривые роста и подсчет количества клеток

В качестве одного из основных тестов оценки пролиферативной активности клеток использовался метод построения и анализа кривых роста. Для этого исследуемые клетки высаживали в культуральные флаконы (Orange, Бельгия) в посевной концентрации от 6 до 8×10^3 клеток на квадратный сантиметр площади посевной поверхности. Исследования

включали две группы: опытную и контрольную, в каждую из которых входило по 7-10 повторностей на каждую временную точку. На следующий день после пассажа клетки подвергали воздействию трансфекционной смеси с плазмидной ДНК – в опытной группе, и без нее – в контрольной. После трансфекции среду в культурах меняли на стандартную ростовую.

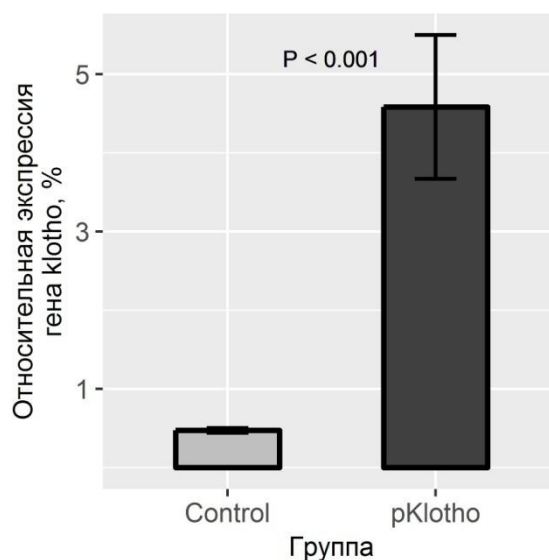


Рисунок 2 – Уровень экспрессии гена *KL* в группах сравнения относительно экспрессии гена *ABL1*, %, $M \pm m$.

Культуры клеток последовательно выводили из эксперимента через 24, 48 и 72 часа после завершения воздействия трансфекционных агентов на клетки. Для этих целей с культур клеток сливали кондиционную среду, клетки дважды отмывали фосфатным буферным раствором (PBS) без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия). Затем во флаконы вносили 0.25% раствор трипсина из расчета 0.1 мл на cm^2 площади посевной поверхности флакона. Через 20-30 сек раствор трипсина удаляли из флаконов, культуры клеток инкубировали при комнатной температуре до полного «отлипания» клеток от культуральной поверхности, определяемой невооруженным глазом или, при необходимости, с использованием фазово-контрастной и стереомикроскопии при 20-100-кратном увеличении. Трипсин нейтрализовали

культуральной средой с 20% фетальной бычьей сыворотки. Полученные клеточные суспензии переносили в центрифужные полипропиленовые пробирки с конусным дном, объемом 15 мл (Sarstedt, Германия; Biofil, Китай), и центрифугировали при 200g в течение 5 минут. Затем удаляли супернатант и тщательно ресуспендировали клетки в 1 мл культуральной среды без сыворотки или фосфатного буферного раствора.

Для культуры Caco-2 протокол был несколько модернизирован, в связи с более интенсивно выраженной адгезионной способностью и другими особенностями роста клеток данной линии. Культуры клеток рака ободочной кишки также дважды отмывали раствором DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} , затем вносили во флаконы 0.25% раствор трипсина на 5 сек, удаляли жидкость из флакона и снова добавляли 0.25% раствор трипсина на 20-30 сек. В обоих случаях объем раствора трипсина соответствовал приведенной выше формуле. Для ускорения манипуляции культуры клеток инкубировали не при комнатной температуре, а в термостате при 37°C до полного «отлипания» клеток от культуральной поверхности. Далее действовали по общему протоколу.

Подсчет клеток производили двумя способами: в камере Фукса-Розенталя или с использованием автоматического счетчика клеток Scepter (Millipore Corporation, США). При подсчете в камере Фукса-Розенталя, клеточную суспензию предварительно тщательно пипетировали перед каждым подсчетом. Непосредственный подсчет клеток проводили на прямом фазово-контрастном бинокулярном микроскопе CX41 (Olympus, Japan) при 40-кратном увеличении. В зависимости от концентрации клеточной суспензии клетки считали в 8, 16, 32 или 64 малых квадратах камеры. При этом, клетки, попавшие на левую и верхнюю границы малых квадратов, учитывались в расчетах, а клетки, определяющиеся на правой и нижней границах, в расчет не принимались. Концентрацию клеток определяли по формуле (2.3):

$$K_{\text{мл}} = K \times (256 / M_{\text{кв}}) \times 1000 \text{ мкл} / 3.2 \text{ мкл} \quad (2.3)$$

где $K_{\text{мл}}$ – количество клеток в одном мл,
 K – количество клеток, определенное в малых квадратах,
 $M_{\text{кв}}$ – количество использованных малых квадратов.

При использовании автоматического счетчика клетки переносили в стерильный одноразовый полипропиленовый стаканчик объемом 30 мл, тщательно пипетировали перед каждым подсчетом. Наконечник счетчика опускали в полученную суспензию и производили забор необходимого объема пробы.

Опираясь на данные кривых роста, производился расчет периода удвоения клеточной культуры с применением формулы (2.4):

$$T = \ln 2 / r, \quad (2.4)$$

где T – период удвоения (ч.),
 r – средний прирост количества клеток за 1 час ($r = (\ln M_2 - \ln M_1) / t$),
 M_2 – среднее арифметическое значение количества клеток в последней точке кривой роста (или перед выходом на фазу плато),
 M_1 – среднее арифметическое значение количества клеток в первой точке кривой роста,
 t – время (ч.).

2.7 МТТ-тест

Культуры исследуемых клеток заранее высаживали на адгезивные плоскодонные 96-луночные планшеты (Orange, Бельгия) в посевной концентрации $1 - 8 \times 10^3$ клеток на лунку. Исследования включали опытную и контрольную группы. Культуры опытной группы трансфецировали липосомальным способом, культуры контрольной группы подвергали действию поликатионных липидов без плазмидной ДНК. Измерения проводили при последовательном выведении клеточных культур из

эксперимента через 24, 48 и 72 часа после отмывки от трансфекционной смеси. Для каждой временной точки количество повторностей в группах составляло по 30 наблюдений.

Для проведения МТТ-теста использовали коммерческий набор ТОХ-1 (Sigma Aldrich, США). В условиях ламинарного потока из каждой лунки планшета удаляли кондиционную среду и добавляли по 180 мкл культуральной среды с 10% фетальной бычьей сыворотки. Затем в каждую лунку добавляли по 20 мкл разведенного раствора МТТ [3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Для подготовки красителя МТТ разводили в фосфатном буферном растворе DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} в соотношении 5 мг на 1 мл раствора. После добавления восстановленного МТТ, культуры инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 95% влажности и 5% CO_2 . Стоит также отметить, что каждый планшет содержал лунки без клеток, в которые добавляли эквивалентное количество ростовой среды и восстановленного МТТ, для дополнительного качественного контроля оцениваемых показателей.

По завершении срока инкубирования культуры доставали из инкубатора, из планшетов осторожно удаляли всю кондиционную среду. С целью проведения лизиса клеток и солюбилизации полученных кристаллов формазана в каждую лунку добавляли по 200 мкл солюбилизирующего раствора, включающего диметилсульфоксид (ДМСО) и изопропиловый спирт, 1:1. Каждую лунку тщательно пипетировали для достижения гомогенизации полученного раствора.

Колориметрические измерения проводили на планшетном спектрофотометре MultiskanGO (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Результирующий показатель определяли как оптическую плотность при длине волны 570 нм за вычетом показателей фоновых значений (OP_{570} – OP_{690}).

2.8 Оценка интенсивности восстановления окисленной формы резазурина

Оценка способности клеток к восстановлению окисленной формы красителя резазурина проводилась с использованием торгового набора TOX-8 (Sigma Aldrich, США). Анализ основан на способности жизнеспособных клеток восстанавливать окисленную форму резазурина. При этом, при участии НАДН-дегидрогеназного комплекса и митохондриальных оксидоредуктаз происходит отщепление атома кислорода от молекулы красителя.

Клеточные культуры заранее высаживали в 96-луночные планшеты (Orange, Бельгия) в посевной концентрации 8×10^3 клеток на лунку и подвергали трансфекции. Для последующего выполнения резазуринового теста в клеточных культурах в условиях ламинарного потока воздуха меняли культуральную среду, добавляя стандартную ростовую среду с 10% ФБС в объеме 90 мкл на лунку планшета и 10 мкл раствора резазуринового красителя. Клетки инкубировали при температуре 37°C, влажности 95% и CO₂ 5% в течение 4 часов, по истечении которых культуры возвращали в ламинарный шкаф и пипетировали для гомогенизации красителя в ростовой среде.

Измерения проводили на планшетном спектрофотометре MultiskanGO. При этом оценивали разницу оптической плотности при длине волны, соответствующей полезному сигналу – 600 нм, и длине волны, характеризующей фоновые значения – 690 нм (ОП₆₀₀ – ОП₆₉₀).

2.9 Определение активности внутриклеточной лактатдегидрогеназы

Оценка изменения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) производилась с использованием набора TOX-7 (Sigma Aldrich, США) по

протоколу производителя. В ходе исследований определяли общую цитоплазматическую ЛДГ. Анализ основан на уменьшении никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) при взаимодействии с ЛДГ. При проведении реакции НАД⁺ (НАДН) используют для стехиометрического превращения тетразолиевого красителя. Подготовка лиофилизированного ко-фактора (Sigma Aldrich, США) производилась путем добавления 25 мл MQ-воды к лиофилизату.

Для детекции общей цитоплазматической ЛДГ в анализируемых культурах готовили необходимую смесь реагентов, состоящую из равных частей раствора субстрата для анализа ЛДГ, красителя и восстановленного ко-фактора. Смесь реагентов для анализа готовили каждый раз непосредственно перед исследованиями.

Исследуемые клеточные культуры заранее высаживали в адгезивные плоскодонные 96-луночные планшеты (Orange, Бельгия) и подвергали воздействию трансфекционной смеси с плазмидной ДНК (опытная группа) или без плазмидной ДНК (контрольная группа). Культуры клеток высаживали на планшеты в той же посевной концентрации, как при проведении МТТ-теста.

Культуры удаляли из инкубатора и, в условиях ламинарного потока воздуха, заменяли в них кондиционную среду на свежую стандартную ростовую среду, лишенную сыворотки, общим объемом 90 мкл на лунку. Перед внесением свежей среды, клетки однократно отмывали DPBS для удаления следовых остатков кондиционной среды с сывороткой. Данные манипуляции необходимы для уменьшения ошибки исследований, связанной с возможным наличием ЛДГ в сыворотке животного происхождения. В каждую лунку планшета добавляли по 10 мкл лизирующего раствора, после чего культуры возвращали в инкубатор на 45 минут. Полученный лизат переносили в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки с конусным дном, объемом 1.5 мл, и подвергали центрифугированию при 250 g

в течение 4 минут для осаждения гранул. Супернатант из пробирок переносили в лунки нового стерильного плоскодонного 96-луночного планшета. Затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл подготовленной смеси реагентов с красителем и ко-фактором для определения ЛДГ. Планшет закрывали от света листом фольги и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Результирующие значения получали методом спектрофотометрии на планшетном спектрофотометре MultiskanGO. Измеряли оптическую плотность при длинах волн 490 (полезный сигнал) и 690 нм (фоновый показатель). Для оценки общей цитоплазматической ЛДГ опирались на показатель разницы $OP_{490} - OP_{690}$.

2.10 Оценка интенсивности синтеза ДНК

Исследование интенсивности синтеза молекул ДНК опухолевыми клетками производилось на жидкостном сцинтилляционном счетчике Бета-2. Предварительно клетки высаживали в культуральные флаконы площадью 25 см² (Orange, Бельгия) в посевной концентрации 8×10^3 клеток / см² площади культуральной поверхности и подвергали действию трансфекционной смеси с пДНК (опытная группа) и без пДНК (контрольная группа). Через сутки после трансфекции в культуры добавляли меченый 5-метил-³H-тимидин в концентрации 200 кБк/мл, после чего флаконы возвращали в СО₂-инкубатор на 24 часа.

По прошествии срока инкубирования, клетки трехкратно отмывали от не включенных меченых молекул тимидина и снимали с культуральной поверхности с использованием 0.25% раствора трипсина. Полученную суспензию центрифугировали при 200g в течение 5 минут. Осадок ресуспензировали в 1 мл DPBS. Из каждой пробы забирали по 50 мкл

суспензии для подсчета клеток и добавляли 50 мкл 98% муравьиной кислоты. Открытые пробирки помещали на водяную баню при 90°C на 60 минут.

Для подсчета с каждой пробирки забирали 4 пробы по 200 мкл, каждую из которых переносили в одноразовые пластиковые флаконы, содержащие по 6 мл спирто-толуолового сцинтиллятора. Подсчет радиоактивности клеточных лизатов производился на счетчике Бета-2, измерения каждого флакона производились 4-кратно по 100 сек. Эффективность счета по ^3H принимали как 56%. При каждом измерении оценивали фоновое значение радиоактивности на флаконах, содержащих спирто-толуоловый сцинтиллятор без добавления экспериментальных проб. Результаты выражали в показателе Бк / 10^6 клеток.

2.11 Оценка активности ферментов семейства каспаз

Апоптоз оценивали по активности ферментов семейства каспаз. С этой целью использован набор Caspase Apoptosis Kit (Novus, США). Основным компонентом набора является краситель FLICA – флуоресцентный поликаспазный ингибитор, селективно связывающийся с каспазами. При микроскопии окрашенных препаратов наблюдаются клетки и апоптотические тельца, имеющие красное свечение. Для проведения эксперимента клетки высаживали в культуральные флаконы (Orange, Бельгия) в посевной концентрации 8×10^3 клеток / см^2 площади культуральной поверхности. Культуры опытной группы трансфецировали с плазмидой, несущей ген *KL*, культуры контрольной группы подвергали воздействию трансфекционной смеси без пДНК.

Через сутки после трансфекции клетки снимали с культуральной поверхности с использованием метода трипсинизации. Поскольку погибшие клетки могут находиться в кондиционной среде, ее сливали в ту же пробирку, в которую затем добавляли трипсинизированную клеточную

суспензию. Затем пробирку с клетками центрифугировали при 200 g в течение 5 минут, удаляли супернатант, ресуспендировали в 500 мкл смешанной культуральной среды DMEM/Ham's F12. К полученной суспензии добавляли 15 мкл 30x раствора красителя FLICA и инкубировали при 37°C 60 мин, при этом клетки пипетировали каждые 10 минут. Далее в каждую пробу добавляли еще по 10 мл культуральной среды и инкубировали при 37°C еще 60 минут, по истечении которых пробирки центрифугировали при 200 g 5 минут, и удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 300 мкл промывочного буфера и переносили пробирки в воду со льдом (0°C) на 60 минут.

Окрашенные клетки визуализировали на флуоресцентном микроскопе ZOE (BIO-RAD, Сингапур) при экстинции 556 нм и эмиссии 615 нм. Подсчет количества апоптотических клеток производился на камере Фукса-Розенталя.

2.12 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проведен в программе RStudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.) с использованием пакета R версии 3.5.1. Данные представлены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (m), а также в формате бокс-плотов. Нормальность распределения значений выборок оценивали по тесту Шапиро-Уилка. При наличии нормального распределения оценку различий показателей групп проводили по T-критерию Стьюдента, в противном случае – по U-критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

2.13 Этические вопросы

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(выписка из протокола №5 от 18 мая 2018 г.)

ГЛАВА 3

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА *KLOTNO* НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ ЛИНИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ РАБДОМИОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Эмбриональная рабдомиосаркома - опухоль, происходящая из мышечной ткани, является одной из наиболее распространенных сарком, выявляемых у детей до 15 лет и характеризующаяся тяжелым прогнозом. Означенным обусловлена актуальность поиска новых противоопухолевых средств, минимально травмирующих растущий организм. Данная особенность может выгодно отличать применение генных технологий от радиоизотопных методов лечения, химиотерапии и хирургических вмешательств. Изучение эффектов гиперэкспрессии генов-супрессоров опухолевого роста и, в частности, гена *KL*, экспрессируемого клетками человеческого организма, может лежать в основе такого подхода.

3.1 Исследование кривых роста клеток линии **Rd**

Одним из наиболее общепринятых способов оценки влияния различных агентов на жизнеспособность культивируемых клеток является метод построения и анализа кривых клеточного роста. В данном исследовании анализировали 3-х суточный интервал, с тремя временными точками, в которые производили подсчет количества клеток через 24, 48 и 72 часа после завершения однократной трансфекции.

Динамика роста опухолевых клеток рабдомиосаркомы *Rd*, выявленная по методу построения кривых роста, характеризуется плавным нарастанием количества клеток от 6.75×10^3 на см^2 поверхности культуральных флаконов (на 1-е сутки исследований) к $12.95 \times 10^3 / \text{см}^2$ (2-е сутки) и до $28.26 \times 10^3 / \text{см}^2$ (3-и сутки). Примечательно, что показатель, выявленный на 2-е сутки,

занимает срединное положение. Последнее свидетельствует об отсутствии каких-либо ресурсных ограничений роста, связанных с культуральной площадью, либо питательным субстратом для клеток в пределах исследуемого временного интервала.

В то же время, при равной с контролем посевной концентрации, индуцированная гиперэкспрессия гена секретируемой формы *KL* в опухолевых клетках отличается снижением их количественных показателей во все сроки наблюдения (таблица 1).

Таблица 1 – Количественные значения кривых роста, построенные при исследовании культуры клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd

Группа	Время, час	Объем выборки	Кол-во клеток, $10^3/\text{см}^2$, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	10	6.75 ± 0.21	-14.95	= 0.014
Опытная	24	10	5.74 ± 0.30		
Контрольная	48	10	12.95 ± 0.49	-28.52	< 0.001
Опытная	48	10	9.26 ± 0.73		
Контрольная	72	10	28.26 ± 0.66	-42.2	< 0.001
Опытная	72	10	16.34 ± 0.59		

Как следует из таблицы 1, в течение периода наблюдения выявлено постепенное нарастание различий между опытной и контрольной группами. Так, при первом подсчете клеток снижение исследуемого показателя под действием гиперэкспрессии *KL* не превысило 15% ($p = 0.01$). На вторые сутки количество клеток в культурах опытной группы снизилось относительно контрольных значений на 29%. Одновременно с нарастанием разницы между показателями групп по оцениваемым параметрам отмечено и возрастание уровня статистической значимости ($p < 0.001$).

На заключительном этапе эксперимента тенденция к динамическому снижению количества клеток под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL* в культурах клеток рабдомиосаркомы человека

сохранилась. При этом в опытной группе определено снижение количества клеток относительно контрольных значений более чем на 42% при высокой статистической значимости выявленного отклонения ($p < 0.001$).

Представленные результаты могут свидетельствовать о том, что ингибция темпов роста трансформированных клеток линии Rd постепенно нарастает в течение периода наблюдения. Ограничение периода наблюдения 3-суточным интервалом связано с особенностями метода построения кривых роста. Культивирование опухолевых клеток на одной культуральной поверхности имеет свои временные рамки, связанные с необходимостью проведения вмешательств, направленных на поддержание оптимальных условий культивирования клеточных линий, таких как смена среды и пересев клеток на большую культуральную поверхность. Все это способно внести существенную ошибку в результирующие показатели кривых роста.

Обобщая выявленные количественные данные по значениям кривых роста, был произведен расчет периода удвоения клеток в культурах контрольной и опытной групп, составивший в контрольной группе 23.2 часа, а в опытной – 31.8 часа. Тем самым, расчетный показатель пролиферативной активности клеток опытной группы превысил контрольные значения на 37%.

3.2 Оценка результатов МТТ-теста

Другим распространенным способом, характеризующим свойства культивируемых клеток, является МТТ-тест, в ходе которого проводится оценка превращения красителя МТТ в нерастворимые в воде кристаллы формаза под влиянием оксидоредуктазных ферментов клетки. Измерения проводили трехкратно в течение 72-часового интервала. Тем самым, основываясь на исследовании метаболической активности клеток в динамике, сделана попытка оценки влияния гиперэкспрессии гена *KL* на изменение жизнеспособности клеток эмбриональной рабдомиосаркомы.

Результаты МТТ-теста в контрольной группе продемонстрировали постепенное повышение исследуемого показателя, что подтверждает воспроизводимость и адекватность примененного метода. Динамические изменения интенсивности образования кристаллов формазана в культуре клеток линии Rd характеризуются повышением оцениваемого показателя ко вторым суткам практически до 0.7. На заключительном этапе показатель оптической плотности (ОП₅₇₀) в контрольной группе составил 0.97 (таблица 2).

Таблица 2 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.37 ± 0.01	-11.22	= 0.030
Опытная	24	30	0.33 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.68 ± 0.03	-38.59	< 0.001
Опытная	48	30	0.42 ± 0.02		
Контрольная	72	30	0.97 ± 0.04	-16.31	= 0.002
Опытная	72	30	0.81 ± 0.03		

Между тем, гиперэкспрессия *KL*, вызванная трансфекцией клеток Rd плазмидной конструкцией (Addgene plasmid #17713), индуцировала поэтапное снижение метаболической активности. Первоначальное снижение оцениваемого показателя, превысившее 11% ($p = 0.03$) от контрольных значений, ко вторым суткам наблюдения составило практически 39%. Нарастание различий исследуемого показателя между группами сравнения подтверждается и повышением уровня статистической значимости ($p < 0.001$).

