

Экспрессия генов двух изоформ глутатионтрансферазы в плаценте жительниц регионов Украины с различной степенью радиоактивного загрязнения

В. И. Прима, Н. А. Мельник, Е. И. Мартыненко, Г. В. Бартиш,
Т. А. Чайковская, М. Ю. Оболенская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Изучено накопление мРНК изоформ π и μ ГТ в плаценте женщин, проживавших в районах с разным уровнем радиоактивного загрязнения вследствие аварии на ЧАЭС. С помощью гибридизации ДНК-РНК было показано, что длительное проживание на загрязненных территориях вызывает снижение содержания мРНК для двух видов изоформ ГТ, но в большей мере — для ГТ π , что составляет основную часть этого звена системы детоксикации клеток плаценты.

Введение. Глутатионтрансферазы (ГТ) — семейство мультифункциональных белков, осуществляющих конъюгацию восстановленного глутатиона с различными электрофильными веществами. ГТ защищают клетку от вредных веществ эндо- и экзогенной природы и выполняют другие важные функции в клеточном метаболизме. Множественные формы ГТ, специфичные к широкому набору субстратов, обнаружены в клетках большинства видов организмов: от бактерии до человека [1]. У человека клонированы и картированы гены четырех классов ГТ, отличающихся по структуре и субстратной специфичности: α — на 6-й хромосоме, μ — на 1-й хромосоме, π — на 11-й хромосоме и ген микросомной ГТ — на 12-й хромосоме [2]. Накоплено немало данных о том, что ГТ, являясь частью глутатионзависимой системы детоксикации, чутко реагируют на изменения, вызванные малыми дозами ионизирующей радиации [3—7]. Однако в большинстве работ исследовали ферментативную активность ГТ, оставляя открытым вопрос, как влияет длительное действие малых доз радиации на предшествующие уровни экспрессии генов ГТ. Цель настоящей работы состояла в изучении концентрации мРНК ГТ двух классов — π и μ в клетках плаценты женщин, проживавших опреде-

ленное время на территориях с различной степенью радиоактивного загрязнения вследствие аварии на ЧАЭС. Плацента выбрана не только как доступный вид тканей человека, но и потому, что она является естественным барьером, защищающим плод, и насыщена ферментами детоксикационной и антиоксидантной систем [8—12].

Материалы и методы. Объектом исследования служила послеродовая плацента со сроком гестации 39—40 недель. Материал собран по принципу случайности выбора в указанных ниже районах Украины в 1992—1993 годах. Первая группа обследования — бывшие участницы ликвидации аварии на ЧАЭС и женщины из районов обязательного отселения с уровнем поверхностного загрязнения почвы 5—10 Ки/км²; 2-я группа — женщины, проживавшие в сельской местности, в районах усиленного радиационного контроля с уровнем загрязнения почвы 1—5 Ки/км²; 3-я группа — женщины из северных районов Киева (Оболонь и Троещина) с уровнем загрязнения территории до 2 Ки/км² и 4-я группа — женщины, проживавшие в 30-км зоне ЧАЭС и эвакуированные в условно чистые районы на следующий день после аварии. Данные по радиоактивному загрязнению территорий приведены на момент сбора материала. Сразу после рождения образцы плацент замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70 °С.

