

2. Марголин Д. М. Учебник химии, фармации и фармакогнозии. Книгоиздательство «Сотрудник» Петербург – Киев. 1914.
3. Поспелов В.И. «Этиология, патогенез и принципы патогенетической терапии прогрессирования близорукости у детей» //Материалы научно-практической конференции офтальмологов «Современные технологии медикаментозного лечения в офтальмологии»: Сборник докладов пленарного заседания «Близорукость». – Красноярск: ООО «Офсет Плюс». – 2007. – С. 3–23
4. Prausnitz W. Д-р Основы гигиены с указаниями на германское и австрийское законодательство. Перевод с 6-го увеличенного и дополненного издания д-ра А.Г.Фейнберга, с дополнениями по русскому законодательству д-ра П.О.Смоленского. Санкт-Петербург. Издание журнала «Практическая Медицина» (В. С. Эттингер). 1904 г.

УДК 576.38

**Щеглова А.В., Мелехин В.В., Makeev O.G.
ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTNO НА
ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОМЫ И
РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ**

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

**Shcheglova A.V., Melekhin V.V., Makeev O.G.
THE INFLUENSE OF OVEREXPRESSION OF GENE KLOTNO ON
THE GROWTH CHARACTERISTICS OF CELL CULTURES OF GLIOMA
AND COLON CANCER**

Department of medical biology and genetics
Laboratory of gen-technology and cellular therapy
Institute of medical cell technologies
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследований, которые были проведены на клеточных культурах глиомы человека и рака ободочной кишки (линии А-172 и Сасо-2 соответственно). В клетках индуцировали

гиперэкспрессию гена Klotho, после чего было отмечено достоверное снижение ряда параметров опухолевых клеток.

Annotation. This article represents the results of research conducted on the cultures of glioma and cell culture of colon cancer (A-172 and Caco-2, respectively). In cells induced the overexpression of the gene Klotho, after which it was observed a significant decrease of the number of parameters of tumor cells.

Ключевые слова: Klotho, глиома, A-172, рак ободочной кишки, Caco-2

Key words: Klotho, glioma, A-172, colon cancer, Caco-2

Введение

В настоящее время исследования с экспрессией гена Klotho проводят на различных культурах опухолевых клеток с целью выявления его влияния на жизнеспособность. Экспериментально было доказано, что гиперэкспрессия не только тормозит пролиферативные процессы, но и в некоторых случаях вызывает апоптоз клеток. Подобные результаты были получены в ходе опытов, поставленных на культурах клеток рака молочной железы [4] и рака легкого [2]. Ранее нами были проведены исследования на культуре клеток рабдомиосаркомы человека, в ходе которых было доказано, что снижается не только пролиферативная активность, но и концентрация нуклеиновых кислот, а также скорость их синтеза [1].

Цель исследования – изучение и сравнение влияния гиперэкспрессии гена Klotho на клеточные культуры A-172 и Caco-2.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на культуре клеток глиомы линии A-172 и культуре клеток рака ободочной кишки линии Caco-2, которые рассаживали на культуральные флаконы. Среда DMEM/HamF-12 (SigmaAldrich, США), на которой культивировали клеточные культуры, содержала 10% бычьей фетальной сыворотки (SigmaAldrich, США). Инкубировали при условиях 5% содержания CO₂, t=37°C и 95% влажности. Исследования по каждой клеточной культуре состояли из серии опытов, проведенных на двух группах: опытной и контрольной.

В опытной группе гиперэкспрессия гена Klotho была индуцирована за счет трансфекции плазмидой с геном секретируемой формы белка Klotho, контрольная группа оставалась без коррекции данным геном. Плазмиду выделяли из культуры E. coli, предоставленной лабораторией доктора HalDietz Университета Джона Хопкинса (США), с помощью набора (Zymo Research, D4015, США). Для трансфекции был использован комплекс поликатионных липидов Escort III (SigmaAldrich, США). В трансфекционной смеси соотношение ДНК к липидам - 1 мкг на 1 мкл. На контрольную группу воздействовали той же концентрацией поликатионных липидов, но уже без ДНК.

Культуры высаживали на культуральные флаконы (25 см², Orange, Бельгия) и ставили в инкубатор на 12 часов. После этого подвергли

липосомальной трансфекции плазмидой с полезным геном секретируемой формы Klotho. После трансфекции культуры инкубировали в течение 8 часов, затем среду в культуральных флаконах меняли на стандартную ростовую и помещали в инкубатор сперва на 24 часа, затем на 48 и на 72 часа.

Все полученные данные подвергались статистической обработке на программе RStudio (Version 0.99.491 – RStudio, Inc.) с использованием пакета R версии 3.5.1. Достоверная разница различий подтверждалась посредством теста Шапиро-Уилка, что указывает на нормальное распределение количественных переменных. Также для более точного анализа данных статистическая обработка проводилась с помощью Т-критерия Стьюдента (в случае нормального распределения) и U-критерия Манна-Уитни (при иных распределениях), при этом значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым.