Однако различия между группами, выявленные через 72 часа после липофекции, показали уменьшение процента отклонения ферментативной активности клеток культур опытной группы. Выявленные различия между группами составили 16.3% при некотором снижении уровня статистической

значимости ($p = 0.002$). Возможный вариант интерпретации данной особенности состоит в том, что культуры контрольной группы, исчерпав площадные ресурсы культуральной поверхности, перешли на фазу «плато» и к 3-м суткам исследования снизили темпы роста. Культуры опытной группы отставали в росте и, обладая большим резервом свободной площади культуральной поверхности, получили преимущество в темпах роста на заключительном сроке исследования.

Исключая описанную особенность выполнения теста, можно наблюдать общую тенденцию, выявленную при анализе темпов клеточного роста и МТТ-теста, результаты которых хорошо согласуются между собой. По-видимому, оба теста отображают феномен влияния индуцированной гиперэкспрессии *KL* на опухолевые клетки. Важно также отметить, что изменения, выявленные с помощью МТТ-теста, основываются на изменении активности клеточных оксидоредуктаз. Полученные результаты, тем самым, могут свидетельствовать об изменении напряженности окислительно-восстановительных процессов в клетках рабдомиосаркомы под влиянием гиперэкспрессии *KL*.

3.3 Оценка интенсивности биоредукции резазурина клетками Rd

Добавление в культуры жизнеспособных клеток окисленной формы красителя резазурин сопровождается биоредукцией красящего соединения путем его восстановления ферментативным аппаратом клеток. Определяющую роль данной реакции, так же как и с МТТ-тестом, играют оксидоредуктазы клетки. Однако отличительной особенностью реакции с резазурином является исключение вклада ряда методических особенностей (ограничение по площади культуральной поверхности, количеству клеток и продолжительности культивирования) в результат исследования. Для объективизации различий результаты оценивали только на первые сутки

после трансфекции как отношение спектрофотометрического показателя биоредукции окисленной формы резазурина к количеству клеток в культурах.

Как следует из данных таблицы 3, обе группы исследований включали по 30 повторностей. Данные представлены как отношение оптической плотности к количеству клеток.

Таблица 3 – Количественные значения оценки биоредукции окисленной формы резазурина клетками линии Rd

Группа	Объем выборки	ОП ₆₀₀ /10 ⁶ клеток, М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	30	12.14 ± 0.19	-5.77	= 0.02
Опытная	30	11.44 ± 0.22		

По результатам исследования опытная группа продемонстрировала статистически значимое снижение способности опухолевых клеток к восстановлению окисленной формы резазурина почти на 6% относительно контрольных значений ($p = 0.02$).

Тем самым, настоящий эксперимент может подтверждать гипотезу о влиянии гиперэкспрессии гена *KL* на клеточные оксидоредуктазы. Между тем, в отличие от МТТ, резазуриновый тест предполагал соотнесение полученных результатов не на единицу площади культуральной поверхности, а на количество клеток в культурах. Эта особенность минимизирует флуктуацию исследуемых параметров и способствует более точной оценке изменений ферментативной активности. Кроме того, исследование биоредукции резазурина и МТТ-тест имеют и свои отличия: восстановлению резазурина сопутствует отщепление кислорода, тогда как в ходе реакции с МТТ разрывается связь между атомами азота. Тем самым, результаты данных тестов качественно дополняют друг друга.

Выявленная вовлеченность оксидоредуктазных ферментов клетки в реализацию действия *KL* на опухолевые клетки обозначает горизонты

дальнейших исследований. Напряженность окислительно-восстановительных реакций во многом определяет гомеостаз клетки, отражаясь на важнейших показателях клеточной жизнеспособности.

3.4 Исследование общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в клетках линии Rd

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) является одним из ферментов, реализующих внутриклеточную гликолитическую активность. Как известно, ЛДГ способствует превращению пирувата в молочную кислоту в ходе 11-й реакции гликолиза. Между тем, интенсивность протекания данной реакции в злокачественно трансформированных клетках может претерпевать существенные изменения. Стоит отметить, что суммарная изоформентативная активность ЛДГ также может свидетельствовать об общей напряженности окислительно-восстановительных внутриклеточных процессов, поэтому результаты данного теста качественно дополняют предыдущие эксперименты.

Как следует из таблицы 4, объем выборок как контрольной, так и опытной групп составил 18 наблюдений. Данные оптической плотности, соответствующие уровню ЛДГ в культурах, соотнесены с количеством клеток. Исследуемый показатель в контрольной группе составил $23.1 \text{ ОП}_{490} / 10^6$ клеток, а в опытной – $20.9 \text{ ОП}_{490} / 10^6$ клеток.

Таблица 4 – Количественные значения оценки относительного количества общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в культурах Rd

Группа	Объем выборки	$\text{ОП}_{490} / 10^6$ клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	18	23.10 ± 0.72	-9.42	= 0.03
Опытная	18	20.93 ± 0.66		

Результаты данного эксперимента свидетельствуют о статистически значимом снижении активности ЛДГ в цитоплазме клеток рабдомиосаркомы под влиянием индуцированной гиперэкспрессии гена секретируемой формы *KL*. Количественные показатели уровня ЛДГ в культурах опытной группы оказались ниже контрольных значений более чем на 9% ($p = 0.03$).

Тем самым, полученные результаты подтверждают вовлеченность изменений активности окислительно-восстановительных реакций в реализацию противоопухолевого эффекта индуцированной гиперэкспрессии гена секретируемой формы *KL*.

3.5 Оценка интенсивности синтеза ДНК в клетках линии Rd

Результаты анализа построенных кривых роста, а также выявленные механизмы влияния гиперэкспрессии *KL* на ферментативные процессы в клетках эмбриональной рабдомиосаркомы могут предполагать задействованность и пролиферативных процессов в реализации противоопухолевого действия *KL*.

Исследование механизмов ингибирования пролиферативной активности клеток линии Rd под влиянием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* производилось с применением метода определения включения в клетки меченой по тритию селективной метки ДНК – 5-метил-³H-тимидина. Радиоактивность клеточных культур выражали в показателе Бк / 10⁶ клеток.

Выборка каждой группы включала по 8 повторных наблюдений (таблица 5). Снижение пролиферативной активности опухолевых клеток под влиянием гиперэкспрессии *KL* составило 8.42% от контрольных показателей ($p = 0.02$).

Подавление включения ³H-тимидина в ДНК в клетках опытной группы демонстрирует снижение пролиферативной активности клеток

рабдомиосаркомы человека линии Rd в условиях индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*.

Таблица 5 – Количественные значения оценки относительной интенсивности синтеза ДНК в культурах клеток линии Rd

Группа	Объем выборки	Синтез ДНК, М ± m, Бк / 10 ⁶ клеток	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	8	3763.71 ± 87.68	-8.42	= 0.02
Опытная	8	3446.64 ± 80.70		

3.6 Оценка активности апоптотических процессов

Количество клеток, а также показатели, регистрируемые при проведении МТТ-теста, могут зависеть не только от интенсивности пролиферативных и метаболических процессов в клеточных культурах, но и от гибели культивируемых клеток. Между тем, подавление интенсивности процессов, лежащих в основе программируемой гибели клеток, является характерной чертой опухолевых клеток и обеспечивает их неконтролируемый рост. В связи с этим, предпринята попытка оценки влияния гиперэкспрессии *KL* на апоптотические механизмы.

В ходе исследования определяли долю клеток с повышенной ферментативной активностью каспаз, занимающих ключевую позицию в инициации и реализации программируемой клеточной гибели и используемые в качестве маркера апоптоза. В настоящем исследовании использовали флуоресцентную метку, связывающуюся с белками семейства каспаз.

Оценивали количество клеток с повышенной каспазной активностью, приходящееся на общее количество клеток культуры. В контрольной группе в апоптозе обнаружено 34 на 10³ культивируемых клеток, тогда как под действием проведенной генетической коррекции конструкцией с геном *KL*

клеток линии Rd определено повышение числа клеток с высокой активностью каспаз до 51.7 на 10^3 клеток (таблица 6). Столь существенное увеличение доли клеток, находящихся в апоптозе, сопровождается высокой статистической значимостью ($p < 0.001$) различий между группами.

Таблица 6 – Количество клеток, обладающих повышенной активностью каспаз, в культурах клеток линии Rd

Группа	Объем выборки	Клетки в апоптозе / 10^3 клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	30	33.95 ± 1.13	51.38	< 0.001
Опытная	30	51.68 ± 1.53		

На основании представленных данных можно предположить, что индукция программируемой клеточной гибели является одним из путей реализации противоопухолевого эффекта гена *KL* на культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd.

3.7 Заключение

Проведенные исследования позволили зарегистрировать ряд эффектов влияния индуцированной плазмидным вектором гиперэкспрессии *KL* на жизнеспособность и характеристики роста клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd. Результаты экспериментов приближают нас к пониманию явлений, которые лежат в основе механизмов реализации противоопухолевого действия гена *KL*.

Феномен влияния *KL* на характеристики роста клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd первоначально оценивали методом построения кривых роста, который позволил выявить общую направленность эффекта на протяжении временного диапазона динамических наблюдений. Уже на первой временной точке (24 часа после трансфекции) определялось значимое снижение количества опухолевых клеток под влиянием

гиперэкспрессии *KL*. При этом в течение периода наблюдения выявлена тенденция к увеличению различий в количестве клеток между опытной и контрольной группами (рисунок 3). Так, через трое суток после завершения воздействия на клетки трансфекционной смеси разница в группах превысила 40%. При этом средний период удвоения в опытной группе превысил контрольные значения на 37%. Тем самым, выявленная закономерность может быть описана как равномерное ингибирование темпов роста трансфецированных клеток.

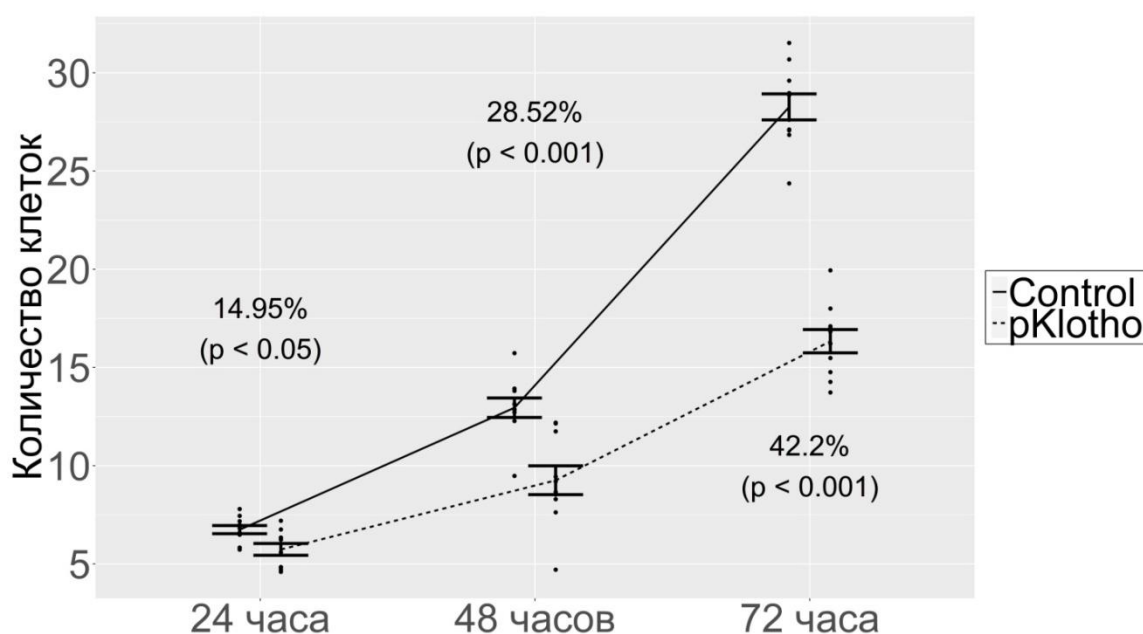


Рисунок 3 – Кривые роста.

Сравнение контрольной и опытной групп по кривым роста культур клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd, количество клеток $\times 10^3 / \text{см}^2$, $M \pm m$.

Немаловажная закономерность выявляется при отдельном расчете периода удвоения для двух временных диапазонов: с 24 до 48 часов и с 48 до 72 часов. В контрольной группе расчетные значения составили 25.51 и 21.32, в опытной – 34.77 и 29.29, соответственно. Как следует из представленных данных, опытная группа имела большие периоды удвоения клеточных

культур в сравнении с контрольными значениями на всем протяжении периода наблюдения.

Подтверждение влияния индуцированной гиперэкспрессии *KL* на характеристики роста клеток линии Rd получено посредством МТТ-теста (рисунок 4). Результаты МТТ-теста для культуры эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd, в целом, близки данным кривых роста.

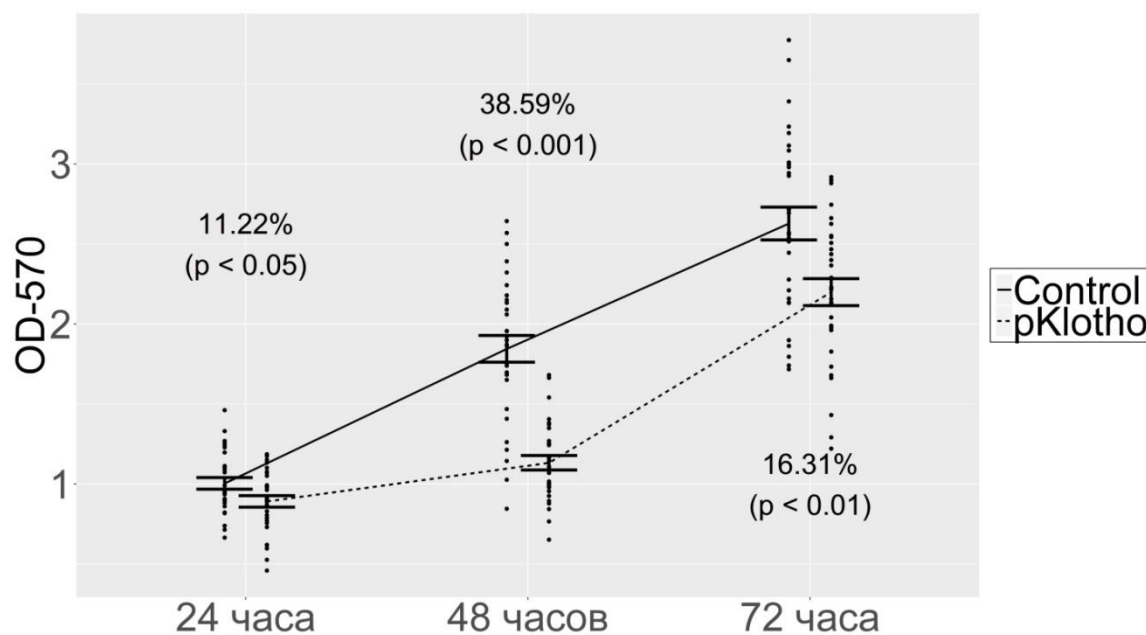


Рисунок 4 – МТТ-тест.

Влияние гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd, ОП₅₇₀, М ± m.

Статистически значимый эффект регистрируется уже на первые сутки исследований, когда ингибирующее действие гиперэкспрессии *KL* на жизнеспособность опухолевых клеток превысило 10%. Ко вторым суткам исследований разница между показателями опытной и контрольной групп оказалась близкой к 40%. Однако к третьим суткам исследований наблюдается снижение диапазона различий до 16%. Данное обстоятельство находит логичное объяснение в методологии эксперимента. Так, культуры контрольной группы, обладая большим пролиферативным потенциалом,

достигали фазы «плато» к третьим суткам и снижали темпы роста, в отличие от культур опытной группы, рост которых был менее интенсивен, а выход на фазу «плато» смещен на поздние сроки. Данная особенность не наблюдалась на кривых роста, так как для построения кривых роста клетки высаживали в культуральные флаконы площадью 25 см² (Orange, Бельгия), тогда как для МТТ-теста клетки пассировали на 96-луночные планшеты. В последнем случае использовали большую посевную концентрацию в связи с особенностями техники липосомальной трансфекции на различающихся по площади культуральных поверхностях.

На точечной диаграмме, представляющей результаты МТТ-теста, можно заметить больший разброс значений, чем для данных кривых роста. Это может быть обусловлено меньшим количеством клеток в культурах, анализируемых методом МТТ-теста. Тогда как с ростом числа наблюдений в количественной переменной закономерно снижается показатели ее дисперсии.

МТТ-тест может свидетельствовать об изменении в культурах клеток активности оксидоредуктазных ферментов. Согласованность результатов МТТ-теста и кривых роста может зависеть как от количества клеток, так и от активности в клетках отдельных ферментативных комплексов.

Результаты анализа кривых роста и МТТ-теста свидетельствуют о статистически значимом влиянии гиперэкспрессии *KL* на характеристики роста клеточных культур уже на 1-е сутки исследований. Поэтому последующие эксперименты включают однократные наблюдения, проведенные через 24 часа после трансфекции.

Для оценки вовлеченности окислительно-восстановительных процессов в реализацию противоопухолевого эффекта гена *KL* был проведен резазуриновый тест, позволивший оценить изменение активности клеточных оксидоредуктаз под влиянием гиперэкспрессии *KL*. При этом зарегистрировано статистически значимое снижение восстановительной

способности клеток рабдомиосаркомы линии Rd почти на 6% относительно контроля (рисунок 5А).

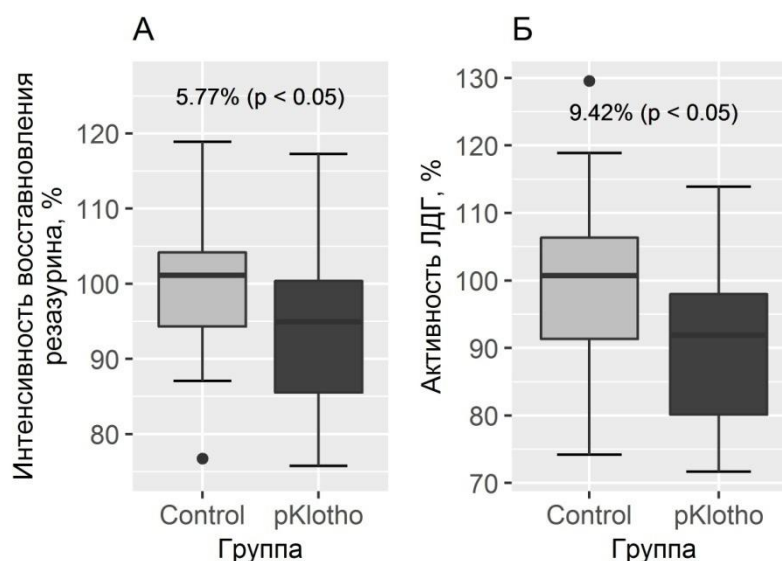


Рисунок 5 – Влияние гиперэкспрессии *KL* на активность окислительно-восстановительных реакций клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd.

А – оценка биоредукции окисленной формы красителя резазурина, %; Б – оценка активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), %.

Как известно, резазуриновый тест, как и МТТ-тест, демонстрирует изменения активности окислительно-восстановительных процессов клетки. Стоит отметить, что изменения окислительно-восстановительного потенциала клеток может находить свое отражение в работе разных ферментативных комплексов. Так, например, 11-ая реакция гликолиза, в ходе которой происходит обратимое превращение пирувата в лактат, взаимосвязана с балансом соединений НАДН-НАД⁺. В связи с этим представляет интерес влияние индуцированной гиперэкспрессии *KL* на общую активность внутриклеточных ЛДГ. Между тем, результаты исследований демонстрируют снижение активности ЛДГ под влиянием гиперэкспрессии *KL* на 9.5% относительно контроля (рисунок 5Б).

Снижение пролиферативной активности в культурах клеток линии Rd под влиянием гиперэкспрессии *KL*, выявленное первоначально по динамике изменений количества клеток в культурах по данным кривых роста, подтверждено исследованием интенсивности синтеза ДНК. Так, включение в макромолекулы клетки радиоактивно меченого по тритию селективного предшественника ДНК (5-метил-³H-тимидина) продемонстрировало снижение способности клеток опытной группы к синтезу ДНК более чем на 8% (рисунок 6А).

