

спинного мозга. Для раскрытия механизмов лежащих в основе указанных процессов необходимы дальнейшие исследования и проведение мультиплексного анализа культуры клеток микроглии на разных сроках культивирования.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-4020.2015.7).

Выводы:

1. Травма спинного мозга приводит к увеличению уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-2, MIP-1 α , MCP-1, IL-1 β) в сыворотке животных в течение первых двух недель после повреждения;

2. Генетическая модификация клеток микроглии аденовирусными векторами с генами *egfp* и *gdnf* по-разному влияет на цитокиновый профиль в сыворотке после их трансплантации в область травматического повреждения спинного мозга крыс.

Литература:

1. Ekdahl C.T. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia / C.T. Ekdahl, Z. Kokaia, O. Lindvall // Neuroscience. – 2009. – P. 1021-1029.

2. Gerard C. Chemokines and disease / C. Gerard, B.J. Rollins // Nature Immunology. – 2001. – P. 10-15.

3. Germann T. Interleukin-12. Int. Arch / T. Germann, E. Rude // Allergy Immunol. – 1995. – P.10-12.

4. Laliberte A.M. The immunological response to spinal cord injury: Helpful or harmful? / A.M. Laliberte, M.G. Fehlings // Exp Neurol. – 2013. – P.282-285.

5. Maciejewski-Lenoir D. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. Journal of Immunology. – 1950. – P.1628-1635.

6. Redondo-Castro E. Phagocytic microglial phenotype induced by glibenclamide improves functional recovery but worsens hyperalgesia after spinal cord injury in adult rats. European Journal of Neuroscience. – 2013. – P. 3786-3798.

7. Ren M. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. EMBO J. – 2010. – P. 39-66.

8. Scheff S.W. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. J Neurotrauma. – 2003. – P.179-193.

9. Wood P. Neuroinflammation: Mechanisms and Management. Springer Science & Business Media. – 2002.

УДК 57.021

Д.А. Сичкар, В.В. Мелехин, О.Г. Макеев

**ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ KLOTNO НА СИНТЕЗ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ
РАБДОМИОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий генной и клеточной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**D.A. Sichkar, V.V. Melekhin, O.G. Makeev
INFLUENCE KLOTNO OVEREXPRESSION OF NUCLEIC ACID
SYNTHESIS IN CELL CULTURES OF HUMAN EMBRYONAL
RHABDOMYOSARCOMA**

Department of medical biology and genetics
Ural state medical university
Institute of medical cell technologies
Ekaterinburg, Russian Federation

Контактный e-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследований, проведенных на культуре клеток рабдомиосаркомы линии Rd. В клетках индуцировали гиперэкспрессию гена Klotho. Отмечали как это влияет на концентрацию нуклеиновых кислот в клетках и интенсивность их синтеза. Зарегистрировано достоверное снижение исследуемых параметров под влиянием гиперэкспрессии Klotho.

Annotation. The article presents the results of research carried out on the culture Rd rhabdomyosarcoma cell lines with induced by overexpression of Klotho gene. We investigate how it affects the concentration of nucleic acids in cells and the intensity of their synthesis. Registered a significant decrease in the studied parameters influenced overexpression of Klotho.

Ключевые слова: Клото, рабдомиосаркома, Rd.

Keywords: Klotho, rhabdomyosarcoma.

Ген Klotho, идентифицированный еще в 1997 году [6], как ген анти-старения, в настоящее время активно изучается как супрессор опухолевого роста. В ряде исследований было продемонстрировано, что гиперэкспрессия гена подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз опухолевых клеток различных линий. Так, положительные результаты были получены при изучении действия Klotho на культуру клеток рака молочной железы [5], рака легкого [3] и др. В данной работе приведены последствия гиперэкспрессии гена Klotho на культуру клеток человеческой рабдомиосаркомы (Rd).

Настоящие исследования дополняют наши предыдущие работы, посвященные влиянию гена Klotho на характеристики роста культуры клеток рабдомиосаркомы человека.

Цель исследования – определение влияния индуцированной невирусным вектором гиперэкспрессии гена Klotho на синтез нуклеиновых кислот в культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека линии Rd, культивируемой в среде Игла, модифицированной Дальбекко (DMEM), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки (FBS). Условия инкубирования: 5% CO₂, 37°C. Исследования включали две группы: опытную (Kl+) и контрольную (Kl-). В опытной группе моделировали гиперэкспрессию гена Klotho, контрольная группа оставалась без генетической коррекции.

