

Отчет о научной работе на тему:
«Влияние препарата цитрат железа «Синтезит» in vitro на
метаболическую активность клеток »

В литературе описано, что аутосомная рецессивная мутация, располагающаяся в гене Klotho, вызывающая низкую экспрессию данного гена, имеет фенотипические проявления (на модели трансгенной линии мышей). Проявления низкой экспрессии этого гена представлены признаками, сопровождающими процесс старения: снижение продолжительности жизни, уменьшение массы тела, бесплодие, атеросклероз, атрофия тимуса и кожи, остеопороз и эмфизема легких [1].

Кроме того, у мышей с мутацией в гене Klotho и его низкой экспрессией 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 Klotho могут привести не только к снижению продолжительности жизни, но и к росту риска развития острого нарушения мозгового кровообращения и ишемической болезни сердца [2,3].

В обзорной работе Nabeshima Y [4], наряду с перечисленным, представлены и другие фенотипические проявления низкой экспрессии гена Klotho, 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 (сахарный диабет 2 типа) [5].

Подтверждением гипотезы о Klotho как гене анти-старения стали исследования Kurosaki et al., продемонстрировавшие, что гиперэкспрессия Klotho, смоделированная у трансгенных линий мышей EFmKL46 и EFmKL48, увеличивает продолжительность их жизни на 18,8 – 30,8%. 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 Klotho наблюдается также и в старческом возрасте [6,7].

Структура гена Klotho 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 [8, 9, 10]. 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 возрастзависимых изменений экспрессии Klotho.

Из литературных данных также известно, что гиперэкспрессия гена Klotho приводит к снижению активности НАДФ-Н-зависимых клеточных

оксидоредуктазных ферментов [11, 12]. Индуцированная гиперэкспрессия гена *Klotho* подавляет активность окислительно-восстановительных процессов, а также ингибирует интенсивность синтеза ДНК и обладает апоптогенным действием в клетках эмбриональной рабдомиосаркомы и глиобластомы человека. Предположили, что возможно, цитрат железа может влиять на экспрессию гена *Klotho*.

Провели серию экспериментов измеряющих количество мРНК образовавшегося с данного гена. В ходе эксперимента установили, что в клетках предварительно проинкубированных с цитратом железа Синтезит в течении 24 часов количество мРНК гена *Klotho* возрастает в 1.9 раза по сравнению с контролем.

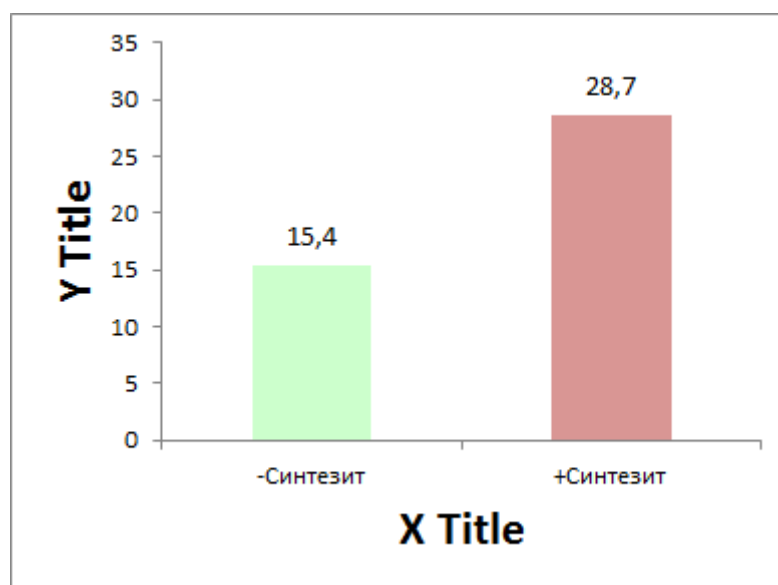


Рисунок 6. Анализ qRT-ПЦР транскрипции *Klotho* относительно уровня экспрессии GAPDH ($n = 3$, *** p -значение $< 0,001$).