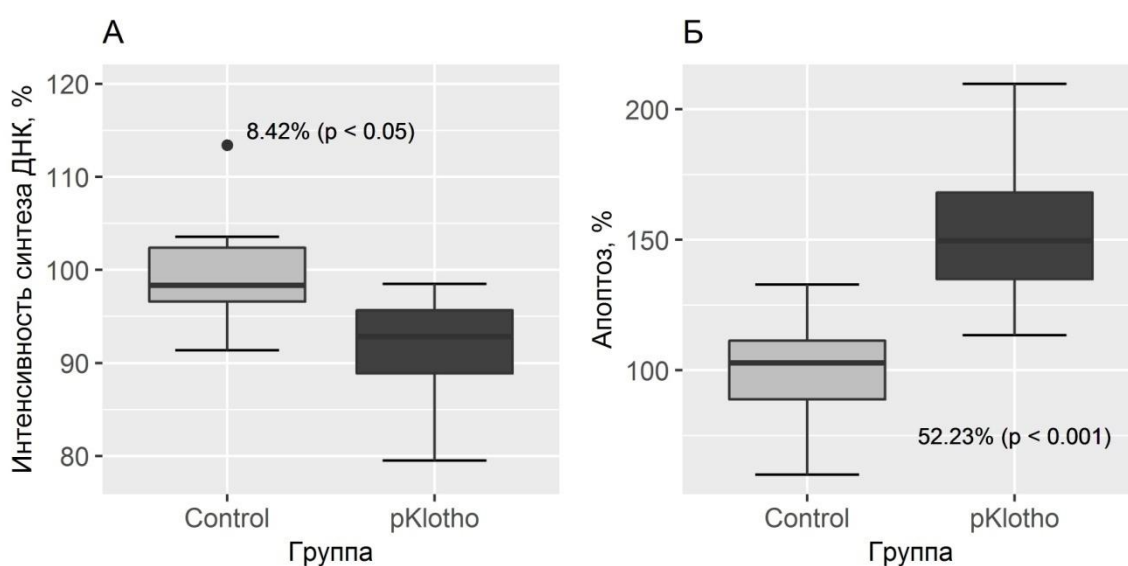


Рисунок 6 – Влияние гиперэкспрессии *KL* на механизмы пролиферации и программируемой гибели в клетках эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd.

А – сравнение интенсивности синтеза ДНК в группах исследования, выявленной методом включения ³H-тимидина, %; Б – сопоставление относительного количества клеток с повышенной активностью каспаз, %.

Между тем, важным механизмом реализации противоопухолевого действия гена *KL* на клетки рабдомиосаркомы следует также считать индукцию программируемой клеточной гибели. Результаты оценки активности апоптотических процессов в культурах клеток рабдомиосаркомы под влиянием гиперэкспрессии *KL* позволили выявить увеличение доли

клеток с повышенной активностью каспаз более чем в полтора раза в сравнении с контрольными показателями (рисунок 6Б).

Представленные данные демонстрируют комплексное и разностороннее действие гена *KL* на опухолевый рост. В исследовании показано влияние *KL* на важнейшие характеристики клеточного гомеостаза, включающие не только изменения пролиферативной активности и метаболического профиля, но и механизмы индукции программируемой гибели клеток.

ГЛАВА 4

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ ЛИНИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Диагноз опухоли головного мозга и других отделов центральной нервной системы в России в 2017 году поставлен 8844 пациентам, а показатель заболеваемости на 100000 населения равен 6.02. При этом на протяжении последнего времени отмечается стойкая тенденция прироста заболеваемости онкологическими заболеваниями данной локализации: среднегодовой темп прироста по данным 2007-2017гг. составляет 3.13%. Одновременно повышаются и показатели смертности вследствие онкопатологии данной локализации, среднегодовой прирост которой, по данным 2007-2017 гг., составляет 2.06% [1].

Одной из наиболее распространенных и высоко агрессивных нозологических форм данной локализации является глиобластома. Заболевание характеризуется неблагоприятным прогнозом и низкими показателями пятилетней выживаемости. В связи с этим, высокую актуальность приобретает проблема понимания процессов, лежащих в основе развития данной группы онкологических заболеваний.

4.1 Исследование кривых роста клеток линии A-172

Отправной точкой исследований послужило построение и анализ кривых роста клеток глиобластомы человека под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL*. Динамические изменения характеристик роста культур клеток наблюдали в течение 3-х суточного интервала, включающего 3 подсчета: через 24, 48 и 72 часа после трансфекции.

Культуры клеток глиобластомы продемонстрировали постепенное нарастание количества клеток в течение периода наблюдения. При первом подсчете, проведенном через 24 часа после трансфекции в культурах было выявлено, в среднем, 6.81×10^3 клеток на см^2 площади культуральной поверхности. Ко 2-м суткам исследования оцениваемый показатель достиг значения 14.99×10^3 клеток / см^2 , превысив на заключительном этапе порог в 32×10^3 клеток / см^2 (таблица 7).

Таблица 7 – Количественные значения кривых роста, построенные при исследовании культуры клеток глиобластомы человека линии А-172

Группа	Время, час	Объем выборки	Кол-во клеток, $10^3/\text{см}^2$, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	10	6.81 ± 0.23	4.13	= 0.631
Опытная	24	10	7.09 ± 0.26		
Контрольная	48	10	14.99 ± 0.41	-14.13	= 0.002
Опытная	48	10	12.87 ± 0.73		
Контрольная	72	10	32.60 ± 0.87	-27.36	< 0.001
Опытная	72	10	23.68 ± 1.05		

В свою очередь, культуры, в которых была индуцирована гиперэкспрессия гена *KL*, на 1-е сутки показали значения, превышающие контрольные показатели на 4%. Однако данное различие не подтверждается уровнем статистической значимости ($p = 0.6$). Поскольку одна из групп исследования имела ненормальное распределение, статистическая оценка различий групп проводилась по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

При подсчете, проведенном через 48 часов после трансфекции, в опытной группе зарегистрировано снижение количества клеток на 14% ($p = 0.002$). Дальнейшее динамическое наблюдение привело к выявлению нарастания различий между группами. При этом на заключительном этапе эксперимента отмечено снижение количества клеток, в среднем,

превысившее 27% ($p < 0.001$). Уменьшение p -значения подтверждает данную тенденцию.

4.2 Оценка результатов МТТ-теста

Культуры клеток глиобластомы человека также подвергали исследованию жизнеспособности посредством МТТ-теста. В контрольной группе исследуемый показатель оптической плотности (OP_{570}) имел тенденцию к постепенному нарастанию. На первые сутки культуры контрольной группы показали значения умеренной интенсивности образования кристаллов формазана: $OP_{570} = 0.27$. Через 48 часов после трансфекции средние значения оптической плотности возросли до 0.46, а к третьим суткам достигли отметки в 0.91 (таблица 8).

Таблица 8 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии А-172

Группа	Время, час	Объем выборки	$OP_{570}, M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.27 ± 0.01	2.22	= 0.760
Опытная	24	30	0.28 ± 0.02		
Контрольная	48	30	0.46 ± 0.03	-4.75	= 0.557
Опытная	48	30	0.44 ± 0.02		
Контрольная	72	30	0.91 ± 0.04	-40.90	< 0.001
Опытная	72	30	0.54 ± 0.05		

Между тем, выявленный эффект гиперэкспрессии *KL* может быть охарактеризован нарастанием различий в течение периода наблюдения. При первом подсчете существенной разницы определено не было, на 2-е сутки исследований различия между группами составили менее 5% ($p = 0.56$). На завершающем этапе эксперимента отклонение в исследуемом показателе в опытной группе превысило 40% при высоком уровне статистической значимости ($p < 0.001$).

Таким образом, результаты данных исследований свидетельствуют о выраженной и постепенно нарастающей тенденции к подавлению жизнеспособности клеток линии А-172 под влиянием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*. Однако причины зарегистрированного эффекта остаются не ясными, так как они могут быть связаны как с изменением пролиферативной активности и, следовательно, количества клеток в культурах, так и с подавлением активности оксидоредуктазных ферментов клеток. Для конкретизации данного немаловажного аспекта был проведен резазуриновый тест.

4.3 Оценка интенсивности биоредукции резазурина клетками линии А-172

В качестве способа оценки активности оксидоредуктаз в клетках глиобластомы, свободного от влияния изменений количества клеток в культурах использован резазуриновый тест, в котором показатель активности окислительно-восстановительных реакций, выявленный по оптической плотности ($ОП_{600}$), соотносился с количеством клеток в культурах. Результаты представлены в виде отношения – $ОП_{600} / 10^6$ клеток.

Группы сравнения включали по 30 повторных измерений. Исследуемый показатель в контрольной группе, в среднем, составил $14.27 ОП_{600} / 10^6$ клеток, тогда как в опытной группе аналогичный показатель равнялся 12.99 (таблица 9).

Таблица 9 – Количественные значения оценки биоредукции окисленной формы резазурина клетками линии А-172

Группа	Объем выборки	$ОП_{600}/10^6$ клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	30	14.27 ± 0.11	-8.91	< 0.001
Опытная	30	12.99 ± 0.19		

Как следует из таблицы 9, разница между группами составила почти 9% ($p < 0.001$). Тем самым, настоящий эксперимент подтверждает предположение о вовлеченности клеточных оксидоредуктаз в противоопухолевый эффект гиперэкспрессии *KL*.

4.4 Исследование общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в клетках линии A-172

Результаты МТТ и резазуриновго теста позволяют предполагать влияние *KL* на активность окислительно-восстановительных процессов в клетках глиобластомы. Изменения данного показателя клеточного гомеостаза может отражаться на активности общей внутриклеточной ЛДГ, суммарная активность которой зависит от напряженности внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов. В свою очередь, исследование активности внутриклеточной лактатдегидрогеназы позволяет получить более полную картину ферментативных изменений опухолевых клеток под влиянием гиперэкспрессии *KL*.

Как представлено в таблице 10, группы сравнения представлены 18 повторными измерениями. Измерения проводились однократно, через 24 часа после трансфекции. Результаты представлены в виде соотношения оптической плотности, свидетельствующей об уровне активности ЛДГ, и количества клеток. Среднее значение, продемонстрированное контрольной группой, составило $19.96 \text{ ОП}_{490} / 10^6$ клеток, тогда как в опытной группе средний выявленный показатель равнялся $17.36 \text{ ОП}_{490} / 10^6$ клеток.

Таким образом, в эксперименте было зарегистрировано снижение активности ЛДГ в клетках глиобластомы под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL* более чем на 13%. Различия между группами подтверждаются и уровнем статистической значимости ($p < 0.001$), выявленной посредством использования Т-критерия Стьюдента по

логарифмированной зависимой переменной, так как при анализе было выявлено лог-нормальное распределение.

Таблица 10 – Количественные значения оценки относительного количества общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в культурах клеток линии А-172

Группа	Объем выборки	ОП ₄₉₀ / 10 ⁶ клеток, М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	18	19.96 ± 0.46	-13.04	< 0.001
Опытная	18	17.36 ± 0.56		

4.5 Оценка интенсивности синтеза ДНК в клетках линии А-172

Результаты, полученные при анализе кривых роста, свидетельствуют о снижении количества клеток в культурах под влиянием гиперэкспрессии гена *KL*. Возможным объяснением зарегистрированного эффекта служит ингибирование пролиферативной активности клеток глиобластомы. Такое предположение является закономерным на фоне исследований, результаты которых продемонстрировали ингибирование метаболической активности клеток, проявляющееся подавлением окислительно-восстановительных процессов.

Пролиферативную активность в культурах клеток глиобластомы оценивали методом включения радиоактивно меченой молекулы-предшественника нуклеотида – 5-метил-³H-тимидина. Результаты представлены как отношение количества распадов изотопа за 1 секунду к количеству клеток в культурах. Объем выборки в контрольной группе составил 8 повторностей, которые, в среднем, продемонстрировали значения исследуемого показателя на уровне 2419 Бк / 10⁶ клеток (таблица 11).

Таблица 11 – Количественные значения оценки относительной интенсивности синтеза ДНК в культурах клеток линии А-172

Группа	Объем выборки	Синтез ДНК, $M \pm m$, Бк / 10^6 клеток	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	8	2418.68 ± 254.87	-56.61	< 0.001
Опытная	12	1049.58 ± 54.10		

Между тем, в клетках глиобластомы под влиянием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* исследуемый показатель составил почти 1050 Бк / 10^6 клеток. Тем самым, зарегистрировано снижение пролиферативной активности в клетках опытной группы более чем на 56% относительно контрольных значений. В связи с тем, что одна из групп сравнения не удовлетворяет критериям нормальности распределения, оценка статистической значимости различий проводилась по непараметрическому тесту Манна-Уитни. Сравнение по ранжированной зависимой переменной показало высокую статистическую значимость ($p < 0.001$).

4.6 Оценка активности апоптотических процессов

Для оценки апоптотических ферментов объем выборки в контрольной группе составил 24 повторных подсчета, а в опытной – 19. Измерения проведены через 24 часа после трансфекции. В среднем, количество клеток, находящихся в апоптозе, в контрольной группе оказалось равно 51.2 на 10^3 клеток культуры, а в опытной группе – 93.8 на 10^3 клеток культуры (таблица 12).

Таблица 12 – Количество клеток, обладающих повышенной активностью каспаз, в культурах клеток линии А-172

Группа	Объем выборки	Клетки в апоптозе / 10^3 клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	51.21 ± 1.37	83.13	< 0.001
Опытная	19	93.78 ± 3.53		

Таким образом, в исследовании было зарегистрировано повышение активности апоптотических процессов в культуре клеток глиобластомы под влиянием гиперэкспрессии *KL* более чем на 80%. Различия сопровождаются высокой степенью статистической значимости ($p < 0.001$).

Тем самым, изменения количества клеток, отмеченные при анализе кривых роста, могут являться следствием не только ингибирования пролиферативной активности, но и индукции программируемой клеточной смерти.

4.7 Заключение

Проведенная экспериментальная работа позволила зарегистрировать эффект влияния индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* на культуру клеток глиобластомы человека, а также выявить механизмы реализации противоопухолевого действия исследуемого гена. Стоит отметить, что представленные результаты в принципиальных позициях близки результатам, полученным при исследовании влияния *KL* на клетки рабдомиосаркомы. Отличия же затрагивают интенсивность и статистическую значимость полученных эффектов, а также уровень вовлеченности отдельных механизмов.

Первое приближение к пониманию выраженности противоопухолевого эффекта гиперэкспрессии *KL* на клетках линии A-172 осуществлено посредством построения и анализа кривых роста. Культура клеток глиобластомы характеризуется постепенным нарастанием интенсивности прибавки количества клеток. При этом подсчет, проведенный на 2-е сутки после трансфекции, предоставляет количественные значения оценки исследуемого показателя, занимающие срединное положение на кривой

роста. Из этого следует, что культуры клеток не испытывали ресурсных ограничений для клеточного роста (рисунок 7).

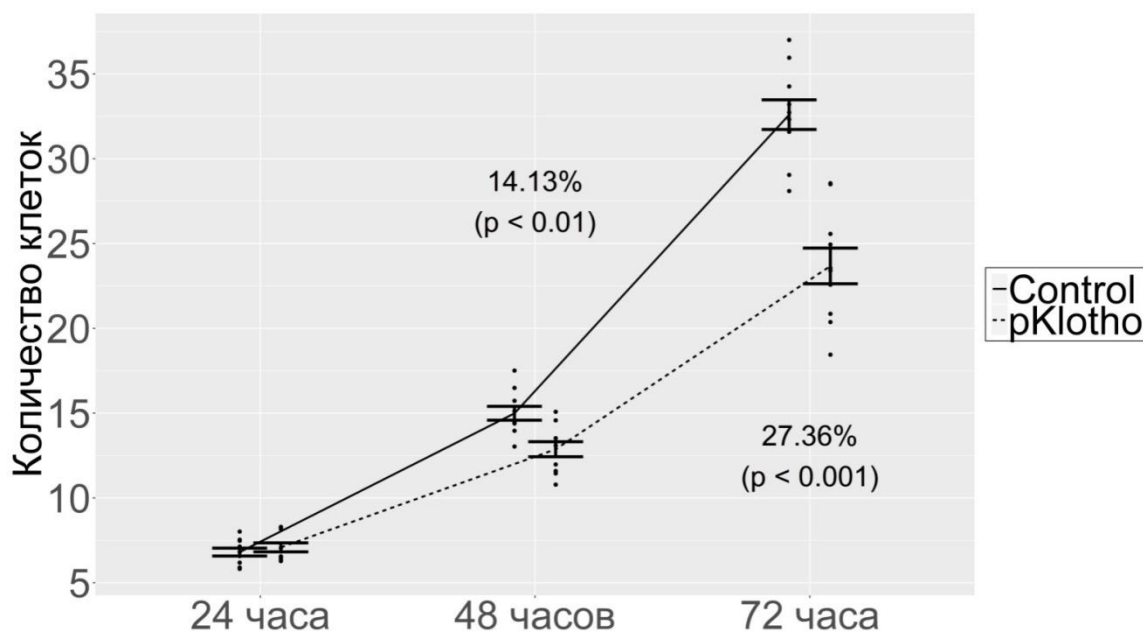


Рисунок 7 – Кривые роста.

Сравнение контрольной и опытной групп по кривым роста культур клеток глиобластомы человека линии A-172, количество клеток $\times 10^3 / \text{см}^2$, $M \pm m$.

Между тем, графические данные, представленные на диаграмме, иллюстрируют существенное (более 14%) и статистически значимое ($p < 0.01$) снижение количества клеток в культурах под влиянием гиперэкспрессии *KL*. Обращает на себя внимание нарастание различий между группами в течение периода наблюдения. Так, через 72 часа после генетической коррекции значения опытной группы демонстрируют снижение относительно контроля уже более чем на 27%. Одновременно с этим нарастает и уровень статистической значимости ($p < 0.001$). Обобщает полученные результаты расчетный показатель периода удвоения клеточной культуры, составивший в контрольной группе 21.24 часа, а в опытной – 27.58 часа.

Выявленные различия в количестве клеток могут быть обусловлены изменением митотической активности и гибелью клеток. Однако найденные различия требуют дополнительной проверки методологически отличающимся способом. В качестве такого вспомогательного метода использован МТТ-тест, при котором оценивается метаболическая активность оксидоредуктазных ферментов, прежде всего, НАДФ-Н-зависимых.

Культуры клеток линии А-172 показали постепенное динамическое нарастание активности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз, тогда как под влиянием гиперэкспрессии *KL* исследуемый показатель существенно снижается к концу периода наблюдения (рисунок 8). Стоит отметить, что методологическая особенность проведенного исследования связана с оценкой ферментативной активности относительно площади культуральной поверхности. Достоверность полученных результатов повышает независимая оценка отношения активности оксидоредуктазных ферментов к количеству клеток в культурах.

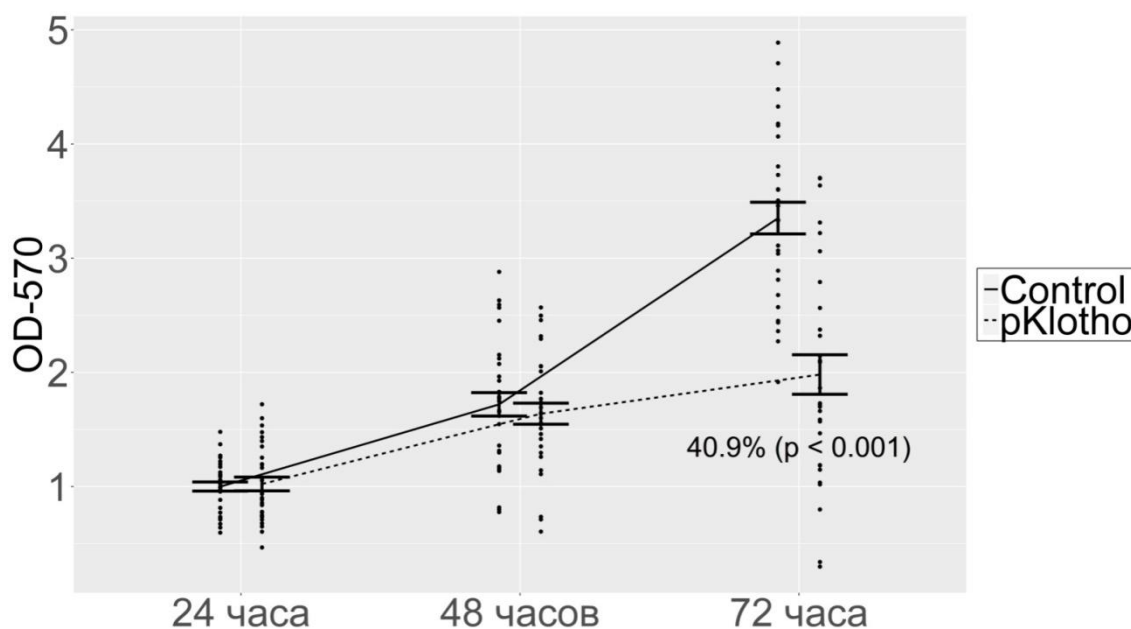


Рисунок 8 – МТТ-тест.

Влияние гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста клеток глиобластомы человека линии А-172, ОП₅₇₀, М ± m.

Для подтверждения предположения о вовлеченности клеточных оксидоредуктаз в реализацию противоопухолевого эффекта гиперэкспрессии *KL* был проведен резазуриновый тест, результаты которого соотносятся с количеством клеток в культурах. Тем самым, данный тест представляет более точные данные об изменениях активности исследуемых ферментативных комплексов. Результаты проведенного исследования представлены на диаграмме (рисунок 9А) и свидетельствуют о вовлеченности клеточных оксидоредуктаз в реализацию эффектов гена *KL*.

Изменения напряженности окислительно-восстановительных процессов клетки находят, в свою очередь, отражение в активности внутриклеточной ЛДГ (рисунок 9Б), продемонстрировавшей снижение в опытной группе на 13% относительно контроля ($p < 0.001$). Тем самым, можно заключить, что гиперэкспрессия *KL* подавляет окислительно-восстановительный потенциал в опухолевых клетках линии А-172.