Гиперэкспрессию гена Klotho в культурах опухолевых клеток моделировали за счет трансфекции плазмидой с геном секретируемой формы белка Klotho. Плазмиду с помощью торгового набора (zymo research, D4015) выделяли из культуры E. coli, предоставленной лабораторией доктора Hal Dietz Университета Джона Хопкинса (США) в рамках договора о межвузовском сотрудничестве. Для трансфекции использован комплекс поликатионных липидов Escort III (Sigma Aldrich). Соотношение ДНК к липидам в трансфекционной смеси: 1 мкг на 1 мкл, соответственно. Контрольная группа исследований подвергалась действию липидов в той же концентрации, но без ДНК. Культуры инкубировали на трансфекционной смеси в течение 18 часов, затем среду в культуральных флаконах меняли на стандартную ростовую.

Концентрацию нуклеиновых кислот определяли в log-фазу кривой роста. Для этого клетки опытной и контрольной группы рассеивали в посевной концентрации 10⁴ клеток на см². С интервалом в двое суток культуры поочередно выводили из эксперимента для подсчета общего количества клеток. Клетки трипсинизировали, 3-кратно отмывали в стерильном 0.9% растворе NaCl от компонентов ростовой среды, подсчитывали в камере Фукс-Розенталя и лизировали 5% раствором муравьиной кислоты при температуре 80-100°C в течение 60 минут. Количество нуклеиновых кислот в каждой полученной пробе определяли спектрофотометрически.

Абсолютное количество нуклеиновых кислот, найденное таким образом, соотносили с количеством клеток в пробе и, тем самым, определяли среднее количество нуклеиновых кислот, приходящееся на 10³ клеток пробы, т. е. *относительное* количество нуклеиновых кислот.

Сравнение интенсивности синтеза нуклеиновых кислот двух групп проводили на культурах, находящихся в середине log-фазы. В культуры клеток вносили общемеченую ¹⁴C оротовую кислоту – молекулу-предшественник нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК) – в концентрации 185 кБк среды. Через сутки клетки трипсинизировали, подсчитывали, седиментировали и

ресуспензировали в 80% этаноле, 3х-кратно отмывали в 0.9% растворе NaCl и подвергали действию 5% раствора муравьиной кислоты при 80-100°C в течение 60 минут. Интенсивность синтеза нуклеиновых кислот определяли по включению меченой оротовой кислоты в макромолекулы. Интенсивность бета-излучения, определяемая в пробах на жидкостном сцинтилляционном счетчике, соответствовала включенной в макромолекулы общемеченой оротовой кислоты.

Все данные представлены в виде среднего значения с доверительными интервалами. Статистический анализ проведен в программе RStudio (Version 0.99.491 – RStudio, Inc.). Разницу между двумя группами определяли по критерию Манна-Уитни. Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

Результаты исследования и их обсуждение

Вследствие синхронизации митотического цикла клеток исследуемых культур, графики, отражающие относительное количество нуклеиновых кислот, имеют «ступенчатый» вид (рис). Достоверное снижение относительного количества нуклеиновых кислот в опытной группе (Kl+) отмечено уже через 2ое суток. В течение log-фазы разница данных показателей в опытной и контрольной группах нарастала, достигнув максимальной величины на 8е сутки. При этом в опытной группе относительное количество нуклеиновых кислот было на 24.1% ниже, чем в контрольной. К 10м суткам эксперимента исследуемые показатели обеих групп сравнялись, предположительно из-за выхода контрольной группы на следующую стадию роста – фазу плато.