© В. И. ПРИМА, Н. А. МЕЛЬНИК, Е. И. МАРТЫНЕНКО,
Г. В. БАРТИШ, Т. Л. ЧАЙКОВСКАЯ, М. Ю. ОБОЛЕНСКАЯ.
1997

Тотальную РНК выделяли из плаценты с помощью гуанидинизотиоцианата [13], наносили в количестве 1; 3 и 9 мкг на нейлоновые мембраны («Amersham», Англия) и фиксировали ультрафиолетом. Зонды для гибридизации метили в реакции с олигонуклеотидной затравкой [14]. ^{32}P -меченную зондовую ДНК с удельной радиоактивностью порядка 10^8 имп·мкг $^{-1}$ ·мин $^{-1}$ очищали гель-фильтрацией через сефадекс G-50 [13]. ДНК рекомбинантных плазмид: *pGP12*, содержащей кДНК ГТ π человека [15], и *pRrB3*, содержащей фрагмент гена рибосомной 18S РНК [16], использовали соответственно для выявления мРНК ГТ π и как контроль постоянства количества РНК в пятнах на мембране. Зондом для выявления мРНК ГТ μ человека служила полная кодирующая последовательность гена ГТ μ длиной 663 нуклеотида, синтезированная в полимеразной цепной реакции на ДНК человека, как описано в [17], с олигонуклеотидными праймерами: P1 (5'-AGCACCATGCCCATGATACTGGG-GT-3') и P2 (5'-СТАСТТГТТГСССССAGACAGC-CATC-3').

Мембраны, фиксирующие РНК, предгибризовали в растворе: 50 %-й формамид, 750 мМ NaCl, 75 мМ Na-цитрат, 0,2 %-й DS-Na, 0,1 %-й Na-пирофосфат, 0,1 мг/мл гепарина при 42 °С в течение 1—3 ч. Гибридизацию проводили в том же растворе, содержащем $\approx 10^6$ имп·мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$ денатурированного меченного ^{32}P зонда ДНК, при 42 °С в течение 18—20 ч. От несвязавшейся метки мембраны отмывали при 42 °С последовательно по 30 мин в растворах: 2 × SSC; 1 × SSC, 0,1 %-й DS-Na; 0,2 × SSC, 0,1 %-й DS-Na. Затем мембраны сушили током воздуха и радиоавтографировали на пленке PMB (3—7 сут) [18]. Пленки с радиоавтографами сканировали на лазерном денситометре. Для повторной гибридизации с другим зондом фильтры полностью отмывали от радиоактивной метки в двух сменах H₂O по 2 мин при 90 °С.

Результаты и обсуждение. Гибридизация плацентарной РНК с мечеными зондами, соответствующими различным изоформам ГТ, показала довольно сходные результаты (рис. 1). Поскольку ГТ π является плацентарной формой глутатионтрансферазы, можно было ожидать большей концентрации ее мРНК по сравнению с ГТ μ . Как видно из рис. 2, такое соотношение действительно наблюдается в плаценте женщин, обитавших в относительно чистых районах Киева (группа 3). Однако чем выше вероятная доза радиоактивного облучения, полученного женщинами в результате проживания на загрязненных территориях, тем ниже уровень экспрессии генов ГТ π и тем ближе он к уровню экспрессии генов ГТ μ (см. рис. 2). По-видимому, плацентарная изоформа является более уязвимой для этой неблагоприятной ситуации звеном деток-

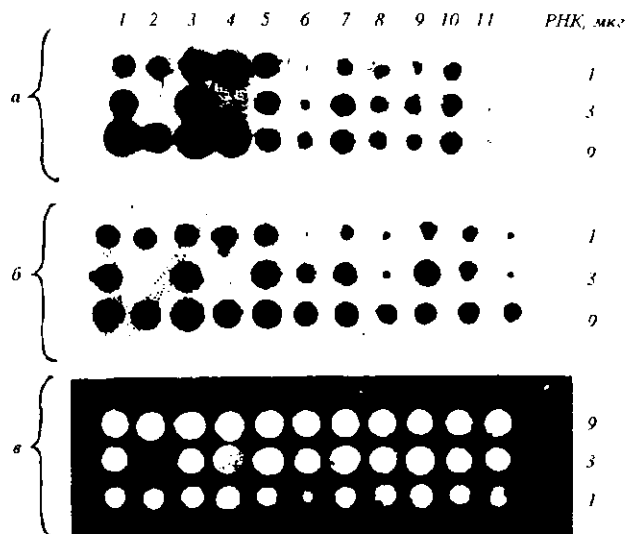


Рис. 1. Гибридизация плацентарной РНК с: зондом ГТ класса π (а); зондом ГТ класса μ (б); зондом 18S рРНК (в) (6—8 — ликвидаторы, 1-я группа обследования; 1, 9, 11 — сельские жительницы, 2-я группа; 2—5 — киевлянки, 3-я группа; 10 — эвакуированные, 4-я группа)