Выводы:

Исходя из данных литературы можно предположить, что увеличение экспрессии гена *Klotho* почти в 2 раза может способствовать нормализации

продукции гормона роста; препятствовать старению организма, тем самым увеличивать продолжительность жизни; препятствовать развитию нарушения толерантности к глюкозе (сахарный диабет 2-го типа), нарушению мозгового кровообращения и ишемической болезни сердца. Цитрат железа Синтезит может способствовать дифференцировке В-клеток, препятствовать развитию остеопороза, а также повышать двигательную активность.

Материалы и методы

Протокол обратной транскрипции (синтеза первой цепи кДНК) I

1) Готовили смесь следующих компонентов в стерильной пробирке:

X мкл Вода для ПЦР

1–6 мкл РНК матрица (0.5–2 мкг)

1–3 мкл Праймер «Klotho For1

5'-ACAGAGGTTACAGCATCAGGCG-3'» (20 мкМ)

9 мкл Суммарный объем первой части реакционной смеси

2) Аккуратно перемешивали смесь, капли сбрасывали со стенок на микроцентрифуге.

3) Смесь прогревали 2 мин при 70 °С для расплавления вторичных структур РНК и переносили образцы в лед. Капли реакционной смеси сбрасывали со стенок пробирки на микроцентрифуге.

4) Добавляли 11 мкл предварительно подготовленной смеси следующего состава:

X мкл Вода для ПЦР

4 мкл 5х буфер для синтеза первой цепи

2 мкл Смесь dNTP (10 мМ каждого)

2 мкл DTT (20 мМ)

1–3 мкл MMLV ревертаза (добавить в последнюю очередь!)

11 мкл Суммарный объем второй части реакционной смеси

Для предотвращения возможной деградации проб добавляли в реакционную смесь ингибитор РНКаз (например, RNasin Plus RNase Inhibitor, Promega; SUPERase-IN, Ambion).

5) Аккуратно перемешивали смесь, капли сбрасывали со стенок на микроцентрифуге.

6) Инкубировали реакционную смесь 30–60 мин при 37–42 °С.

7) Для остановки реакции прогревали смесь при 70 °С в течение 10 мин. Образец первой цепи кДНК хранили при -20 °С. Перед использованием аликвоту прогревали 2 мин при 65 °С (для дезагрегации молекул кДНК), встряхивали и собрали капли центрифугированием.

Протокол выполнения амплификации

1. Реакционную смесь размораживали и тщательно перемешивали.
2. Смешивали компоненты реакции в следующей последовательности:

Компонент	Количество на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
Стерильная вода	до 25 мкл	-
qPCRMix-HS SYBR	5 мкл	1X
ПЦР праймер 1	переменное	0.2 - 0.4 мкМ
ПЦР праймер 2	переменное	0.2 - 0.4 мкМ
ДНК-матрица	переменное	1-100 нг на реакцию

3. Режим амплификации

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°С	5 мин
Денатурация		94-95°С	10 - 30 сек

Отжиг	до 50	Tm (65°C)	10 - 30 сек
Элонгация		72°C	10 - 30 сек

Для приблизительного расчета температуры отжига (Tm) использовали формулу: $Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

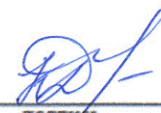
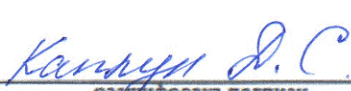
Литература:

1. Kuro-o, M. et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51 (1997).
2. Arking, D. E. et al. *KLOTHO* allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1154–1161 (2003).
3. Arking, D. E. et al. Association of human aging with a functional variant of *klotho*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 856–861 (2002).
4. Nabeshima, Y.-I. *Klotho*: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res. Rev.* 1, 627–638 (2002).
5. Nagai, R. et al. Endothelial dysfunction in the *klotho* mouse and downregulation of *klotho* gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 738–746 (2000).
6. Duce, J. A. et al. Gene profile analysis implicates *Klotho* as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia* 56, 106–117 (2008).
7. 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* 8, 71–80 (2007).
8. Erben, R. G. & Darryl Quarles, L. Endocrine and Paracrine Role of FGF23 and *Klotho* in Health and Disease. (Frontiers Media SA, 2019).

(2014).

10. 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 2, (2015).
11. Wang, Y. & Sun, Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. Hypertension 54, 810–817 (2009).
12. Xu, Y. & Sun, Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. Endocr. Rev. 36, 174–193 (2015).

Отчет подготовили:

   
подпись подпись расшифровка подписи
09.09. 20 21 года