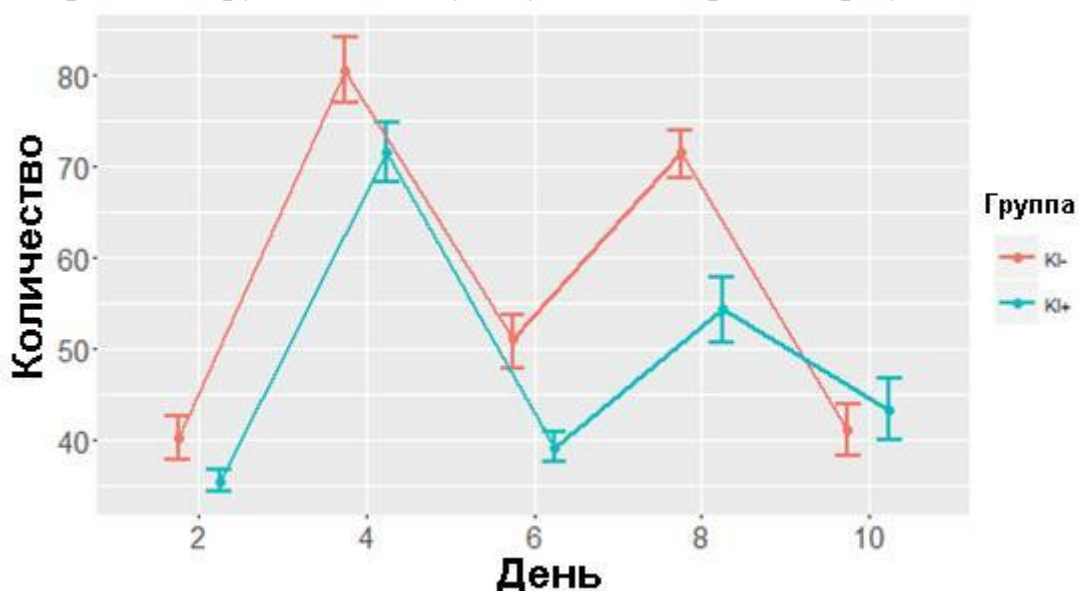


Рис. Относительное количество нуклеиновых кислот (нг/10³ кл.)

Интенсивность синтеза нуклеиновых кислот оценивалась по радиоактивности относительно количества клеток в пробе. В среднем, в контрольной группе регистрировалось 117.66 Бк на 100 тысяч клеток, тогда как в опытной – 101.78. Таким образом, индуцированная гиперэкспрессия Klotho способствовала снижению включения оротовой кислоты в макромолекулы

клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека за сутки в среднем на 13.5% ($p < 0.05$).

В предыдущих наших работах показано, что гиперэкспрессия Klotho ингибирует пролиферативную активность в культуре клеток рабдомиосаркомы. В настоящих исследованиях отмечено влияние Klotho на синтез нуклеиновых кислот. Таким образом, ингибирование пролиферации клеток рабдомиосаркомы, вызванное сверхэкспрессией гена Klotho, сопровождается не только снижением темпов нарастания клеточной массы, но и снижением относительного количества нуклеиновых кислот.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о том, что, например, гиперэкспрессия Klotho, индуцируемая в клетках линии рака легких А-549, сопровождается ингибированием их пролиферации [2, 3]. Однако авторы отмечают, что наряду с замедлением темпов пролиферации, наблюдается активизация апоптотических механизмов в исследуемых клетках.

Из представленного можно сделать вывод о том, что продукты экспрессии генов Klotho обладают способностью, как подавлять пролиферацию злокачественно трансформированных клеток, так и усиливать их апоптотическую гибель.

В пользу данного предположения свидетельствуют и литературные данные. Так, одним из наиболее хорошо изученных свойств Klotho является подавление внутриклеточной сигнальной связи инсулин/инсулин подобный фактор роста 1 (И/ИПФР-1) [10]. Вследствие этого, наблюдается подавление пролиферативной активности опухолевых клеток путем стимуляции экспрессии факторов транскрипции С/ЕВР альфа и бета-супрессоров развития некоторых онкологических заболеваний [4, 5].

Кроме того, ингибирование сигнальной связи И/ИПФР-1 сопровождается снижением экспрессии генов Р1ЗК и АКТ, которые оказывают отрицательное влияние на пролиферативную активность опухолевых клеток [7]. Стоит отметить, что данный эффект продуктов экспрессии генов Klotho не наблюдается в случае нормальных клеток.

С другой стороны, имеются многочисленные свидетельства о том, что мишенями для Klotho являются гены Вах [3]. Последнее сопровождается вовлечением клеток в апоптоз.

Примечательно, что в обоих случаях – влияние продуктов экспрессии генов Klotho на пролиферацию и апоптоз – оказывается задействован сигнальный путь Wnt, эффекты которого в нормальной и злокачественно трансформированной ткани различны [1, 2]. Принимая во внимание изложенное, можно сделать предположение, что основной эффект продуктов экспрессии гена Klotho реализуется именно через данный сигнальный путь, что объясняет различное влияние белков Klotho на нормальные и опухолевые клетки.