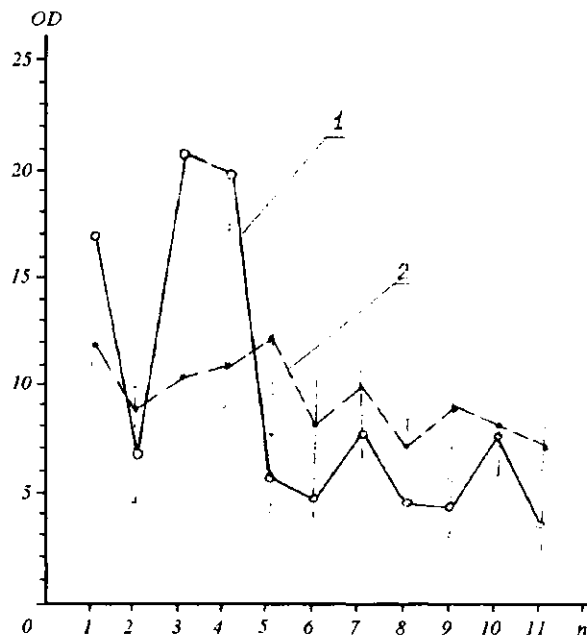


Рис. 2. Экспрессия генов ГТ π (1) и ГТ μ (2) в плаценте. По горизонтали — номера образцов, обозначения, как на рис. 1. По вертикали — оптическая плотность радиоавтографов плацентарной РНК (усредненная по трем параллельным измерениям)

сикационной системы. В целом, наблюдается корреляция между вероятной дозой облучения и концентрацией мРНК ГТ, а некоторые нарушения этой тенденции (образец 1) объяснимы отсутствием жесткой связи полученной дозы с загрязненностью места проживания. Аналогичное снижение экспрессии (на белковом уровне) наблюдалось также в параллельно проведенных исследованиях ферментативной активности ГТ π на значительной выборке образцов из указанных регионов [19].

Таким образом, длительное воздействие малых доз радиации, связанное с проживанием на загрязненных радионуклидами территориях, вызывает угнетение экспрессии генов ГТ в клетках облученного организма на уровне РНК. Это сказывается на биосинтезе различных изоферментов ГТ [19, 20] и, в конечном счете, ослабляет очистку клеток от ксенобиотиков и эндогенных метаболитов и снижает их радиорезистентность.

V. I. Prima, N. A. Melnik, O. I. Martynenko, G. V. Bartish, T. L. Chaikovskaya, M. Yu. Obolenskaya

Експресія генів двох ізоформ глутатіонтрансферази у плаценті жителях регіонів України з різним ступенем радіоактивного забруднення

Резюме

Вивчалось накопичення мРНК ізоформ π та μ глутатіонтрансферази (ГТ) у плаценті жінок, що проживали у районах з різним рівнем радіоактивного забруднення внаслідок аварії на ЧАЕС. За допомогою гібридизації ДНК-РНК було показано, що довгострокове проживання на забруднених територіях спричиняє зниження вмісту мРНК для обох ізоформ ГТ, але в більшій мірі — для ГТ π , що складає основну частину цієї ланки системи детоксикації клітин плаценти.

V. I. Prima, N. A. Melnik, E. I. Martynenko, G. V. Bartish, T. L. Tchaikovskaya, M. Yu. Obolenskaya

Gene expression for two glutathione transferase isoforms in placenta of women from Ukraine regions with various radioactive pollution