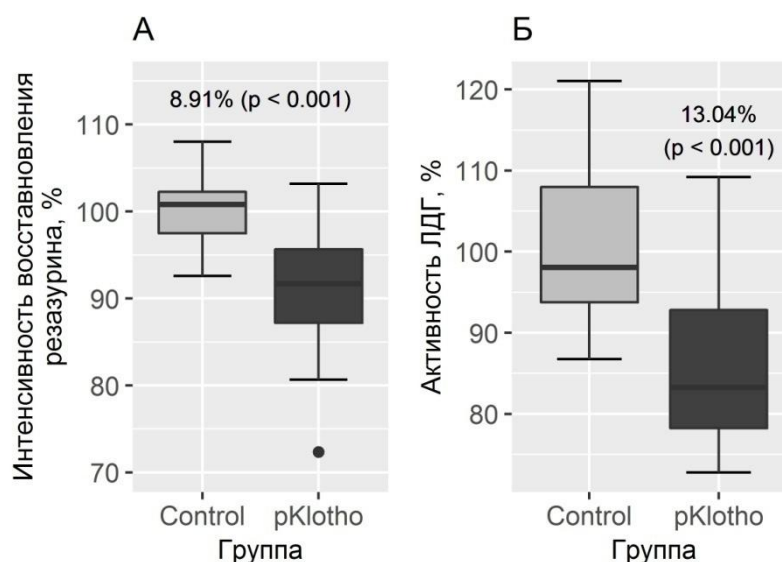


Рисунок 9 – Влияние гиперэкспрессии *KL* на активность окислительно-восстановительных реакций клеток глиобластомы человека линии А-172.

А – оценка биоредукции окисленной формы красителя резазурина, %; Б – оценка активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), %.

Между тем, изменения количества клеток, регистрируемое в культурах после трансфекции и отмеченное при анализе кривых роста, также требует более детального исследования причин, лежащих в основе данного эффекта. В связи с этим обращают на себя внимание результаты исследования пролиферативной активности, а также интенсивности процессов, лежащих в основе индукции программируемой гибели клеток. Как представлено на диаграммах, оба явления оказывают существенный вклад в механизмы противоопухолевого действия гиперэкспрессии *KL* на культурах клеток глиобластомы (рисунок 10А и 10Б).

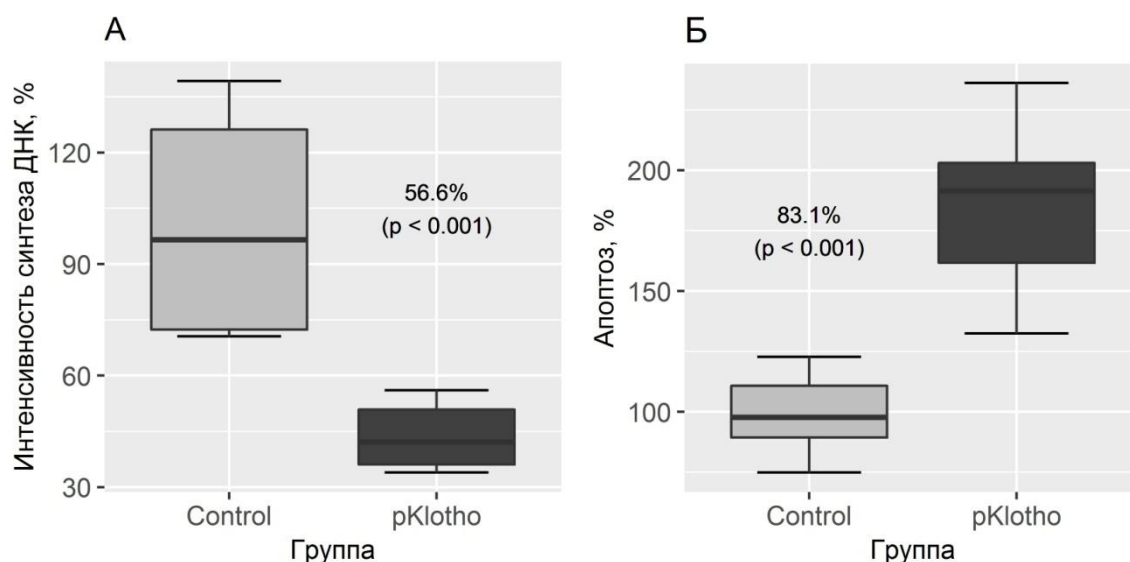


Рисунок 10 – Влияние гиперэкспрессии *KL* на механизмы пролиферации и программируемой гибели в клетках глиобластомы человека линии А-172.

А – сравнение интенсивности синтеза ДНК в группах исследования, выявленной методом включения ^3H -тимидина, %; Б – сопоставление относительного количества клеток с повышенной активностью каспаз, %.

В заключение можно отметить, что результаты проведенных исследований свидетельствуют о высокой чувствительности культур клеток линии А-172 к индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*. К механизмам

реализации противоопухолевого эффекта данного гена относятся: торможение пролиферативных процессов, угнетение окислительно-восстановительных реакций и индукцию апоптоза в опухолевых клетках.

ГЛАВА 5

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА *KLOTNO* НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ ЛИНИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

Как известно, рак толстого кишечника имеет высокую распространенность, занимая 2-е место по частоте встречаемости среди женщин, уступая лишь раку молочной железы, и 3-е место среди мужчин. В совокупности с высокой распространенностью, данное заболевание может быть охарактеризовано тяжестью течения, высокой степенью летальности и инвалидизации. Среди возможных локализаций наиболее часто (в 40% случаев) регистрируется ободочная кишка.

Заболевание можно отнести к возраст-зависимым, так как в большинстве случаев оно диагностируется у людей старше 50 лет. Этот факт делает данную нозологию интересной в отношении исследования противоопухолевой активности гена *KL*, экспрессия которого снижается с возрастом и обуславливает развитие целого ряда возраст-обусловленных заболеваний.

5.1 Исследование кривых роста клеток линии *Caco-2*

Построение кривых роста клеточных культур линии *Caco-2* позволило выявить влияние индуцированной гиперэкспрессии *KL* на жизнеспособность и характеристики роста исследуемых клеток. Подсчет клеток производился на 24, 48 и 72 часа после трансфекции. Объем выборки составил по 9 наблюдений для обеих групп по каждой временной точке.

Наблюдение за ростом клеточной культуры рака ободочной кишки в 3-х суточном интервале продемонстрировало тенденцию к постепенному нарастанию количества клеток. Для проведения эксперимента клетки

высаживали в посевной концентрации 8×10^3 клеток на см^2 культуральной поверхности флаконов. Через 24 часа после трансфекции количество клеток в культурах, в среднем, составляло $9.28 \times 10^3 / \text{см}^2$. Между тем, на 2-е и 3-е сутки исследования среднее количество клеток в культурах определено на уровне 12.97×10^3 и $24.44 \times 10^3 / \text{см}^2$, соответственно. Обращает на себя внимание неравномерность увеличения нарастания клеточной массы в исследуемом временном диапазоне. На первом временном интервале (с 24 по 48 часов) определено увеличение количества клеток на 40%, тогда как на втором (с 48 по 72 час) – превысило 88%. Данная особенность может свидетельствовать о постепенном нарастании темпов роста клеточной культурой Сасо-2. Возможно, воздействие комплекса поликатионных липидов трансфекционной смеси вызывает замедление перехода культур с лаг-фазы на фазу экспоненциального роста.

При первичном анализе кривой роста культур опытной группы определяется снижение количества клеток относительно контрольных значений на всем периоде наблюдения (таблица 13).

Таблица 13 – Количественные значения кривых роста, построенные при исследовании культуры клеток рака ободочной кишки человека линии Сасо-2

Группа	Время, час	Объем выборки	Кол-во клеток, $10^3/\text{см}^2$, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	9	9.28 ± 0.18	-8.37	= 0.022
Опытная	24	9	8.50 ± 0.24		
Контрольная	48	9	12.97 ± 0.30	-18.88	< 0.001
Опытная	48	9	10.52 ± 0.41		
Контрольная	72	9	24.44 ± 0.81	-8.86	= 0.079
Опытная	72	9	22.27 ± 0.82		

В соответствии с представленными табличными данными, при первом подсчете клеток, произведенном через 24 часа после трансфекции, количество клеток в опытной группе снизилось более чем на 8% по сравнению с контролем ($p = 0.022$). Ко 2-м суткам исследования различия

между групп возросли до 19%, согласно этому повысился и уровень статистической значимости ($p < 0.001$). Между тем, на 3-и сутки разница в количестве клеток между опытной и контрольной группами сократилась до 9% ($p = 0.08$). Тем самым, можно отметить, что опытная группа, аналогично контрольной, в течение периода наблюдения наращивала свой пролиферативный потенциал. Так, на интервале 24-48 часов зарегистрировано увеличение количества клеток только на 24%. Однако на последующем временном интервале (48-72 часа) количество клеток увеличилось уже на 112%.

Результаты анализа кривых роста свидетельствуют о неоднозначном влиянии гиперэкспрессии *KL* на клетки линии *Saco-2*. Снижение пролиферативной активности на первом этапе наблюдения, закономерно отражающееся на количестве клеток, сменяется в последующем восстановлением исследуемого показателя. Данное обстоятельство может быть проиллюстрировано на примере расчетных значений периода удвоения клеточной культуры. В контрольной группе период удвоения составил 34.35 часа, в опытной – 34.55. Из представленного следует, что маятникообразные колебания количества клеток в опытной группе, проявляющиеся сначала угнетением пролиферативной активности, а затем, наоборот, стимулированием. Поэтому значения периода удвоения в группах имеют очень низкие различия, не превышающие 0.2 часа.

5.2 Оценка результатов МТТ-теста

Для конкретизации противоречивых результатов, полученных при анализе кривых роста, был проведен другой общераспространенный исследовательский метод – МТТ-тест, в ходе которого проводится оценка превращения красителя МТТ в нерастворимые в воде кристаллы формазана под влиянием оксидоредуктаз клетки. Аналогично кривым роста,

исследованию подлежал 3-х суточный интервал, в течение которого производили 3 измерения: через 24, 48 и 72 часа после трансфекции.

В соответствии с результатами МТТ-теста исследуемый показатель оптической плотности характеризуется нарастанием в течение 72-часового периода наблюдения. Средний показатель оптической плотности при длине волны 570 нм ($ОП_{570}$) при первом подсчете составил 0.26, а ко вторым суткам повысился до 0.34. Через 72 часа после трансфекции $ОП_{570}$ в контрольной группе определена на более высоком уровне – 0.63 (таблица 14).

Таблица 14 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток рака ободочной кишки человека линии Сасо-2

Группа	Время, час	Объем выборки	$ОП_{570}, M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.26 ± 0.01	-21.24	< 0.001
Опытная	24	30	0.20 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.34 ± 0.01	-4.89	= 0.102
Опытная	48	30	0.32 ± 0.01		
Контрольная	72	30	0.63 ± 0.02	-10.23	= 0.064
Опытная	72	30	0.56 ± 0.02		

Статистически значимая разница между группами по исследуемому показателю была идентифицирована уже через 24 часа после трансфекции, когда жизнеспособность клеток опытной группы снизилась на 21.2% относительно контрольной группы ($p < 0.001$). Полученные экспериментальные данные могут быть охарактеризованы как противоречивые. Это связано с тем, что дальнейшие измерения не показали существенных различий исследуемых групп.

Так, через 48 часов после отмывки культур клеток от трансфекционной смеси, параметры оптической плотности $ОП_{570}$ в группах выравнивались, а жизнеспособность клеток опытной группы оказалась ниже контрольных значений всего на 4.9%. При этом, по результатам теста Шапиро-Уилка контрольная группа не имела нормального распределения ($p = 0.02$), поэтому

сравнение групп проводилось по непараметрическому тесту Манна-Уитни. Статистической значимости при оценке различий не обнаружено ($p = 0.1$).

На заключительной временной точке эксперимента по данным МТТ-теста жизнеспособность клеток опытной группы была снижена на 10.2% в сравнении с аналогичным показателем контрольной группы. Однако зарегистрированные различия, хотя и были близки к статистической значимости, но таковой не обладали ($p = 0.06$).

Полученным результатам присуща определенная неоднозначность, так как первоначальное снижение оптической плотности культур клеток рака ободочной кишки в динамическом наблюдении не подтвердилось. Более того, для того, чтобы выровнять показатели опытной группы в диапазоне между 24 и 48 часами необходимо, клетки должны были увеличить темпы пролиферации или активности НАДФ-Н-, НАД- или ФАД-зависимых оксидоредуктаз.

5.3 Оценка интенсивности биоредукции резазурина клетками Caco-2

Резазуриновый тест проведен с целью конкретизации влияния индуцированной гиперэкспрессии гена *klotho* на окислительно-восстановительные процессы, а исследуемый показатель ОП₆₀₀ соотносился с общим количеством клеток в культурах. Данные представлены как отношение ОП₆₀₀ к количеству клеток. Поскольку наиболее выраженный эффект гиперэкспрессии *KL* на клетки Caco-2 по МТТ-тесту был определен на первые сутки исследований, а дальнейшие наблюдения не сопровождались статистически значимыми результатами, измерения проводились однократно, через 24 часа после трансфекции.

Показатель ОП₆₀₀/10⁶ клеток в контрольной группе, в среднем, составил 10.3 при объеме выборки в 28 повторных измерений (таблица 15). Между тем, опытная группа, включающая 25 повторностей, продемонстрировала

снижение интенсивности биоредукции резазурина на 4.7%. Однако настоящее отклонение не подтверждается уровнем статистической значимости ($p = 0.16$).

Таблица 15 – Количественные значения оценки биоредукции окисленной формы резазурина клетками линии Caco-2

Группа	Объем выборки	ОП ₆₀₀ /10 ⁶ клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	28	10.31 ± 0.25	-4.70	= 0.164
Опытная	25	9.82 ± 0.24		

Таким образом, резазуриновый тест не подтверждает возможное предположение, основанное на результатах МТТ-теста, о том, что гиперэкспрессия *KL* значимо влияет на оксидоредуктазные ферменты в клетках рака ободочной кишки. Вероятно, изменения, зарегистрированные посредством МТТ, в большей степени обусловлены количеством клеток, нежели изменениями ферментативного аппарата.

5.4 Исследование общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в клетках Caco-2

Как известно, напряженность окислительно-восстановительных реакций клетки обладает высокой значимостью для ряда важнейших внутриклеточных биохимических процессов, и, в том числе, может оказывать влияние на общую активность внутриклеточных лактатдегидрогеназ (ЛДГ), являющихся ферментами 11-ой реакции гликолиза и определяющих интенсивность реакций превращения пирувата в лактат, и наоборот.

В ходе настоящего исследования в клетках рака ободочной кишки определяли активность внутриклеточной ЛДГ через 24 часа после трансфекции. Для объективизации оценки ферментативной активности выявленный показатель оптической плотности соотносили с общим

количеством клеток. Контрольная группа, включающая 18 независимых измерений, продемонстрировала средний показатель $OP_{490} / 10^6$ клеток равный 16.05 (таблица 16).

Таблица 16 – Количественные значения оценки относительного количества общей внутриклеточной лактатдегидрогеназы в культурах Caco-2

Группа	Объем выборки	$OP_{490} / 10^6$ клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	18	16.05 ± 0.44	2.46	= 0.597
Опытная	17	16.45 ± 0.59		

Как представлено в таблице 16, в опытной группе определен несколько более высокий уровень активности ЛДГ, превышающий контрольные значения на 2.5%. Однако уровень статистической значимости различий между группами ($p = 0.6$), определенный с использованием Т-критерия Стьюдента, свидетельствуют о том, что с вероятностью 60% гиперэкспрессия *KL* не влияет значимым образом на активность ЛДГ в клетках линии Caco-2.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия гена *KL*, индуцированная в клетках рака ободочной кишки, не вызывает значимых изменений в напряженности окислительно-восстановительных процессов клетки.

5.5 Оценка интенсивности синтеза ДНК в клетках линии Caco-2

Результаты, полученные при анализе кривых роста, а также МТТ-теста, свидетельствуют о том, что в клетках рака ободочной кишки под влиянием гиперэкспрессии *KL* первоначально снижается, а затем, наоборот, повышается пролиферативная активность. Для подтверждения этого предположения проведены исследования интенсивности синтеза ДНК, оценку которой проводили по включению радиоактивно меченой молекулы-предшественника ДНК – 5-метил-³H-тимидин.

При этом в исследовании регистрировались динамические изменения синтеза ДНК в культурах клеток Сасо-2. Измерения проводили 2-кратно: через 24 и 48 часов после трансфекции. Группы сравнения представлены 17-18 повторными наблюдениями. Результаты представлены как отношение количества распадов в секунду на 10^6 клеток. Как и следовало ожидать, в контрольной группе определяется существенное повышение относительной пролиферативной активности клеток в течение периода наблюдения. При первом подсчете в контрольной группе выявлено 1719.2 Бк / 10^6 клеток. Между тем, ко 2-м суткам данный показатель существенно возрастает и составляет уже 2749.04 Бк / 10^6 клеток (таблица 17).

Таблица 17 – Количественные значения оценки относительной интенсивности синтеза ДНК в культурах клеток линии Сасо-2

Группа	Время, час	Объем выборки	Синтез ДНК, $M \pm m$, Бк / 10^6 клеток	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	18	1719.20 \pm 25.06	-15.80	< 0.001
Опытная	24	18	1447.57 \pm 40.99		
Контрольная	48	18	2749.04 \pm 40.83	13.34	< 0.001
Опытная	48	17	3115.71 \pm 39.45		

В свою очередь, в культурах клеток линии Сасо-2, подвергшихся гиперэкспрессии *KL*, на 1-е сутки исследований отмечается снижение интенсивности синтеза ДНК на 16% относительно контроля. Высокий уровень статистической значимости подкрепляет существенность выявленных различий ($p < 0.001$). Между тем, дальнейшее наблюдение продемонстрировало повышение синтеза ДНК под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*. Определяемый уровень радиоактивности в культурах опытной группы превысил значения контрольной группы на 13.3%. Зарегистрированное отклонение имеет высокую статистическую значимость наблюдений, подтверждаемую Т-критерием Стьюдента ($p < 0.001$).

Таким образом, выполненное исследование подтверждает разнонаправленность эффектов гиперэкспрессии *KL* на клетки линии Сасо-2, проявляющуюся в динамике.

5.6 Оценка активности апоптотических процессов

В связи с тем, что снижение количества клеток на 1-е сутки после трансфекции плазмидой с геном *KL* может быть связано не только с изменениями пролиферативной активности, но и с гибелью клеток, представляется немаловажной оценка программируемой гибели клеток. Для реализации намеченной цели в клетках рака ободочной кишки исследовали активность белков семейства каспаз, являющихся маркерами клеточной смерти по типу апоптоза. При этом в клеточных культурах определяли количество клеток с высокой каспазной активностью на 10^3 клеток в культурах. Основываясь на результатах предыдущих исследований, подсчет апоптотических клеток проводили через 24 часа после трансфекции.

Контрольная группа включала 29 повторных наблюдений. В среднем, в культурах клеток линии Сасо-2 выявлено 71.43 апоптотических клеток на 10^3 клеток культуры (таблица 18), тогда как индуцированная гиперэкспрессия *KL* способствовала снижению относительного количества клеток, находящихся в апоптозе более чем в два раза (52%, $p < 0.001$).

Таблица 18 – Количество клеток, обладающих повышенной активностью каспаз, в культурах клеток линии Сасо-2

Группа	Объем выборки	Клетки в апоптозе / 10^3 клеток, $M \pm m$	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	29	71.43 ± 0.68	-52.34	< 0.001
Опытная	33	34.04 ± 0.94		

Тем самым, результаты представленного исследования свидетельствуют о значительном ингибировании механизмов

программируемой клеточной гибели в клетках рака ободочной кишки под влиянием гиперэкспрессии *KL*.

5.7 Заключение

Результаты проведенных экспериментальных работ демонстрируют весьма неоднозначное и противоречивое действие гиперэкспрессии гена *KL* на жизнеспособность и характеристики роста клеточных культур рака ободочной кишки линии Сасо-2. На культурах клеток глиобластомы и эмбриональной рабдомиосаркомы было показано значимое подавление роста под влиянием *KL*. Однако влияние гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста культуры клеток рака ободочной кишки имеет ряд принципиальных отличий, причины которых сложно объяснить, опираясь лишь на данные анализа кривых роста (рисунок 11).