Результаты исследования и их обсуждение

Для культуры клеток рака ободочной кишки человека линии Caco-2 в первые 24 часа достоверной разницы между контрольной и опытной группами выявлено не было (табл.1). Однако через 48 часов были обнаружены статистически значимые различия между группами, включенными в исследование. Так, количество клеток в контрольной группе составляет 12, в опытной – 10.

Таблица 1.

Результирующие количественные значения кривых роста (n=9) и результаты статистической оценки различий групп

Время, ч.	Опыт, кл. x 10^3 / $см^2$	Контроль, кл. x 10^3 / $см^2$	Отклонение от контроля, %	P-значение
24	8.5	9.28	-8.37	0.02
48	10.52	12.97	-18.88	< 0.001
72	22.27	24.44	-8.86	0.08

Как следует из таблицы 1, в опытной группе было зарегистрировано снижение количества клеток на 8.37% относительно контрольных значений.

Анализ различий исследуемых показателей позволил определить достоверное снижение количества клеток в опытной группе. Различия, выявленные в ходе анализа, обладают высокой степенью статистической значимости ($p < 0.001$).

Однако через 72 часа, к моменту завершения эксперимента, было замечено выравнивание показателей количества клеток.

Схожая статистическая обработка данных была проведена и для культуры клеток глиомы человека линии A-172. В первые 24 часа, так же как и в случае с Caco-2, разницы между контрольной и опытной группами не было выявлено. Позднее наблюдается прогрессирование различий между группами (табл. 2).

Таблица 2

Результирующие количественные значения кривых роста (n=10) и
результаты статистической оценки различий групп

Время, ч.	Опыт, кл. x 10 ³ / см ²	Контроль, кл. x 10 ³ / см ²	Отклонение от контроля, %	P-значение
24	7.09	6.81	4.13	0.63
48	12.87	14.99	-14.13	0.002
72	23.68	32.6	-27.36	<0.001

По результатам исследования наблюдается увеличение различий между группами. Показатели, определенные на отметке в 72 часа, подтверждают ингибирующее действие гена Klotho.

В пользу полученных нами результатов свидетельствуют литературные данные. В ходе эксперимента, проведенного на клеточной линии рака легких A-549, были получены схожие результаты. Экспериментально было доказано, что индуцированная гиперэкспрессия гена Klotho замедляет пролиферацию клеток и вместе с тем стимулирует апоптоз. После этого было выдвинуто предположение о влиянии, оказываемом геном Klotho на Вах и Bcl-2 гены, которые влияют на механизмы апоптоза в клетке [3].

Выводы:

1. Гиперэкспрессия гена Klotho способствует снижению жизнеспособности клеток глиомы человека и клеток рака ободочной кишки человека.

2. Снижение жизнеспособности в культурах клеток глиомы линии A-172 и клеток рака ободочной кишки линии Caco-2 может быть обусловлено уменьшением пролиферативной активности, а так же стимуляцией апоптоза.

3. Для культуры клеток рака ободочной кишки характерна особенность, проявляющаяся в способности к выравниванию показателей количества клеток после заметного снижения количества жизнеспособных клеток под действием Klotho.

4. Изучение механизмов действия Klotho на опухолевые клетки в частности и организм в целом создает возможность принципиально нового способа диагностики и лечения онкологических и других заболеваний.

Список литературы:

1. Сичкар Д.А. Влияние гиперэкспрессии Klotho на синтез нуклеиновых кислот в культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека / Д.А. Сичкар, В.В. Мелехин, О.Г. Макеев // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы I Международной (71 Всероссийской) научно-практической конференции молодых учёных и студентов [Электронный ресурс], Екатеринбург, 13-15 апреля 2016 г. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2016. – Т.1. – 1189 с. – ISBN 978-5-89895-776-6. – С 1132-1138.

2. Chen B. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 //Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2011. – Т.29.– №1. – Р. 1.

3. Chen B. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 / B. Chen, X. Wang, W. Zhao, J. Wu // J ExpClin Cancer Res. – 2009. – №19. – Р 29-39.

4. Gomis R.R. C/EBP β at the core of the TGF β cytostatic response and itsevasion in metastatic breast cancer cells // Cancer cell. – 2005. – Vol.10. – №.3. – Р. 203-214.

УДК 577.17.05

**Яковлева Е.А., Сичкар Д.А., Makeev O.G.
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO КАК ЭТАП
РАЗРАБОТКИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

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

**Yakovleva E.A., Sichkar D.A., Makeev O.G.
TRANSDIFFERENTIATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL
STROMAL CELLS IN VITRO AS A STAGE OF DEVELOPMENT OF GENE-
CELLULAR TREATMENT OF HEPATIC INSUFFICIENCY**

Department of medical biology and genetics
Laboratory of gen- technology and cellular therapy
Institute of medical cell technologies
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: larim@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты исследований, проведенных на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Осуществлена трансфекция ММСК плазмидным вектором с геном HGF (фактора роста гепатоцитов) и показана возможность их трансдифференцировки в гепатоцитоподобные клетки. Полученные результаты позволяют проводить дальнейшие исследования по разработке технологии генно-клеточной терапии недостаточности функции печени.