Summary

The accumulation of mRNA for π and μ isoforms of GT was studied in placenta of women from regions with various degree of radioactive pollution due to Chernobyl disaster. By means of DNA-RNA hybridization it was shown that long living on polluted territory causes the decrease of mRNA content for both GT isoforms but the effect is stronger for GT π representing the main part of this link of placental cells detoxification system.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Колесниченко Л. С., Кулинская В. И. Глутатионтрансферазы // Успехи соврем. биологии.—1989.—107, № 2.—С. 179—194.
2. Campbell E. A. Glutathione-S-transferases: biological and medical aspects // Einstein Quart.—1990.—8.—Р. 106.
3. Пастух В. Н., Матышевская О. П., Пархомец Т. И., Марченков Ф. С. Некоторые показатели активности антиоксидательной системы глутатиона и оксигеназного превращения арахидоновой кислоты в лимфоцитах селезенки крыс после рентгеновского облучения // Радиобиол. съезд

(Киев, 20—25 сент. 1993 г.): Тез. докл.—Пушино, 1993.—Ч. 2.—С. 774.

4. Siems W., Gartner C., Krauz D. et al. Long term effects of monthly low dose whole body irradiation on the glutathione status and thiobarbituric acid-reactive substances in different organs of male Wistar rats // Radiobiol.—Radiother.—1990.—31.—Р. 257—263.
5. Gerber G., Siems W. Atiopathogenetische Bedeutung von aktivierten Spezies des Sauerstoffs (O₂-Radikale) bei Hypoxie und Ischämie // Zeitschr. Klin. Med.—1987.—42.—S. 1052.
6. Рева А. Д., Лук'яненко О. І., Узлякова О. В. та ін. Дослідження активності гамма-глутамілтрансептидази та глутатіон-S-трансферази в органах і крові шурів після рентгенівського опромінення в малих дозах // VI Укр. біохім. з'їзд: Тези доп.—К.: Вид-во УСГА, 1992.—Ч. 3.—С. 174—175.
7. Рева А. Д., Лук'яненко А. И., Живалюк О. Б. и др. Динамика глутатиона и ферментов метаболизма в органах и крови крыс в разные сроки после хронического рентгеновского облучения в малых дозах // Радиобиол. съезд (Киев, 20—25 сент. 1993 г.): Тез. докл.—Пушино, 1993.—Ч. 3.—С. 859.
8. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase // Adv. Enzymol.—1985.—57.—Р. 357—417.
9. Meister A., Anderson M. E. Glutathione // Ann. Rev. Biochem.—1983.—52.—Р. 711—760.
10. Nebert D. W., Gonzalez F. J. P450 genes: structure, evolution and regulation // Ibit.—1987.—56.—Р. 945—994.
11. Pasanen M., Pelkonen O. The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta // Crit. Rev. Toxicol.—1994.—24.—Р. 211—229.
12. Sies H. Strategies of antioxidant defence // Eur. J. Biochem.—1993.—215.—Р. 213—219.
13. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1985.—479 с.
14. Feinberg A. P., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // Analyt. Biochem.—1984.—137.—Р. 266—267.
15. Kano T., Sakai M., Muramatsu M. Structure and expression of a human class pi glutathione S-transferase messenger RNA // Cancer Res.—1987.—47.—Р. 5626—5630.
16. Braga E. A., Avdonina T. A., Zhurkin V. B., Nosikov V. V. Structural organization of rat ribosomal RNA genes: interspersed sequences and their putative role in the alignment of nucleosomes // Gene.—1985.—36.—Р. 249—262.
17. Drakoulis N., Seeger K., Grob D. et al. Determination of glutathione-S-transferase μ genotype in humans by PCR-amplified gene-probes // Genet. and Evol.—1992.—Р. 94—98.
18. Патер Л. В., Хрипунов В. А., Прима В. И. Модификация методов выделения РНК с гуанидинийтиоцианатом и вакуумный перенос на мембраны улучшают возможности анализа высокомолекулярных транскриптов из клеток животных // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 70—75.
19. Оболенская М. Ю., Чайковская Т. Л., Лебедева Л. М., Прима В. И. и др. Глутатионтрансферазная активность в зрелой плаценте из некоторых регионов Украины // Вопр. мед. химии.—1996.—42, № 4.
20. Барабой В. А., Олійник С. А., Хмельський Ю. В. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності // Укр. біохім. журн.—1994.—66, № 4.—С. 3—18.