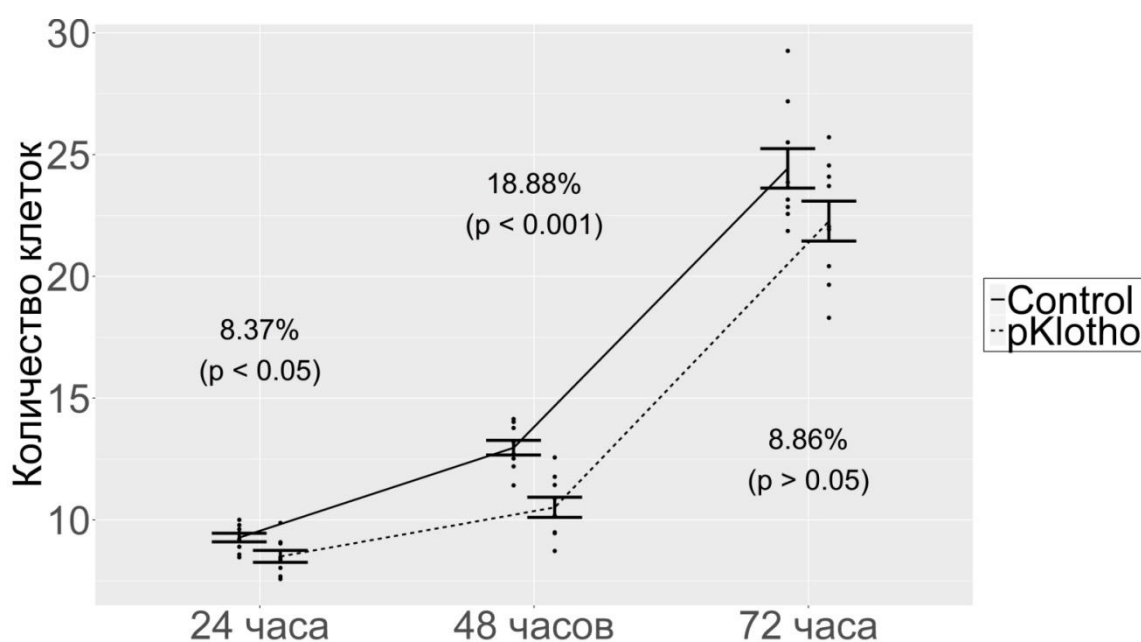


Рисунок 11 – Кривые роста.

Сравнение контрольной и опытной групп по кривым роста культур клеток рака ободочной кишки человека линии Сасо-2, количество клеток $\times 10^3 / \text{см}^2$, $M \pm m$.

Статистически значимые различия были выявлены уже на первые сутки наблюдений, когда количество клеток в опытной группе было снижено более чем на 8% относительно контроля ($p < 0.05$). При последующем подсчете разница в показателях групп увеличилась до 19% ($p < 0.001$). На третьи сутки регистрируемый уровень различий между группами снизился до 9% ($p < 0.05$).

Основываясь на построенных кривых роста можно заключить, что на временных интервалах с момента трансфекции до 24 часов и с 24 до 48 часов клетки претерпевали воздействие ингибирующих факторов, что закономерно отразилось на темпах роста культуры. Однако последующие динамические изменения сопровождались обратным эффектом, и в культурах опытных групп выявлено снижение разрыва с контрольными показателями.

Описанная особенность находит свое отражение и в показателях периода удвоения, который составил 34.35 и 34.55 часа для контрольной и опытной групп, соответственно. Данный расчетный показатель не имеет в группах значимых различий, так как опирается на значения кривых роста за весь период наблюдения, однако, если провести расчет по двум временным диапазонам, неоднородность будет выявлена. На интервале от 24 до 48 часов период удвоения в контрольной группе составил 49.69 часа, а в опытной – 78.16. Далее, с 48 по 72 часа в контрольной группе период удвоения равен 26.25, тогда как в опытной – 22.17 часа. Из этого следует, что в культуре клеток рака ободочной кишки отмечается «маятникообразное» действие гиперэкспрессии гена *KL*, которое сначала подавляет, а затем стимулирует жизнеспособность клеток.

Стоит также отметить, что на всем протяжении проведенного эксперимента клеточные культуры обеих групп находились в фазе экспоненциального роста, не успев достигнуть фазы «плато». Тем самым, не наблюдается влияние дефицита ресурса площади на результаты исследований.

МТТ-тест, проведенный на культурах клеток рака ободочной кишки человека линии Сасо-2, также дополняет полученную картину. Проведенная генетическая коррекция сопровождается сначала снижением жизнеспособности клеток опытной группы на 21% относительно контроля при высоком уровне значимости отличий ($p < 0.001$), а затем, при последующих наблюдениях – отсутствием существенных различий между группами (рисунок 12).

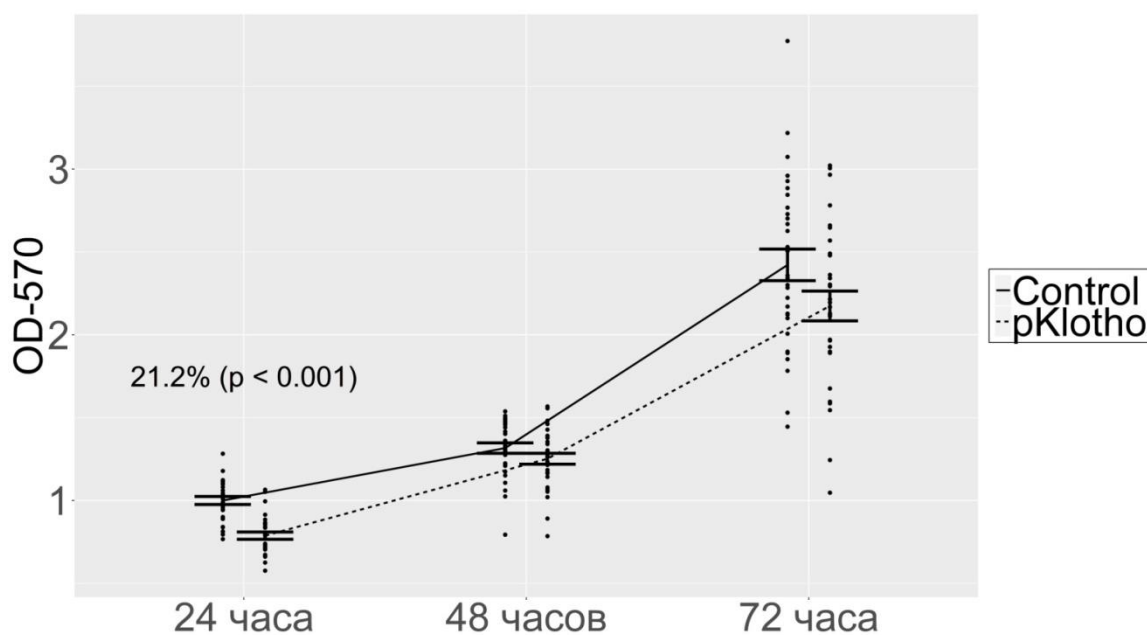


Рисунок 12 – МТТ-тест.

Влияние гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста клеток рака ободочной кишки человека линии Сасо-2, ОП₅₇₀, $M \pm m$.

Как следует из представленной диаграммы, характер динамических изменений, зарегистрированный с использованием метода МТТ, уверенно согласуется с результатами, полученными при анализе кривых роста. Выявленные изменения проявляются первичным ингибирующим эффектом гиперэкспрессии *KL* на способность клеток к превращению МТТ в кристаллы формазана. Однако уже на 2-е сутки исследований различия между группами теряют статистическую значимость.

Таким образом, результаты исследований позволяют предполагать, что гиперэкспрессия гена *KL* не вызывает стойких изменений активности оксидоредуктазных ферментов клеток рака ободочной кишки, хотя кратковременный эффект не может быть исключен. Для уточнения данной картины был проведен резазуриновый тест, также направленный на выявление изменений интенсивности протекания окислительно-восстановительных реакций клеток линии *Caco-2*.

Как следует из диаграммы (рисунок 13А), гиперэкспрессия *KL* не способствовала статистически значимым изменениям напряженности окислительно-восстановительных процессов в клетках рака ободочной кишки. Тем самым, возможное предположение о задействованности оксидоредуктазных ферментов клеток в реализации действия гена *KL* не находит своего подтверждения на клетках данной линии. По-видимому, изменения, выявленные с использованием МТГ, связаны, в большей степени, с изменением количества клеток. Между тем, отсутствие значимого изменения активности окислительно-восстановительных реакций может свидетельствовать о сохранении уровня метаболической активности в клетках *Caco-2*.

Как следует из диаграммы (рисунок 13Б), уровень активности внутриклеточной ЛДГ также не продемонстрировал значимых изменений под влиянием гиперэкспрессии *KL*. Таким образом, одна из ключевых характеристик метаболической активности клеток – интенсивность окислительно-восстановительных процессов – остается интактной по отношению к гену *KL* в клетках линии *Caco-2*. Более того, представленные результаты вообще не позволяют выявить каких-либо изменений ферментативной активности в клетках рака ободочной кишки под влиянием гиперэкспрессии *KL*. В связи с этим, вектор поиска возможных причин противоречивых эффектов гена *KL* на данной линии клеток может быть

смещен в иных направления и, в частности, в особенности изменений синтетического обмена.

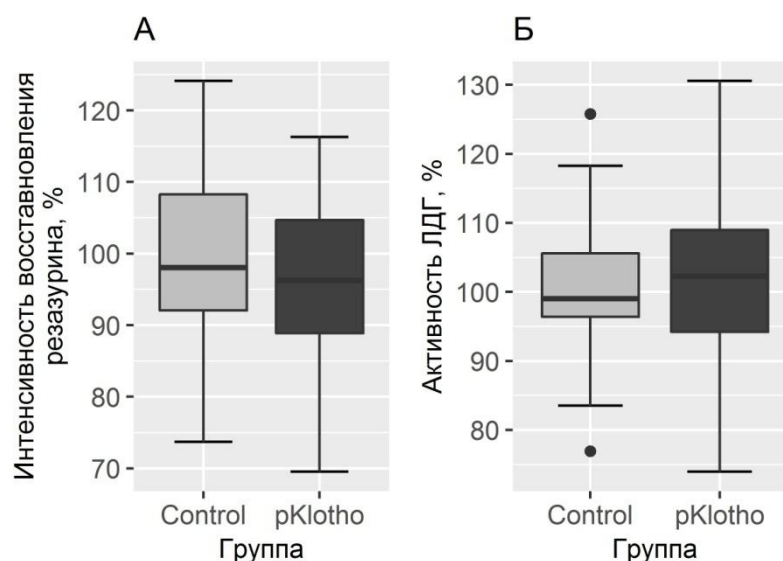


Рисунок 13 – Влияние гиперэкспрессии *KL* на напряженность окислительно-восстановительных процессов клеток рака ободочной кишки человека линии Сасо-2.

А – оценка биоредукции окисленной формы красителя резазурина, %; Б – оценка активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), %.

Результаты анализа кривых роста и МТТ-теста также могут свидетельствовать о динамических колебаниях количества клеток в культурах опытной группы в сравнении с контролем. Означенное приводит к пониманию необходимости более детального исследования митотической активности клеток, а выявленная в динамике неоднородность темпов прибавки клеточной массы обуславливает исследование интенсивности синтеза ДНК не однократно, как это было сделано на других линиях, но в некотором временном интервале.

Как представлено на диаграмме, на 1-е сутки исследований трансфицированные клетки рака ободочной кишки продемонстрировали существенное понижение активности синтеза ДНК (рисунок 14А),

сменившееся, между тем, на 2-е сутки противоположным эффектом (рисунок 14Б).

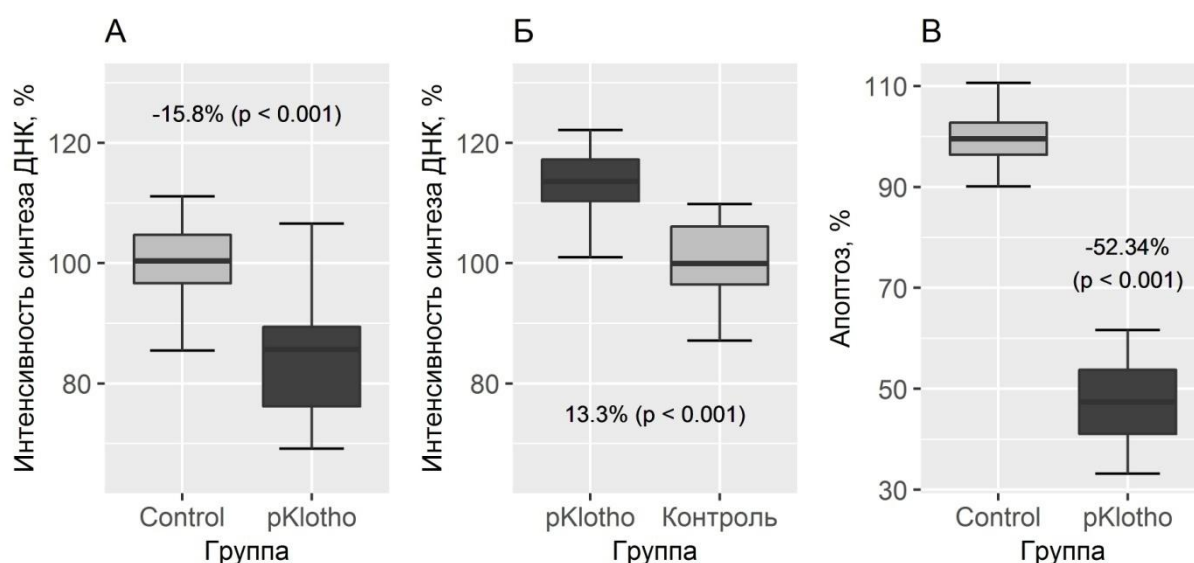


Рисунок 14 – Влияние гиперэкспрессии *KL* на механизмы пролиферации и программируемой гибели в клетках рака ободочной кишки человека линии Сасо-2.

А – сравнение интенсивности синтеза ДНК в группах исследования, выявленной методом включения ^3H -тимидина через 24 часа после трансфекции, %; Б – сравнение интенсивности синтеза ДНК в группах исследования, выявленной методом включения ^3H -тимидина через 48 часов после трансфекции, %; В – сопоставление относительного количества клеток с повышенной активностью каспаз, %.

Данные результаты, хотя и объясняют колебательных характер полученных изменений на культуре клеток рака ободочной кишки, в то же время не дают исчерпывающих представлений, так как изменения в количестве клеток могут быть обусловлены не только пролиферацией, но и убылью клеток в результате их гибели.

На рисунке 14В представлена диаграмма, демонстрирующая, что гиперэкспрессия *KL* не только не вызывает апоптотической гибели клеток линии Сасо-2, но и, наоборот, вдвое снижает вероятность индукции в опухолевой клетке механизмов программируемой гибели.

На основании представленных результатов, можно выделить две последовательных реактивных фазы в клетках рака ободочной кишки при гиперэкспрессии *KL*. Первая фаза характеризуется подавлением митотической активности клеток, сопровождающимся снижением темпов роста культивируемых клеток. Одновременно, проведенная генетическая коррекция ингибирует апоптотические механизмы, что приводит к развитию следующей фазы, при которой клетки с повышенным порогом индукции клеточной смерти теряют один из важнейших остаточных механизмов сдерживания неконтролируемого роста трансформированных клеток – снижается активность механизмов апоптоза. Данные изменения сопровождаются повышением пролиферативного потенциала опухолевых клеток.

В заключение, нельзя не отметить принципиальные отличия реакций культур клеток рака ободочной кишки на индукцию гиперэкспрессии *KL* от эффектов, выявленных на линиях клеток глиобластомы и эмбриональной рабдомиосаркомы человека. Объяснение выявленной разницы может заключаться в особенностях клеток линии *Caco-2*, а также в специфических различиях механизмов регуляции внутриклеточных процессов, характерных для опухолей данного происхождения.

ГЛАВА 6

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА ВЫДЕЛЕННЫЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Опираясь на результаты исследований, проведенных на сертифицированных клеточных линиях, был выбран клинический объект для оценки воздействия индуцированной гиперэкспрессии секретлируемой формы *KL*. Несмотря на то, что более высокая чувствительность к *KL* по результатам оценки общей жизнеспособности клеток была выявлена на культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd, культура глиобластомы человека линии A-172 продемонстрировала более выраженные эффекты в исследованиях, посвященных определению механизмов противоопухолевого действия *KL*.

На культурах клеток глиобластомы A-172 определено наиболее интенсивное вовлечение ферментативного аппарата клетки, пролиферативной активности и механизмов программируемой клеточной смерти в процессы ингибирования интенсивности клеточного роста. Тем самым, продемонстрировано участие нескольких относительно независимых внутриклеточных регуляторных систем, активно участвующих в реализации противоопухолевых эффектов *KL*.

На основании этого, в качестве объекта для дальнейших исследований, был выбран клинический материал, полученный от пациентов с глиобластомой. Культуры клеток выделяли из операционного материала 10 пациентов с установленным диагнозом глиобластомы. Клетки выделенных линий подвергались генетической коррекции, направленной на индуцирование гиперэкспрессии гена секретлируемой формы *KL*. Посредством МТТ-теста, исследовалось влияние *KL* на жизнеспособность опухолевых клеток.

6.1 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-1 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культура клеток глиобластомы линии EGL-1 была выделена из операционного материала пациентки П. 57 лет, с установленным диагнозом глиобластома (код по МКБ-10 – C71.3). Клетки линии EGL-1 подвергнуты исследованию изменений активности оксидоредуктазных ферментов под действием индуцированной гиперэкспрессии *KL* посредством МТТ-теста.

Объем выборок для каждой группы сравнения составил по 30 наблюдений на один подсчет (таблица 19). Зарегистрированные значения жизнеспособности клеточных культур на первые сутки исследований для контрольной группы составили, в среднем, 0.32 ОП₅₇₀. Вместе с тем, показатели опытной группы продемонстрировали несколько меньшие значения – 0.30 ОП₅₇₀.

Таблица 19 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-1

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.32 ± 0.01	-5.82	= 0.083
Опытная	24	30	0.30 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.41 ± 0.01	-7.28	= 0.071
Опытная	48	30	0.38 ± 0.01		
Контрольная	72	30	0.57 ± 0.01	-12.49	< 0.001
Опытная	72	30	0.50 ± 0.01		

Через 24 часа после трансфекции показатель жизнеспособности клеток опытной группы оказался на 5.82% ниже, чем в контрольной группе. Однако результаты статистической оценки значимости различий, проведенной по Т-критерию Стьюдента, свидетельствуют о низкой статистической значимости данных отклонений (p = 0.08).

При спектрофотометрической оценке исследуемого показателя, проведенной через 48 часов после липофекции, выявлены следующие средние показатели оптической плотности: контрольная группа – 0.41, опытная группа – 0.38. Таким образом, отклонения опытной группы от контрольных значений составило 7.28% ($p = 0.07$).

Через 72 часа после проведения эпигенетического вмешательства средние показатели жизнеспособности контрольной группы определены на уровне 0.57. В опытной группе аналогичный показатель составил 0.5 ОП₅₇₀. Различия между средними значениями групп на третьи сутки наблюдения превысили 12% ($p < 0.001$).

6.2 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-2 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культивируемые клетки линии EGL-2 были выделены из операционного материала пациента Н. 49 лет, с диагнозом глиобластома (код по МКБ-10 – C71.1). Клеточный материал подвергали трансфекции с геном *KL* и исследовали посредством МТТ-теста. Выявленные значения жизнеспособности клеток глиобластомы человека линии EGL-2 в культурах опытной и контрольной групп представлены в таблице 23.

Объем выборок для каждой группы сравнения составил 30 наблюдений. При первом подсчете, произведенном через 24 часа после трансфекции, оптическая плотность в контрольной группе составила 0.36 ОП₅₇₀, а в опытной – 0.32 (таблица 20). Различия между средними показателями групп показали снижение жизнеспособности клеток опытной группы на 9.41% относительно контроля. В соответствии с результатами Т-теста, зарегистрированное отклонение может быть обозначено как статистически значимое ($p = 0.02$).

Таблица 20 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-2

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.36 ± 0.01	-9.41	= 0.020
Опытная	24	30	0.32 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.49 ± 0.02	-13.00	= 0.010
Опытная	48	30	0.43 ± 0.02		
Контрольная	72	30	0.72 ± 0.02	-17.95	< 0.001
Опытная	72	30	0.59 ± 0.02		

При втором подсчете средний показатель жизнеспособности клеток контрольной группы составил 0.49 ОП₅₇₀. В опытной группе средние значения исследуемого показателя выявлены на уровне 0.43. Жизнеспособность клеток глиобластомы EGL-2 под действием гиперэкспрессии *KL* снизилась на 13% в сравнении с контролем (p = 0.01).

Через 72 часа после завершения действия на клетки трансфекционной смеси показатель интенсивности превращения МТТ в кристаллы формазана в клетках контрольной группы составил 0.72, тогда как аналогичный показатель в опытной группе не превысил порога в 0.6. Тем самым, культуры клеток линии EGL-2 продемонстрировали снижение активности оксидоредуктазных ферментов в условиях гиперэкспрессии *KL* на 18% в сравнении с контрольной группой при высоком уровне статистической значимости (p < 0.001).

6.3 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-3 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Клетки глиобластомы линии EGL-3 выделены из операционного материала пациента К. 63 лет с установленным диагнозом глиобластома (МКБ-10 – C71.0). В клетках индуцировали гиперэкспрессию гена *KL* и оценивали активность окислительно-восстановительных процессов.

Результирующие значения оценки жизнеспособности клеток глиобластомы линии EGL-3 под действием гиперэкспрессии *KL*, проведенной посредством МТТ-теста представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-3

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	29	0.37 ± 0.02	-1.79	= 0.745
Опытная	24	28	0.36 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.52 ± 0.02	-14.52	= 0.008
Опытная	48	30	0.44 ± 0.02		
Контрольная	72	30	0.79 ± 0.02	-18.95	< 0.001
Опытная	72	30	0.64 ± 0.02		

Объем выборок для групп сравнения при первом спектрофотометрическом анализе составил 29 повторностей для контрольной группы и 28 – для опытной. В остальных случаях группы включали по 30 наблюдений.