Бесспорно, уровень Klotho в опухолевой ткани достоверно ниже, чем в нормальной. Кроме того, имеет право на существование предположение о том, что экспрессия Klotho обратно пропорциональна опухолевой активности.

Анализ структуры гена в области промотора показал наличие на первом экзоне CpG-острова – функционального компонента, указывающего на возможность эпигенетической регуляции экспрессии гена посредством метилирования ДНК. Кроме того, экспериментальным путем была подтверждена возможность регуляции гена на посттранскрипционном уровне с помощью молекул микроРНК (miR), таких как miR-339 и miR-556, которые оказывают негативное действие на экспрессию Klotho. Обе микроРНК могут оказывать воздействие на канцерогенез, а miR-339 является одной из 16 известных miR, уровень которых повышается с возрастом [8]. Тем самым, miR-339 может быть обусловлена и возраст-зависимая экспрессия Klotho.

В связи с тем, что зависимость активности Klotho от уровня обозначенных выше молекул микроРНК не является эффектом односторонним, так как индуцируемое изменение экспрессии Klotho также влечет за собой изменения в концентрации микроРНК, кроме того, крайне затруднительно предположить какой-либо унифицированный первичный агент Klotho-обусловленной индукции канцерогенеза. Однако оправданной представляется идентификация Klotho в качестве одной из ключевых позиций, определяющих канцерогенез.

Выводы:

1. Klotho подавляет синтез нуклеиновых кислот в клетках рабдомиосаркомы. Реализация опухолевой супрессии возможна посредством серии внутриклеточных сигнальных систем;
2. Определение роли Klotho в канцерогенезе перспективно в отношении создания инновационных лечебных и диагностических методик в онкологии.

Литература:

1. Camilli T.C. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility //Pigment cell & melanoma research. – 2011. – Т. 24. – №. 1. – С. 175-186.
2. Chen B. 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. – Т. 13. – №. 12. – С. 1221-1228.
3. Chen B. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2010. – Т. 29. – №. 1. – С. 1.
4. Gery S. Down-regulation and growth inhibitory role of C/EBP α in breast cancer // Clinical cancer research. – 2005. – Т. 11. – №. 9. – С. 3184-3190.
5. Gomis R.R. C/EBP β at the core of the TGF β cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells //Cancer cell. – 2006. – Т. 10. – №. 3. – С. 203-214.

6. Kuro-o M. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing //nature.– 1997. – Т.390. – №6655. – С.45-51.

7. Li X.X. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway //International journal of oncology. – 2014. – Т. 45. – №. 2. – С. 611-618.

8. Mehi S.J. MicroRNA-339 and microRNA-556 regulate Klotho expression in vitro //Age. – 2014. – Т. 36. – №. 1. – С. 141-149.

10. Mitani H. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage //Hypertension. – 2002. – Т. 39. – №. 4. – С. 838-843.

УДК 612.821.1

**Е.А. Третьякова, О.Г. Куропаткина, А.В. Печенкин, А.О. Савина, В.И.
Баньков**
**ВЛИЯНИЕ МУЗЫКИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ
ОРГАНИЗМА**

Кафедра нормальной физиологии
Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

**E.A. Tretyakova, O.G. Kuropatkina, A.V. Pechyonkin, A.O. Savina,
V.I. Bankov**
**IMPACT OF MUSIC ON FUNCTIONAL CONDITION OF HUMAN
ORGANISM**

Department of normal physiology
Ural state medical university
Ekaterinburg, Russian Federation

Контактный e-mail: charodeikaliz@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследования влияния музыки на функциональное состояние организма исполнителя и слушателя в зависимости от преобладающего типа регуляции деятельности сердечнососудистой системы (эрготропный, трофотропный, эрготрофотропный) и типа личности (экстраверсия, интроверсия).

Annotation. The article represents the results of study, in which impact of music on functional condition of performer's and listener's organism depending on cardiovascular system regulation type (ergotropic, trophotropic, ergotrophotropic) and personality type (extraversion, introversion) was examined.

Ключевые слова: психофизиология, музыка, функциональное состояние организма исполнителя и слушателя.