Средний показатель оптической плотности (ОП₅₇₀) культур клеток контрольной группы при подсчете через 24 часа после трансфекции составил 0.37. Опытная группа продемонстрировала несколько меньшие значения, равные 0.36. Сравнение групп не выявило значимого снижения исследуемого показателя в опытной группе на 1.79% ($p = 0.7$) относительно контроля.

Второй подсчет на клетках линии EGL-3 определил исследуемый показатель для контрольной группы равным 0.52. Тогда как в культурах, подвергшихся генетической коррекции, выявлен средний показатель жизнеспособности – 0.44. При сравнении показателей вторых суток исследований по Т-критерию Стьюдента определяется статистически значимое снижение напряженности окислительно-восстановительных реакций в клетках под действием индуцированной гиперэкспрессии *KL* на 14.5% ($p = 0.008$).

При заключительном подсчете в клетках EGL-3 показатель оптической плотности при заданной длине волны в контрольной группе составил 0.79. Опытной группе соответствуют показатели жизнеспособности клеток равные 0.64. При сопоставлении выявленных значений, обнаруживается снижение исследуемого показателя в культурах опытной группы на 18.95% относительно контрольной группы ($p < 0.001$).

6.4 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-4 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Линия клеток глиобластомы EGL-4 выделена из операционного материала пациента В. 55 лет с установленным диагнозом глиобластома (МКБ-10 – C71.0). В исследованиях подвергали оценке изменения показателя жизнеспособности клеток линии EGL-4 посредством МТТ-теста. Выборки всех групп сравнения включали по 30 повторных наблюдений (таблица 22).

Через 24 часа после трансфекции определяемый показатель клеточной жизнеспособности в контрольной группе составил 0.29. Способность культур клеток опытной группы к превращению МТТ в кристаллы формазана, в свою очередь, определена на уровне 0.28. Разница между групп не превысила 2.7%, сравнение групп, проведенное по Т-критерию Стьюдента, не выявило статистической значимости ($p = 0.5$).

Таблица 22 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-4

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.29 ± 0.01	-2.68	= 0.493
Опытная	24	30	0.28 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.49 ± 0.01	-21.83	< 0.001
Опытная	48	30	0.38 ± 0.01		
Контрольная	72	30	0.84 ± 0.01	-33.70	< 0.001
Опытная	72	30	0.56 ± 0.02		

На вторые сутки исследований, через 48 часов после трансфекции, выявлена более существенная разница при сравнении групп. В контрольной группе активность клеточных оксидоредуктаз, в среднем, равнялась 0.49. Тогда как в опытной группе аналогичный показатель составил 0.38, что на 21.8% ниже контрольных значений. Однако одна из групп сравнения не обладала нормальным распределением количественных показателей выборки, поэтому статистическая оценка различий групп проведена непараметрическим методом (U-критерий Манна-Уитни), продемонстрировавшим высокую статистическую значимость отклонений ($p < 0.001$).

Исследуемые значения контрольной группы на завершающем этапе периода наблюдения составили 0.84, опытной группы – 0.56. Тем самым, снижение жизнеспособности под действием гиперэкспрессии *KL* через 72 часа после трансфекции составило 33.7% ($p < 0.001$).

6.5 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-5 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культуры клеток глиобластомы линии EGL-5 выделены из операционного материала пациентки О. 69 лет с установленным диагнозом глиобластома (МКБ-10 – C71.2). Экспериментальным путем оценивали влияние гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста клеточных культур. Результаты МТТ-теста, проведенного с целью выявления изменений жизнеспособности клеток глиобластомы человека линии EGL-5 под влиянием исследуемого генетического агента, представлены в таблице 23.

В соответствии с табличными данными объем выборок для всех групп сравнения составил 30 повторностей, кроме подсчета, выполненного в

опытной группе через 24 часа после трансфекции, который включал 29 наблюдений.

Таблица 23 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-5

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.34 ± 0.01	-2.48	= 0.655
Опытная	24	29	0.33 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.45 ± 0.01	-2.00	= 0.723
Опытная	48	30	0.44 ± 0.02		
Контрольная	72	30	0.73 ± 0.02	-7.42	=0.051
Опытная	72	30	0.68 ± 0.02		

При первом подсчете показатель оптической плотности (ОП₅₇₀), свидетельствующий об активности оксидоредуктазных ферментов, в контрольной группе составил – 0.34. Клетки опытной группы не показали существенного и статистически значимого снижения исследуемого показателя.

Через 48 часов после трансфекции уровень активности образования кристаллов формазана в культурах клеток EGL-5 контрольной группы оказался равен 0.45., в опытной группе – 0.44. Тем самым, снижение исследуемого показателя в опытной группе составило 2% относительно контрольных значений, без статистической значимости выявленных различий (p = 0.72).

Результаты третьих суток эксперимента позволили определить значения жизнеспособности культур клеток контрольной группы на уровне 0.73. Показатель оптической плотности при длине волны 570 нм для клеток опытной группы продемонстрировал снижение на 7.42% от контроля (p = 0.051) и был представлен на уровне 0.68.

6.6 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-6 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культура клеток линии EGL-6 была выделена из операционного материала пациента С. 26 лет с установленным диагнозом глиобластома (код по МКБ-10 – C71.0). Оценка жизнеспособности клеток глиобластомы человека линии EGL-6 при индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*, проведенная МТТ-тестом, позволила получить результаты, представленные в таблице 24. В соответствии с табличными данными каждая группа сравнения на всех этапах включала по 30 наблюдений.

Таблица 24 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-6

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.33 ± 0.01	4.49	= 0.266
Опытная	24	30	0.34 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.54 ± 0.01	-11.96	= 0.001
Опытная	48	30	0.48 ± 0.01		
Контрольная	72	30	0.90 ± 0.02	-23.73	< 0.001
Опытная	72	30	0.68 ± 0.02		

На первые сутки эксперимента средние результирующие значения МТТ-теста для контрольной группы составили 0.33. Показатель жизнеспособности клеток опытной группы незначительно превысил контрольные значения и соответствовал уровню 0.34. Таким образом, при первом подсчете определено повышение жизнеспособности клеток глиобластомы на 4.49% относительно контроля. Однако отмеченное различие в показателях групп не является статистически значимым по Т-критерию Стьюдента ($p = 0.27$).

При втором подсчете оптическая плотность, соответствующая активности окислительно-восстановительных реакций в культурах клеток

глиобластомы человека линии EGL-6, равнялась 0.54. Между тем, под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL* исследуемый показатель в культурах опытной группы имел значения 0.48. Тем самым, на 2-е сутки исследований зарегистрировано снижение жизнеспособности клеток линии EGL-6 под влиянием гена *KL* почти на 12% в сравнении с контролем ($p = 0.001$).

Между тем, дальнейшая динамика изменений клеточной жизнеспособности продемонстрировала более выраженные различия. Через 72 часа после снятия клеток с трансфекционной смеси оцениваемый показатель контрольной группы определен на уровне 0.9. В среднем, клетки EGL-6 под влиянием гиперэкспрессии *KL* имели исследуемый параметр равный 0.68, продемонстрировав снижение жизнеспособности на 23.73% относительно контрольной группы. По причине ненормального распределения исследуемой переменной в одной из групп, статистическая оценка различий проводилась по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни, показавшему высокую статистическую значимость выявленного эффекта ($p < 0.001$).

6.7 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-7 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культура клеток линии EGL-7 выделена из операционного материала пациента М. 47 лет с установленным диагнозом глиобластома (код по МКБ-10 – C71.8). Посредством МТТ-теста в клетках глиобластомы человека линии EGL-7 были зарегистрированы изменения активности клеточных оксидоредуктаз под действием гиперэкспрессии секретируемой формы *KL*.

Результаты МТТ-теста представлены в таблице 25. Через 24 часа после трансфекции контрольная группа, включающая 29 повторностей, продемонстрировала количественные значения оцениваемой оптической

плотности равные 0.3. Опытная группа при первом подсчете показала близкие средние значения жизнеспособности – 0.3.

На основании представленных значений можно заключить, что в условиях гиперэкспрессии *KL* на первые сутки исследований показатель жизнеспособности клеток *EGL-7* повысился на 0.52% относительно контроля. Однако выявленная разница не является статистически значимой ($p = 0.9$).

Таблица 25 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии *EGL-7*

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	29	0.30 ± 0.01	0.52	= 0.909
Опытная	24	30	0.30 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.50 ± 0.02	-7.68	= 0.110
Опытная	48	30	0.46 ± 0.02		
Контрольная	72	30	0.85 ± 0.02	-17.73	< 0.001
Опытная	72	29	0.70 ± 0.02		

На 2-е сутки исследований различия между группами возросли. В среднем, исследуемый показатель в контрольной группе составил 0.5, в опытной группе ОП₅₇₀ равнялась 0.46. Тем самым, ингибирование жизнеспособности клеток под влиянием гиперэкспрессии *KL* составило 7.68%, однако статистическая оценка, проведенная по Т-критерию Стьюдента, не подтвердила статистической значимости выявленных различий ($p = 0.1$).

Через 72 часа после трансфекции средний показатель МТТ-теста в контрольной группе определен как 0.85. В опытной группе, при объеме выборке равной 29 наблюдениям, аналогичный параметр составил 0.7. Таким образом, выявлено подавление жизнеспособности клеток опытной группы более чем на 17% в сравнении с контрольной группой ($p < 0.001$).

6.8 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-8 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культивируемые клетки линии EGL-8 выделены из операционного материала пациентки Т. 68 лет с установленным диагнозом гломобластома (МКБ-10 – C71.2). В культурах клеток оценивали изменения активности окислительно-восстановительных реакций под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL*. Результирующие количественные значения оценки жизнеспособности клеток линии EGL-8, выявленные по методу МТТ-теста, представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-8

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.35 ± 0.006	-1.97	= 0.343
Опытная	24	30	0.34 ± 0.004		
Контрольная	48	30	0.48 ± 0.007	-16.19	< 0.001
Опытная	48	30	0.40 ± 0.006		
Контрольная	72	30	0.64 ± 0.007	-20.05	< 0.001
Опытная	72	30	0.51 ± 0.010		

Все группы сравнения включали по 30 повторных наблюдений. При первом подсчете, проведенном через 24 часа после трансфекции, уровень оптической плотности ОП₅₇₀ в культурах клеток контрольной группы составлял 0.35. В опытной группе определены значения, равные 0.34. Различия между групп составили менее 2% и не являлись статистически значимыми (p = 0.34).

Через 48 часов после снятия клеток с липофекционной смеси жизнеспособность в культурах клеток контрольной группы возросла до 0.48. Для опытной группы исследований аналогичный показатель определен на уровне 0.4, что на 16.2% ниже контрольных значений. Количественные

показатели групп подверглись сравнению по Т-критерию Стьюдента, который позволил определить высокий уровень статистической значимости выявленных различий ($p < 0.001$).

На заключительном этапе эксперимента оцениваемый показатель в контрольной группе составил 0.64. В свою очередь, активность оксидоредуктаз в культурах клеток глиобластомы опытной группы определена на уровне 0.51. Разница между средними показателями групп превысила 20% при высокой статистической значимости ($p < 0.001$).

6.9 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-9 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*

Культура клеток линии EGL-9 выделена из операционного материал пациента Т. 43 лет с установленным диагнозом глиобластома (код по МКБ-10 – С71.1). На полученных культурах оценивали эффект влияния индуцированной гиперэкспрессии *KL* на характеристики роста и жизнеспособность клеток посредством МТТ-теста.

Как представлено в таблице 27, к первым суткам исследования показатели жизнеспособности клеток, выявленные по результатам МТТ-теста, в контрольной группе составили, в среднем, 0.32. Выборка включала 28 повторных наблюдений. Способность клеток опытной группы к превращению МТТ в кристаллы формазана соответствовала показателю оптической плотности равному 0.29, при объеме выборки в 29 наблюдений.

Снижение исследуемого показателя на первые сутки в опытной группе достигли 8.87% в сравнение с контрольной группой. Оценка по тесту Стьюдента позволила выявить высокую статистическую значимость в различиях групп ($p < 0.001$).

Через 48 часов после липосомальной трансфекции ОП₅₇₀ в культурах клеток глиобластомы линии EGL-9 в контрольной группе оказалась равной

0.49. Оцениваемые значения опытной группы выявлены на уровне 0.42. И контрольная и опытная группы включали по 30 наблюдений. Таким образом, ко вторым суткам определяется снижение жизнеспособности клеток глиобластомы EGL-9 под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL* на 14.1% относительно контроля ($p < 0.001$).

Таблица 27 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-9

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	28	0.32 ± 0.004	-8.87	< 0.001
Опытная	24	29	0.29 ± 0.005		
Контрольная	48	30	0.49 ± 0.013	-14.10	< 0.001
Опытная	48	30	0.42 ± 0.013		
Контрольная	72	29	0.80 ± 0.020	-16.30	< 0.001
Опытная	72	30	0.67 ± 0.018		

При заключительном подсчете в контрольной группе, включающей 29 повторных измерения, жизнеспособность клеток составила 0.8. Между тем, показатели опытной группы оказался равен 0.67, при наличии 30 повторных наблюдений. Тем самым, гиперэкспрессия *KL* индуцировала в клетках глиобластомы EGL-9 снижение показателей жизнеспособности к завершению эксперимента на 16.3% ($p < 0.001$).

6.10 Исследование жизнеспособности клеток линии EGL-10 под действием индуцированной гиперэкспрессии гена *klotho*

Культура клеток линии EGL-10 была получена из операционного материала пациента К. 64 лет с установленным диагнозом глиобластомы (код по МКБ-10 – C71.0). Культуры клеток подвергались исследованию чувствительности к индуцируемой гиперэкспрессии гена *KL*. Данные проведенной оценки жизнеспособности клеток глиобластомы человека линии

EGL-10 под действием исследуемого генетического агента, полученные с использованием метода МТТ-теста, представлены в таблице 28. Как следует из таблицы объем выборок во всех группах сравнения равен 30 наблюдениям.

Таблица 28 – Количественные значения МТТ-теста, проведенного на культуре клеток глиобластомы человека линии EGL-10

Группа	Время, час	Объем выборки	ОП ₅₇₀ , М ± m	Отклонение, %	Статистическая значимость, p
Контрольная	24	30	0.31 ± 0.01	-4.04	= 0.151
Опытная	24	30	0.30 ± 0.01		
Контрольная	48	30	0.46 ± 0.01	-10.89	< 0.001
Опытная	48	30	0.41 ± 0.01		
Контрольная	72	30	0.73 ± 0.02	-22.91	< 0.001
Опытная	72	30	0.56 ± 0.02		

При первом подсчете в контрольной группе клеток глиобластомы были выявлены показатели оптической плотности, в среднем, равные 0.31. В то же время, средний показатель опытной группы составил 0.3. Тем самым, отклонение в жизнеспособности клеток EGL-10 под влиянием гиперэкспрессии sKL превысило 4%. Оценка различий групп по Т-критерию Стьюдента не позволила выявить статистической значимости ($p = 0.15$).

На 2-е сутки исследований ОП₅₇₀ в культурах клеток EGL-10 контрольной группы определена на уровне 0.46. Тогда как показатели жизнеспособности культур клеток опытной группы зафиксированы в значении 0.41. Таким образом, снижение жизнеспособности в клетках глиобластомы данной линии под действием KL через 48 часов после трансфекции составило не многим менее 11% при высоком уровне статистической значимости в соответствии с расчетными параметрами Т-критерия ($p < 0.001$).

Через 72 часа после трансфекции в культурах контрольной группы определены показатели, в среднем, равные 0.73. Одновременно с этим, в

опытной группе уровень оцениваемого показателя составил 0.56. Тем самым, ингибирование жизнеспособности клеток EGL-10 на заключительном этапе эксперимента составило 22.9% ($p < 0.001$).

6.11 Заключение

В проведенных исследованиях было выявлено статистически значимое подавление жизнеспособности выделенных линий клеток глиобластомы человека под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL* во всех линиях, кроме EGL-5. Однако, даже на данной линии клеток, к третьим суткам эксперимента определялось снижение исследуемого показателя более чем на 7% относительно контроля, при p -значении близком к порогу статистической значимости ($p = 0.051$).

Обобщая полученные сведения, можно заключить, что наименее выраженный противоопухолевый эффект *KL*, ожидаемо, наблюдался на первые сутки наблюдений. Поскольку при сопоставлении результатов, полученных на разных клеточных линиях, возникла необходимость нормирования показателя зависимой переменной, за единицу был принят средний показатель контрольной группы каждой линии клеток, выявленный при первом подсчете. Поэтому значения контрольных групп на 24-й часовой отметке во всех случаях равны 1 и, по определению, не имеют какого-либо параметра дисперсии отличного от 0. Между тем, в опытной группе, исследуемые показатели определены в диапазоне 0.97 ± 0.01 . Как представлено на диаграмме (рисунок 15), снижение жизнеспособности клеток глиобластомы на первые сутки наблюдения составило 3.21% ($p = 0.038$).

На вторые сутки наблюдения, по обобщенным данным всех 10 выделенных линий, выявлено нарастание различий между групп. Усредненные показатели оцениваемой оптической плотности культур клеток

контрольных групп, в среднем, составили 1.48 ± 0.05 . Опытная группа продемонстрировала существенно меньшие значения: 1.3 ± 0.04 . Тем самым, снижение жизнеспособности культур клеток опытной группы на вторые сутки составило, в среднем, 12.15% ($p = 0.01$).

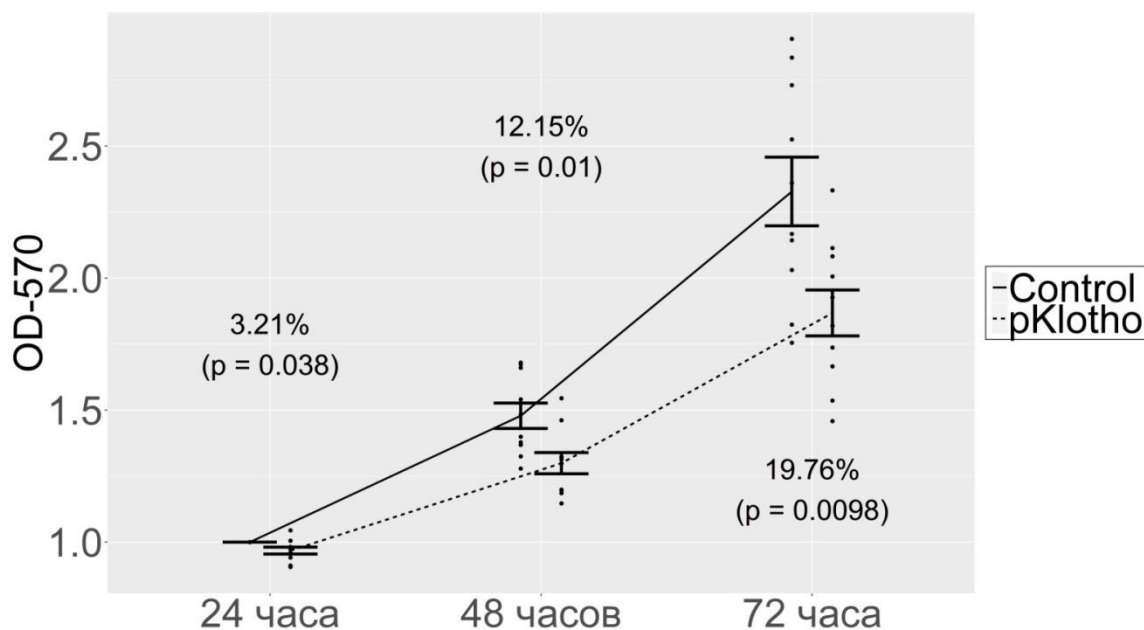


Рисунок 15 – МТТ-тест.

Влияние гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста культивируемых клеток глиобластомы человека линий EGL-(1-10), ОП₅₇₀, $M \pm m$.

На завершающем этапе исследований, через 72 часа после трансфекции, выявленные величины оптической плотности в контрольной группе определены на уровне 2.33 ± 0.13 . Показатели жизнеспособности клеток опытной группы, в свою очередь, составили 1.87 ± 0.09 . Таки образом, к третьим суткам исследований было выявлено снижение исследуемого параметра жизнеспособности выделенных линий клеток глиобластомы человека под действием гиперэкспрессии *KL* на 19.76% относительно контрольных значений ($p < 0.01$).

Полученная картина, в целом, хорошо согласуется с тенденциями ингибирования жизнеспособности и характеристик роста опухолевых клеток,

которые были выявлены при исследовании влияния гиперэкспрессии гена *KL* на сертифицированную линию клеток глиобластомы человека A-172. Между тем, в настоящей главе полученные сведения подтверждены на клиническом материале, выделенном от 10 пациентов, с нозологическими формами исследуемого онкозаболевания.

Тем самым, на основании представленных результатов можно заключить, что ген *KL* проявляет противоопухолевую активность как в отношении сертифицированной клеточной линии A-172, так и в отношении культур клеток, полученных из клинического материала.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная парадигма развития медицины предусматривает персонафикацию, превентивный и предиктивный подходы. Трудно переоценить определяющую роль предиктивных маркеров в индивидуализации лечебных мероприятий, направленных на борьбу с онкопатологией.

В фокусе выполненной работы – оценка влияния гиперэкспрессии гена *KL* на характеристики роста и жизнеспособность клеток опухолевого происхождения, а также на понимание возможных механизмов, лежащих в основе противоопухолевого действия гиперэкспрессии *KL*.

Исследования, проведенные на сертифицированных клеточных линиях, продемонстрировали существенную вовлеченность гена *KL* в регуляцию канцерогенетических механизмов опухолевых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы, глиобластомы и рака ободочной кишки человека. Однако линии опухолевых клеток различного происхождения продемонстрировали и некоторую неоднородность в характере изменений свойств клеточного роста под влиянием гиперэкспрессии гена *KL*. Впервые был продемонстрирован противоопухолевый эффект гена *KL* на культивируемые клетки глиобластомы и эмбриональной рабдомиосаркомы человека.

Как следует из полученных данных, следствием индуцированной гиперэкспрессии *KL* является снижение интенсивности роста опухолевых клеток, которое нашло отражение в результатах анализа кривых роста. Так, искусственное повышение экспрессии гена *KL* способствовало снижению пролиферативной активности клеток глиобластомы линии А-172 на 27% в сравнении с контрольной группой ($p < 0.001$). На культурах клеток рабдомиосаркомы выявлен более выраженный эффект подавления клеточной пролиферации, превысивший 42% ($p < 0.001$).

Результаты работы также свидетельствуют о влиянии гена *KL* на НАДФ-Н-, НАД- и ФАД-зависимые оксидоредуктазы клетки. Влияние исследуемого генетического агента на клеточную жизнеспособность было выявлено посредством МТТ-теста, результаты которого позволили сделать предположение о вовлеченности оксидоредуктазных ферментов в реализацию противоопухолевого эффекта *KL*. Гипотеза нашла свое подтверждение в результатах резазуринового теста, показавшего, что в трансфицированных клетках глиобластомы и рабдомиосаркомы существенно снижается интенсивность восстановления окисленной формы красителя. Данное предположение основывается на выявленном снижении активности клеточных оксидоредуктаз.

Тем самым, полученные результаты свидетельствуют об изменении напряженности окислительно-восстановительных процессов в опухолевых клетках в условиях индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*. Между тем, изменение общей интенсивности окислительно-восстановительных реакций клетки может иметь проявления в активности различных ферментативных систем. Злокачественно трансформированные клетки, как известно, имеют характерные типовые изменения каталитической активности, заключающиеся в усилении энергетического обмена в целом, а также в ассиметричном повышении активности анаэробного гликолиза. Данная особенность обеспечивает повышенное энергопотребление опухолевых клеток, которое проявляется способностью клеток к неконтролируемому росту.

Экспериментальным путем, посредством оценки уровня активности внутриклеточной ЛДГ, установлено *KL*-зависимое снижение активности ЛДГ в клетках глиобластомы и рабдомиосаркомы. Таким образом, подавление напряженности окислительно-восстановительных реакций в трансформированных клетках, реализованное через влияние на клеточные оксидоредуктазы, подтверждается несколькими независимыми тестами. Это

свидетельствует о вовлеченности оксидоредуктазных ферментов в реализацию противоопухолевого эффекта гиперэкспрессии гена *KL*.

Лактатдегидрогеназа является ферментом обратимой биохимической реакции превращения пирувата в лактат. Несмотря на то, что само по себе изменение суммарной активности ЛДГ еще не свидетельствует о тех или иных изменениях энергетического обмена, можно предполагать, что одной из вероятных причин снижения активности данного фермента под влиянием индуцированной гиперэкспрессии *KL* может являться угнетение гликолитических реакций.

Между тем, комплексный механизм противоопухолевого действия гиперэкспрессии *KL* подтверждается влиянием исследуемого генетического агента на различные показатели, вовлеченные в механизмы канцерогенеза. В частности, отмечается снижение интенсивности синтеза ДНК в трансфицированных опухолевых клетках. Кроме того, проведенная экспериментальная оценка активности каспаз свидетельствует о способности гена *KL* индуцировать апоптотические процессы в клетках и, тем самым, способствовать запуску программируемой гибели клеток опухолей. Зарегистрировано повышение количества клеток, находящихся в апоптозе, превысившее контрольные значения в культуре рабдомиосаркомы на 50%, а в культурах глиобластомы – на 80%. Индукция апоптоза под влиянием гиперэкспрессии *KL* может быть закономерно связана с нарушением функций мембран митохондрий.

Стоит отметить, что на культуре клеток глиобластомы линии A-172 были получены наиболее выраженные проявления вовлеченности исследуемых механизмов реализации противоопухолевого действия гиперэкспрессии *KL*. В связи с этим, глиобластома была выбрана для подтверждения эффектов гена *KL* на культивируемых опухолевых клетках, полученных из операционного материала пациентов. Оценка, проведенная посредством МТТ-теста, продемонстрировала значительный ингибирующий

эффект гиперэкспрессии *KL* на характеристики роста и жизнеспособность культивируемых клеток глиобластомы, полученных от 10 пациентов с установленным диагнозом. Максимальный ингибирующий эффект, отмеченный в конце периода наблюдения, на 3-и сутки эксперимента, достиг 20% ($p < 0.01$).

В свою очередь, результаты исследований на клетках рака ободочной кишки свидетельствуют о противоречивой роли *KL*. В соответствии с данными анализа кривых роста, исследования позволили выявить ингибирующий эффект гиперэкспрессии *KL* на клеточную пролиферацию. Максимальное снижение количества клеток в опытной группе относительно контроля было достигнуто на 2-е сутки исследований и составило 19% ($p < 0.001$). Однако отличительной особенностью зарегистрированного эффекта на линии клеток Сасо-2 является его кратковременность и постепенное восстановление темпов роста клеток, отмечаемое при дальнейшем наблюдении на 3-и сутки эксперимента.

Соответственно этому и результаты МТТ-теста демонстрируют смену первоначального ингибирующего действия гена *KL* тенденцией к нивелированию регистрируемых различий при дальнейшем наблюдении. Немаловажным также представляется тот факт, что проведенные исследования не позволили выявить существенного влияния гиперэкспрессии *KL* на уровни ферментативной активности клеточных оксидоредуктаз, определяемые по интенсивности восстановления окисленной формы резазурина и по уровню активности ЛДГ.

Между тем, проведенная на культурах клеток линии рака ободочной кишки оценка динамических изменений интенсивности синтеза ДНК продемонстрировала противоречивость влияния гена *KL* на пролиферативную активность опухолевых клеток: первоначальное ингибирование интенсивности синтеза ДНК, регистрируемое через 24 часа после трансфекции, в дальнейшем сменяется существенным повышением

исследуемого показателя. Кроме того, гиперэкспрессия *KL* способствовала более чем двукратному ингибированию апоптотических механизмов клеточной гибели.

Неодинаковое действие гиперэкспрессии *KL* на опухолевые клетки различного происхождения может находить объяснения в особенностях регуляции сигнальных путей, являющихся мишенями для гена *KL*. Предполагается, что *KLOTNO*, выступая как гуморальный и транскрипционный фактор, модулирует активность транскрипционных факторов семейства *FOX*, которые, в свою очередь, способны оказывать влияние на широкий спектр мишеней.

Наиболее значимой мишенью транскрипционных факторов *FOX*, в контексте известного противоопухолевого действия гена *KL*, является канонический сигнальный путь *WNT*. Примечательно, что активация данной сигнальной связи может иметь не только различные, но и противоположные эффекты в различных тканях и условиях. Вероятно, *KL*-опосредованное подавление активности сигнальной связи *WNT/CTNNB* в клетках опухолей экто- и мезодермального происхождения способна ингибировать белки *BCL2* и активировать представителей семейства *BAX*, что приводит к нарушению барьерной функции мембран митохондрий и сопровождается высвобождением цитохрома *C* и других апоптогенных факторов, способствующих индукции программируемой гибели.

Между тем, транскрипционные факторы *FOX* могут также участвовать в регуляции сигнальной связи инсулина и инсулин-подобного фактора роста 1 (Инсулин/*IGF-1*), вследствие чего в опухолевых клетках наблюдается снижение экспрессии супероксиддесмутаза-2 (*СОД-2*). Результатом данного воздействия является повышение ПОЛ, оказывающего деструктивное действие на клеточные мембраны и их функции. Одним из эффектов ПОЛ является повышение проницаемости митохондриальной мембраны, что, в

свою очередь, способствует активации каспазных ферментов, индуцирующих апоптоз.

Исследования, проведенные на культивируемых клетках рака ободочной кишки и предоставившие не столь однозначные результаты, могут находить свое объяснение в том, что набор транскрипционных факторов FOX может различаться в тканях за счет менее консервативных белков, экспрессия которых может выступать маркером тканей того или иного происхождения. Например, факторы FOXA2 и FOXI1 специфичны для тканей энтодермального происхождения.

В результате, индуцированная гиперэкспрессия гена *KL*, приводящая к модуляции транскрипционных факторов FOX, влияет на канонический сигнальный путь WNT в клетках рака ободочной кишки. В клетках энтодермального происхождения сигнальная связь WNT/CTNNB последовательно приводит к повышению экспрессии TCF4 – фактора пролиферации, специфичного для тканей энтодермы. Активация TCF4 может способствовать повышению пролиферативной активности эпителиальных клеток ЖКТ и ингибированию процессов клеточной дифференцировки. Такие изменения влияют на белки, содержащие консервативные домены ВН, и, в частности, проявляются стимулированием активности BCL2 и подавлением белков BAX.

Угнетение функции белков семейства BAX, расположенных в клеточных мембранах, включая митохондрии и ЭПР, вероятно, способствует торможению транспортных механизмов, связанных с уровнем проницаемости мембран клеток. Возможным результатом угнетения транспортных систем является субстратный дефицит, последовательно отражающийся на синтетической активности клеток рака ободочной кишки. Между тем, смена ингибирующего эффекта гена *KL* в отношении синтетической активности на стимулирующий объясняется тем, что изменения активности BCL2 и BAX могут способствовать торможению

выхода апоптогенных факторов из митохондрий в цитозоль. Это может свидетельствовать о снижении способности клеток к индукции программируемой гибели по типу апоптоза. Тем самым, краткосрочный эффект подавления роста опухолевых клеток сменяется долгосрочным, проявляющимся повышением жизнеспособности опухолевых клеток энтодерального происхождения.

Обобщенная схема влияния гиперэкспрессии гена *KL* на исследованные опухолевые клетки представлена на рисунке 16.

Выявленные закономерности влияния *KL* на рост опухолевых клеток, являясь относительно самостоятельным феноменом, в то же время качественно дополняют существующий информационный пул, касающийся данной проблематики, и открывают перспективы клинического исследования применения *KL* для диагностики и лечения онкопатологии.

Как следует из представленной схемы (рисунок 16), гиперэкспрессия гена *KL* индуцирует изменения активности транскрипционных факторов семейства FOX. В опухолевых клетках эмбриональной рабдомиосаркомы и глиобластомы это вызывает ингибирование активности сигнальной связи WNT/CTNNB, вследствие чего происходит повышение активности белков BAX и снижение активности их супрессора – BCL2. Повышение активности BAX, в свою очередь, способствует выходу факторов апоптоза и других соединений из митохондрий в цитозоль, что вызывает превращение каспаз в активные формы и, тем самым, стимулирует механизмы апоптоза.

Вместе с тем, под влиянием факторов FOX подавляется опосредованная сигнальной связью инсулин/IGF-1 экспрессия СОД-2 – фермента влияющего на АОЗ. В результате повышается уровень ПОЛ, и под влиянием АФК снижается барьерная функция митохондриальных мембран. Таким образом, два сигнальных пути относительно независимо друг от друга приводят к повышению проницаемости мембран митохондрий, что

способствует нарушению клеточного гомеостаза. Данные изменения сопровождаются угнетением окислительно-восстановительных реакций.

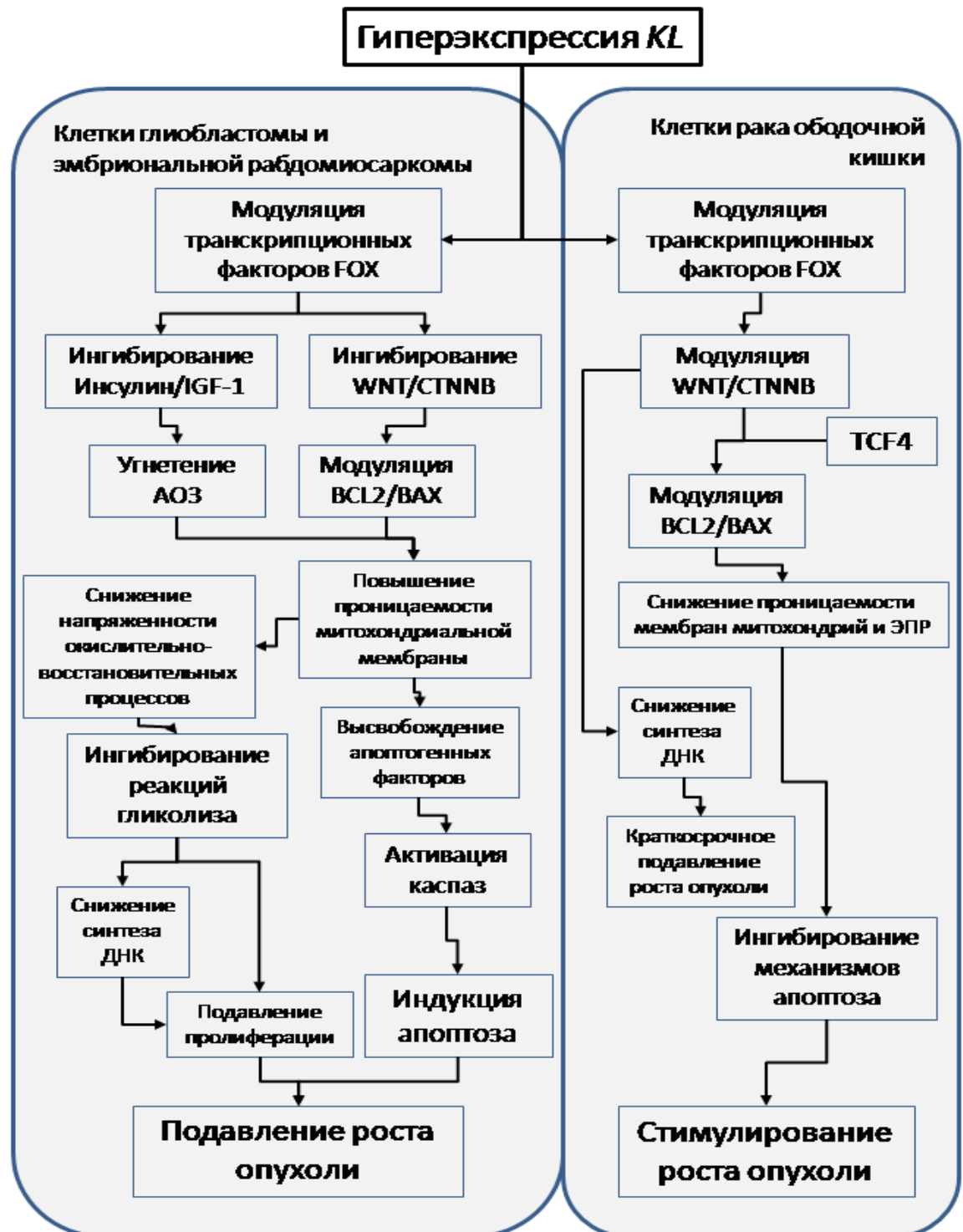


Рисунок 16 – Возможные механизмы действия гиперэкспрессии *KL* на опухолевые клетки различного происхождения.

Возможным объяснением снижения суммарной активности ЛДГ может служить гипотеза подавления гликолитических реакций в опухолевых клетках, подвергшихся влиянию индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*. Данная гипотеза может объяснить выявленный феномен влияния гиперэкспрессии *KL* на пролиферативную активность и интенсивность синтеза ДНК опухолевыми клетками, так как угнетение гликолиза сопровождается снижением энергетического обмена, а следовательно, и всех энергозависимых внутриклеточных процессов.

Между тем, в опухолевых клетках рака ободочной кишки под влиянием факторов FOX, состав которых отличается в энтодермальной ткани, может наблюдаться повышение активности сигнального пути WNT/CTNNB, связанного также с белками TCF4. В результате активации канонического пути WNT повышается экспрессия BCL2 и ингибируется активность белков семейства BAX, что вызывает снижение проницаемости мембран митохондрий и ЭПР. С одной стороны, данный эффект может проявляться угнетением транспортных систем клетки и последующим дефицитом субстратов, необходимых для синтетической активности клеток, оказывая, тем самым, ингибирующее влияние на интенсивность синтеза ДНК и, следовательно, пролиферацию. С другой стороны, снижение активности BAX подавляет влияние апоптогенных факторов в клетке и, таким образом, ингибирует механизмы программируемой гибели клеток, что в конечном итоге приводит к стимулированию опухолевого роста.

Выводы

1. Индуцированная гиперэкспрессия гена *KL* подавляет жизнеспособность и темпы роста культивируемых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека.
2. Гиперэкспрессия гена *KL* снижает жизнеспособность и динамику роста культивируемых клеток глиобластомы человека.
3. Повышение активности гена *KL* способствует кратковременному снижению жизнеспособности и темпов роста культивируемых клеток рака ободочной кишки.
4. Гиперэкспрессия *KL* ингибирует жизнеспособность и характеристики роста культивируемых клеток глиобластомы, выделенных из операционного материала пациентов.
5. Противоопухолевое действие индуцированной гиперэкспрессии гена *KL* опосредовано изменениями напряженности окислительно-восстановительных процессов, ингибированием пролиферации и интенсивности синтеза ДНК, а также влиянием на механизмы программируемой клеточной смерти.

Практические рекомендации

1. Выраженное онкосупрессивное действие гиперэкспрессии гена *KL* может стать основой для разработки противоопухолевого генно-инженерного препарата, позволяющего проводить таргетное ингибирование роста опухолевых клеток, индуцировать их программируемую гибель и характеризующегося минимизацией побочного действия лечебных мероприятий.

2. Результаты представленной работы могут быть использованы для разработки практических методов диагностики онкопатологии, основанных на выявлении экспрессии гена *KL* и белков KLOTНО, а также определении чувствительности опухолевых клеток к индуцированной гиперэкспрессии гена *KL*.

3. Понимание задействованности гена *KL* и продуктов его экспрессии в канцерогенезе позволяет расширить современные представления о механизмах развития и течения онкопатологических процессов.

Список использованной литературы

1. Исаева А. В., Зима, А. П., Саприна, Т. В., Касоян, К. Т., Попов, О. С., Брынова, О. В. и др. Сравнительная оценка экспрессии b-катенина и E-кадгерина в жидкостных образцах пунктатов узловых образований щитовидной железы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161. – №. 2. – С. 251-255.
2. Каприн А. Д., ред., Старинский В. В., ред., Петрова Г. В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) – Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. – 250с.
3. Льюин Б., ред., Кассимерис Л., ред., Лингаппа В. П., ред., Плоппер Д., ред. Клетки – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – 951 с.
4. Марков О. В. и др. Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток: от экспериментов на животных моделях до клинических испытаний //Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2017. – Т. 9. – №. 3 (34).
5. Непомнящих Т. С., Антонец Д. В., Максютов Р. А. Краткий обзор клинических испытаний средств иммунотерапии онкологических заболеваний //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. 2.
6. Пономарев А. И. Патогенетические механизмы холодового воздействия на клетки и ткани при консервации с использованием различных термобарических условия ксенона: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.03 / Пономарев Александр Игоревич. – Екатеринбург, 2016. – 139 с.
7. Рамазанов Б. Р., Хуснутдинов, Р. Р., Галембикова, А. Р., Дунаев, П. Д., Бойчук, С. В. Роль белка p53 в атм-и парп-зависимых путях репарации повреждений ДНК, вызванных ингибитором топоизомеразы II типа //Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97. – №. 2.

8. Abramovitz L., Rubinek T., Ligumsky H., Bose S., Barshack I., Avivi C. et al. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer //Clinical Cancer Research. – 2011. – T. 17. – №. 13. – C. 4254-4266. DOI: 10.1158/1078-0432.
9. Afiattalab F. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* //Nature. – 1980. – T. 287. – C. 795.
10. Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y. et al. Downregulation of the Klotho Gene in the Kidney under Sustained Circulatory Stress in Rats //Biochemical and biophysical research communications. – 1998. – T. 249. – №. 3. – C. 865-871. Doi: 10.1006/bbrc.1998.9246.
11. Arking D.E., Becker D.M., Yanek L.R., Fallin D., Judge D.P., Moy T. F. et al. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease //The American Journal of Human Genetics. – 2003. – T. 72. – №. 5. – C. 1154-1161. doi: 10.1086/375035.
12. Arking D.E., Krebsova A., Macek M., Arking A., Mian I. S., Fried, L. et al. Association of human aging with a functional variant of klotho //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99. – №. 2. – C. 856-861. doi: 10.1073/pnas.022484299.
13. Atkins M. B. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993 //Journal of clinical oncology. – 1999. – T. 17. – №. 7. – C. 2105-2105.
14. Atkins M. B. et al. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: Long-term survival update //The cancer journal from Scientific American. – 2000. – T. 6. – C. S11-4.
15. Behera R., Marchbank K., Kaur A., Dang V., Webster M., O'Connell M. et al. Abstract A11: Crosstalk between klotho and wnt5A drives age-related melanoma progression. – 2015.
16. Berraondo P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy //British journal of cancer. – 2018. – C. 1.

17. Bray F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries //CA: a cancer journal for clinicians. – 2018. – T. 68. – №. 6. – C. 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
18. Brominska B. et al. Klotho expression and nodal involvement as predictive factors for large cell lung carcinoma //Archives of Medical Science. – 2018. – T. 14. – №. 1.
19. Bykov V. J. N. et al. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy //Nature Reviews Cancer. – 2018. – T. 18. – №. 2. – C. 89.
20. Camilli T.C., Xu M., O'Connell M.P., Chien B., Frank B.P., Subaran S. et al. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility //Pigment cell & melanoma research. – 2011. – T. 24. – №. 1. – C. 175-186. doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00792.x.
21. Chang B., Kim J., Jeong D., Jeong Y., Jeon S., Jung S.I. et al. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer //Oncology reports. – 2012. – T. 28. – №. 3. – C. 1022-1028. doi.org/10.3892/or.2012.1865.
22. Chen B., Ma X., Liu S., Zhao W., Wu J. Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner //Cancer biology & therapy. – 2012. – T. 13. – №. 12. – C. 1221-1228. doi.org/10.4161/cbt.21420.
23. Chen B., Wang X., Zhao W., Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2010. – T. 29. – №. 1. – C. 99. doi.org/10.1186/1756-9966-29-99.
24. Chen B. et al. Overexpression of Klotho Inhibits HELF Fibroblasts SASP-related Protumoral Effects on Non-small Cell Lung Cancer Cells //Journal of Cancer. – 2018. – T. 9. – №. 7. – C. 1248.

25. Chen C.D., Tung T.Y., Liang J., Zeldich E., Zhou T.B.T., Turk B.E. et al. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho //Biochemistry. – 2014. – T. 53. – №. 34. – C. 5579-5587. doi: 10.1021/bi500409n.
26. Chen J. et al. The Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w inhibitor, navitoclax, enhances the activity of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo //Molecular cancer therapeutics. – 2011. – T. 10. – №. 12. – C. 2340-2349.
27. Chen L., Liu H., Liu J., Zhu Y., Xu L., He H. et al. Klotho endows hepatoma cells with resistance to anoikis via VEGFR2/PAK1 activation in hepatocellular carcinoma //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 3. – C. e58413. doi.org/10.1371/journal.pone.0058413.
28. Cong L. H. et al. Upregulation of Klotho potentially inhibits pulmonary vascular remodeling by blocking the activation of the Wnt signaling pathway in rats with PM2. 5-induced pulmonary arterial hypertension // Journal of cellular biochemistry. – 2018. – T. 119. – №. 7. – C. 5581-5597.
29. Czabotar P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy //Nature reviews Molecular cell biology. – 2014. – T. 15. – №. 1. – C. 49.
30. Dai D., Wang Q., Li X., Liu J., Ma X., Xu W. Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1 //Oncology reports. – 2016. – T. 35. – №. 1. – C. 552-558. doi.org/10.3892/or.2015.4358.
31. Dallol A. et al. Frequent methylation of the KLOTHO gene and overexpression of the FGFR4 receptor in invasive ductal carcinoma of the breast //Tumor Biology. – 2015. – T. 36. – №. 12. – C. 9677-9683.
32. Davila M. L. et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia //Science translational medicine. – 2014. – T. 6. – №. 224. – C. 224ra25-224ra25.

33. Donehower L. A., Lozano G. 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice //Nature Reviews Cancer. – 2009. – T. 9. – №. 11. – C. 831.
34. Duce J.A., Podvin S., Hollander W., Kipling D., Rosene D.L., Abraham C.R. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey //Glia. – 2008. – T. 56. – №. 1. – C. 106-117. doi.org/10.1002/glia.20593.
35. Duchartre Y., Kim Y. M., Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer //Critical reviews in oncology/hematology. – 2016. – T. 99. – C. 141-149.
36. Farkona S., Diamandis E. P., Blasutig I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? //BMC medicine. – 2016. – T. 14. – №. 1. – C. 73.
37. Forman D. et al. Time for a European initiative for research to prevent cancer: a manifesto for Cancer Prevention Europe (CPE) //Journal of cancer policy. – 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2018.07.001>
38. Fyfe G. et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy //Journal of clinical oncology. – 1995. – T. 13. – №. 3. – C. 688-696.
39. Golomb H. M. et al. Alpha-2 interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients //Journal of Clinical Oncology. – 1986. – T. 4. – №. 6. – C. 900-905.
40. Gomis R.R., Alarcón C., Nadal C., Van Poznak C., Massagué, J.C/EBP β at the core of the TGF β cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells //Cancer cell. – 2006. – T. 10. – №. 3. – C. 203-214. doi.org/10.1016/j.ccr.2006.07.019.
41. Groopman J. E. et al. Recombinant alpha-2 interferon therapy for Kaposi's sarcoma associated with the acquired immunodeficiency syndrome //Annals of internal medicine. – 1984. – T. 100. – №. 5. – C. 671-676.

42. Hainaut P., Pfeifer G. P. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing //Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2016. – T. 6. – №. 11. – C. a026179.
43. He X.J., Ma Y.Y., Yu S., Jiang X.T., Lu Y.D., Tao L. Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets klotho //BMC cancer. – 2014. – T. 14. – №. 1. – C. 218. doi.org/10.1186/1471-2407-14-218.
44. Hoppler S., Kavanagh C. L. Wnt signalling: variety at the core //Journal of cell science. – 2007. – T. 120. – №. 3. – C. 385-393.
45. Hu M. C., Moe O. W. Klotho as a potential biomarker and therapy for acute kidney injury //Nature Reviews Nephrology. – 2012. – T. 8. – №. 7. – C. 423. doi:10.1038/nrneph.2012.92.
46. Imura A., Iwano A., Tohyama O., Tsuji Y., Nozaki K., Hashimoto N. et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane //FEBS letters. – 2004. – T. 565. – №. 1-3. – C. 143-147. doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.090.
47. Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A. et al. α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis //Science. – 2007. – T. 316. – №. 5831. – C. 1615-1618. doi: 10.1126/science.1135901.
48. Ito S., Kinoshita S., Shiraishi N., Nakagawa S., Sekine S., Fujimori T et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse β klotho, which encodes a novel Klotho family protein //Mechanisms of development. – 2000. – T. 98. – №. 1-2. – C. 115-119. doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00439-1.
49. Jähnisch H. et al. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer //Clinical and Developmental Immunology. – 2010. – T. 2010.
50. Jeanbart L., Swartz M. A. Engineering opportunities in cancer immunotherapy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – T. 112. – №. 47. – C. 14467-14472.

51. Kaiser A. M., Attardi L. D. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo //Cell death and differentiation. – 2018. – T. 25. – №. 1. – C. 93.
52. Kirkwood J. M. et al. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684 //Journal of clinical oncology. – 1996. – T. 14. – №. 1. – C. 7-17.
53. Koh N., Fujimori T., Nishiguchi S., Tamori A., Shiomi S., Nakatani T. et al. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney //Biochemical and biophysical research communications. – 2001. – T. 280. – №. 4. – C. 1015-1020. Doi: 10.1006/bbrc.2000.4226.
54. Kops G.J., Dansen T.B., Polderman P.E., Saarloos I., Wirtz K.W., Coffey P.J. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress //Nature. – 2002. – T. 419. – №. 6904. – C. 316. doi:10.1038/nature01036.
55. Korinek V. et al. Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma //Science. – 1997. – T. 275. – №. 5307. – C. 1784-1787.
56. Krishnamurthy N., Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors //Cancer treatment reviews. – 2018. – T. 62. – C. 50-60.
57. Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing //nature. – 1997. – T. 390. – №. 6655. – C. 45. doi:10.1038/36285.
58. Kurosu H., Ogawa Y., Miyoshi M., Yamamoto M., Nandi A., Rosenblatt K.P. et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho //Journal of Biological Chemistry. – 2006. – T. 281. – №. 10. – C. 6120-6123. doi: 10.1074/jbc.C500457200.

59. Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Nandi A., Gurnani P. et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho //Science. – 2005. – T. 309. – №. 5742. – C. 1829-1833. DOI: 10.1126/science.1112766.
60. Labuschagne C. F., Zani F., Vousden K. H. Control of metabolism by p53–Cancer and beyond //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. – 2018.
61. Larkin J. et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma //New England journal of medicine. – 2015. – T. 373. – №. 1. – C. 23-34.
62. Lee J., Jeong D.J., Kim J., Lee S., Park J.H., Chang B. et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma //Molecular cancer. – 2010. – T. 9. – №. 1. – C. 109. doi.org/10.1186/1476-4598-9-109.
63. Levenson J. D. et al. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy //Science translational medicine. – 2015. – T. 7. – №. 279. – C. 279ra40-279ra40.
64. Li Q. et al. Klotho negatively regulated aerobic glycolysis in colorectal cancer via ERK/HIF1 α axis //Cell Communication and Signaling. – 2018. – T. 16. – №. 1. – C. 26.
65. Li S.A., Watanabe M., Yamada H., Nagai A., Kinuta M., Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice //Cell structure and function. – 2004. – T. 29. – №. 4. – C. 91-99. doi: 10.1247/csf.29.91.
66. Li X.X., Huang L.Y., Peng J.J., Liang L., Shi D.B., Zheng H.T. et al. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway //International journal of oncology. – 2014. – T. 45. – №. 2. – C. 611-618. doi.org/10.3892/ijo.2014.2430.

67. Liu S., Gupta A., Quarles L. D. Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone–kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization //Current opinion in nephrology and hypertension. – 2007. – T. 16. – №. 4. – C. 329-335. doi: 10.1097/MNH.0b013e3281ca6ffd.
68. Lojkin I., Schwartzman O., Rubinek T., Wolf I. The aging suppressor hormone Klotho inhibits ovarian cancer cell proliferation by down-regulation of the estrogen receptor. – 2013. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2013-3557.
69. Lu L., Katsaros D., Wiley A., Rigault de la Longrais I.A., Puopolo M., Yu H. Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression //Cancer investigation. – 2008. – T. 26. – №. 2. – C. 185-192. doi.org/10.1080/07357900701638343.
70. Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Identification of the HumanKlothoGene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and SecretedKlothoProtein //Biochemical and biophysical research communications. – 1998. – T. 242. – №. 3. – C. 626-630. doi: 10.1006/bbrc.1997.8019.
71. Maude S. L. et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia //Blood. – 2015. – T. 125. – №. 26. – C. 4017-4023.
72. McDermott D. et al. Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase III trial (MDX010-20) //Annals of Oncology. – 2013. – T. 24. – №. 10. – C. 2694-2698.
73. Mehi S.J., Maltare A., Abraham C. R., King, G. D. MicroRNA-339 and microRNA-556 regulate Klotho expression in vitro //Age. – 2014. – T. 36. – №. 1. – C. 141-149. doi.org/10.1007/s11357-013-9555-6.
74. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age //Nature. – 2011. – T. 480. – №. 7378. – C. 480.

75. Mitani H., Ishizaka N., Aizawa T., Ohno M., Usui S.I., Suzuki T. et al. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage //Hypertension. – 2002. – T. 39. – №. 4. – C. 838-843. doi.org/10.1161/01.HYP.0000013734.33441.EA.
76. Morgan R. A. et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 //Molecular Therapy. – 2010. – T. 18. – №. 4. – C. 843-851.
77. Mu X. et al. Notch signaling mediates skeletal muscle atrophy in cancer cachexia caused by osteosarcoma //Sarcoma. – 2016. – T. 2016.
78. Nabeshima Y. Klotho: a fundamental regulator of aging //Ageing research reviews. – 2002. – T. 1. – №. 4. – C. 627-638. doi: 10.1016/S1568-1637(02)00027-2.
79. Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho //Science's SAGE KE. – 2006. – T. 2006. – №. 8. – C. pe11. DOI: 10.1126/sageke.2006.8.pe11.
80. Nagai R., Saito Y., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Nakamura T. et al. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases //Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 2000. – T. 57. – №. 5. – C. 738-746. Doi: 10.1007/s000180050038.
81. Ohyama Y., Kurabayashi M., Masuda H., Nakamura T., Aihara Y., Kaname T. et al. Molecular cloning of Ratklotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress //Biochemical and biophysical research communications. – 1998. – T. 251. – №. 3. – C. 920-925. doi: 10.1006/bbrc.1998.9576.
82. Pako J. et al. Assessment of the circulating klotho protein in lung cancer patients //Pathology & Oncology Research. – 2018. – C. 1-6.

83. Pan J.Y., Sun C.C., Li S.J., Huang J., Li D. J. Role of miR-10b in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by targeting Klotho //Cancer Cell & Microenvironment. – 2015. – T. 2. – №. 4. [dx.doi.org/10.14800/ccm.936](https://doi.org/10.14800/ccm.936).
84. Pfeffer C., Singh A. Apoptosis: a target for anticancer therapy //International journal of molecular sciences. – 2018. – T. 19. – №. 2. – C. 448.
85. Pol J. et al. Trial Watch—Oncolytic viruses and cancer therapy //Oncoimmunology. – 2016. – T. 5. – №. 2. – C. e1117740.
86. Roberts A. W. et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease //Journal of Clinical Oncology. – 2012. – T. 30. – №. 5. – C. 488.
87. Rubinek T., Shulman M., Israeli S., Bose S., Avraham A., Zundelevich A. et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer //Breast cancer research and treatment. – 2012. – T. 133. – №. 2. – C. 649-657. doi.org/10.1007/s10549-011-1824-4.
88. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design //Cancer discovery. – 2013. – T. 3. – №. 4. – C. 388-398.
89. Saito Y., Nakamura T., Ohyama Y., Suzuki T., Iida A., Shiraki-Iida T. et al. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome //Biochemical and biophysical research communications. – 2000. – T. 276. – №. 2. – C. 767-772. doi.org/10.1006/bbrc.2000.3470.
90. Sharma P., Allison J. P. The future of immune checkpoint therapy //Science. – 2015. – T. 348. – №. 6230. – C. 56-61.
91. Shih P. H., Yen G. C. Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway //Biogerontology. – 2007. – T. 8. – №. 2. – C. 71-80. doi.org/10.1007/s10522-006-9033-y.

92. Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H. et al. Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein //FEBS letters. – 1998. – T. 424. – №. 1-2. – C. 6-10. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00127-6.
93. Shoemaker A. R. et al. Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models //Clinical Cancer Research. – 2008. – T. 14. – №. 11. – C. 3268-3277.
94. Shu G., Xie B., Ren F., Liu D.C., Zhou J., Li Q. et al. Restoration of *klotho* expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells //Cellular oncology. – 2013. – T. 36. – №. 2. – C. 121-129. doi.org/10.1007/s13402-012-0118-0.
95. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2019 //CA: a cancer journal for clinicians. – 2019. – T. 69. – №. 1. – C. 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
96. Solal-Celigny P. et al. Recombinant interferon alfa-2b combined with a regimen containing doxorubicin in patients with advanced follicular lymphoma //New England Journal of Medicine. – 1993. – T. 329. – №. 22. – C. 1608-1614.
97. Sopjani M., Alesutan I., Dërmaku-Sopjani M., Gu S., Zelenak C., Munoz C. et al. Regulation of the Na⁺/K⁺ ATPase by *klotho* //FEBS letters. – 2011. – T. 585. – №. 12. – C. 1759-1764. doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.021.
98. Sun H., Gao Y., Lu K., Zhao G., Li X., Li Z. et al. Overexpression of *Klotho* suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ β -catenin signaling pathway //World journal of surgical oncology. – 2015. – T. 13. – №. 1. – C. 307. doi.org/10.1186/s12957-015-0717-0.
99. Tagliamonte M. et al. Antigen-specific vaccines for cancer treatment //Human vaccines & immunotherapeutics. – 2014. – T. 10. – №. 11. – C. 3332-3346.
100. Tang X., Wang Y., Fan Z., Ji G., Wang M., Lin J et al. *Klotho*: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human

hepatocellular carcinoma //Laboratory investigation. – 2016. – T. 96. – №. 2. – C. 197. doi:10.1038/labinvest.2015.86.

101. Tohyama O. et al. Klotho is a novel β -glucuronidase capable of hydrolyzing steroid β -glucuronides //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279. – №. 11. – C. 9777-9784. doi: 10.1074/jbc.M312392200.

102. Tsukamoto A. S. et al. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice //Cell. – 1988. – T. 55. – №. 4. – C. 619-625.

103. Um H. D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species //Oncotarget. – 2016. – T. 7. – №. 5. – C. 5193.

104. Urakawa I., Yamazaki Y., Shimada T., Iijima K., Hasegawa H., Okawa K. et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23 //Nature. – 2006. – T. 444. – №. 7120. – C. 770. doi:10.1038/nature05315.

105. Usuda J., Ichinose S., Ishizumi T., Ohtani K., Inoue T., Saji H. et al. Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery //Lung Cancer. – 2011. – T. 74. – №. 2. – C. 332-337. doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.03.004.

106. Waldmann T. A. Cytokines in cancer immunotherapy //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2018. – T. 10. – №. 12. – C. a028472.

107. Wang L., Wang X., Wang X., Jie P., Lu H., Zhang S. et al. Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer //American journal of cancer research. – 2011. – T. 1. – №. 1. – C. 111.

108. Wang X., Chen B., Xu W., Liu S., Zhao W., Wu J. Combined effects of klotho and soluble CD40 ligand on A549 lung cancer cells //oncology reports. – 2011. – T. 25. – №. 5. – C. 1465-1472. doi.org/10.3892/or.2011.1178.

109. Wang Y., Chen L., Huang G., He D., He J., Xu W. et al. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway //PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 2. – C. e57391. doi.org/10.1371/journal.pone.0057391.

110. Wang Y., Sun Z. Current understanding of klotho //Ageing research reviews. – 2009. – T. 8. – №. 1. – C. 43-51. doi: 10.1016/j.arr.2008.10.002.
111. Weber J. S. et al. Toxicities of immunotherapy for the practitioner //Journal of Clinical Oncology. – 2015. – T. 33. – №. 18. – C. 2092.
112. Wei S. C., Duffy C. R., Allison J. P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy //Cancer discovery. – 2018. – T. 8. – №. 9. – C. 1069-1086.
113. Wolf I., Laitman Y., Rubinek T., Abramovitz L., Novikov I., Beeri R. et al. Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin //Oncogene. – 2010. – T. 29. – №. 1. – C. 26. doi:10.1038/onc.2009.301.
114. Wolf I., Levanon-Cohen S., Bose S., Ligumsky H., Sredni B., Kanety H. et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer //Oncogene. – 2008. – T. 27. – №. 56. – C. 7094. doi:10.1038/onc.2008.292.
115. Wolf I., O'Kelly J., Rubinek T., Tong M., Nguyen A., Lin B.T. et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer //Cancer research. – 2006. – T. 66. – №. 15. – C. 7818-7823. DOI: 10.1158/0008-5472.
116. Xie B., Zhou J., Shu G., Liu D.C., Zhou J., Chen J. et al. Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer //Cancer cell international. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 18. doi.org/10.1186/1475-2867-13-18
117. Xie B., Zhou J., Yuan L., Ren F., Liu D.C., Li Q. et al. Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma //Human pathology. – 2013. – T. 44. – №. 5. – C. 795-801. doi.org/10.1016/j.humpath.2012.07.023.
118. Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Gurnani P., Nandi A., Kurosu H. et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho //Journal

of Biological Chemistry. – 2005. – T. 280. – №. 45. – C. 38029-38034. doi: 10.1074/jbc.M509039200.

119. Yan Y., Wang Y., Xiong Y., Lin X., Zhou P., Che Z. Reduced Klotho expression contributes to poor survival rates in human patients with ovarian cancer, and overexpression of Klotho inhibits the progression of ovarian cancer partly via the inhibition of systemic inflammation in nude mice //Molecular medicine reports. – 2017. – T. 15. – №. 4. – C. 1777-1785. doi.org/10.3892/mmr.2017.6172

120. Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. Wnt signaling in cancer //Oncogene. – 2017. – T. 36. – №. 11. – C. 1461.

121. Zhou X. et al. Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma //Journal of hematology & oncology. – 2017. – T. 10. – №. 1. – C. 37.

122. Zhou X. et al. Klotho suppresses tumor progression via inhibiting IGF-1R signaling in T-cell lymphoma //Oncology reports. – 2017. – T. 38. – №. 2. – C. 967-974.

БЛАГОДАРНОСТЬ

В заключение автор хотел бы выразить благодарность своему научному руководителю – доктору медицинских наук, профессору, заведующему кафедрой медицинской биологии и генетики, заведующему отделом молекулярных и клеточных технологий ЦНИЛ Уральского государственного медицинского университета

ОЛЕГУ GERMANOVICHU MAKEEVU

за предоставленную возможность выполнения научной работы на столь актуальную тему и неоценимую помощь в решении широкого спектра организационных, практических и теоретических вопросов проведенного исследования.

Хотел бы выразить глубокую признательность коллегам,

СОТРУДНИКАМ

ОТДЕЛА МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ,

постоянная поддержка которых была опорой для автора в минуту сомнений.

Автор всегда будет благодарен коллеге, обучившей его основам культуральной работы, человеку, чей талант, оптимизм и внимание сделали данную работу осуществимой,

АНАСТАСИИ ЕВГЕНЬЕВНЕ ЗВЕРЕВОЙ