

А. Я. Литошенко, Н. В. Рогинец

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ В УСЛОВИЯХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА**

Исследовали влияние возраста и оксидативного стресса на уровень экспрессии генов аденозиндезаминазы, альбумина и *c-myc*. Оксидативный стресс моделировали перфузией печени крыс *in situ* 17 мМ  $H_2O_2$ . Уровень экспрессии генов оценивали с помощью дот-гибридизационного анализа препаратов тотальной РНК. Выявлено возрастание экспрессии исследуемых генов при старении. Показано повышение уровня содержания мРНК этих генов у молодых и старых животных в условиях оксидативного стресса.

**Введение.** С возрастом и, в частности, при старении общий уровень экспрессии генетической информации снижается [1, 6, 7]. Это может быть связано со сдвигами в структуре генома на различных уровнях его организации, в том числе и на уровне хроматина [1]. Возрастные изменения в геноме сопровождаются, однако, как уменьшением, так и увеличением экспрессии некоторых генов [3, 7, 11]. Одной из причин старения могут быть свободно-радикальные реакции, лежащие в основе многих структурных и функциональных перестроек в клетках [4, 10], что, как правило, ведет к нарушению экспрессии генетической информации клетки. Однако в связи с тем, что основная масса свободных радикалов генерируется митохондриями [8], представляется проблематичной их роль, а также индуцируемых ими перекисных процессов в нарушениях структуры и функции ядерного генома.

Поэтому целью настоящей работы явилось исследование влияния возраста и индукции образования свободных радикалов на уровень экспрессии в печени крыс гена альбумина, имеющего конститутивный характер экспрессии, гена аденозиндезаминазы (АДА) и протоонкогена *c-myc*, экспрессия которого тесно сопряжена с клеточным циклом.

**Материалы и методы.** В работе использовали белых крыс линии Вистар трех возрастных групп: 2—3 месяца (молодые), 6—8 месяцев (взрослые), 26—28 месяцев (старые). В каждый отдельный эксперимент брали по три и более животных всех возрастных групп. Оксидативный стресс моделировали перфузией печени крыс *in situ* 17 мМ раствором  $H_2O_2$  в течение 35—45 мин при 37 °С. Из печени выделяли тотальную РНК с использованием гуанидинизотиоцианата [13]. Чистоту выделенной РНК проверяли спектрофотометрически и электрофоретически, концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра СФ-46 [2]. Тотальную РНК денатурировали в растворе формамида при 65 °С и наносили на нитроцеллюлозный фильтр в разных количествах (от 0,5 до 10 мкг) с помощью прибора Dia-Dot.

В качестве зондов использовали: ген сывороточного альбумина крыс в плазмиде *pRSA*, ген аденозиндезаминазы грызунов в плазмиде *pADA*, а также плазмиду со вставкой протоонкогена *c-myc*, для которой вектором служила *pBR322*. Для мечения зондов применяли [ $^{32}P$ ]дЦТФ (Ташкент) и коммерческий набор для ник-трансляции фирмы «Amersham» (Великобритания). Дот-гибридизацию с зондами проводили в стандартных условиях [2]. После отмывки фильтры использовали для автордиографии в течение 3—4 сут при —20 °С (пленка РМ-В). Радиоавтографы денситометрировали на микрофотомстре ИФО-451.

Результаты обрабатывали с помощью метода вариационной статистики с применением критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены радиоавтографы дот-гибридизации использованных нами зондов с препаратами тотальной РНК из интактной и перфузированной перекисью водорода печени крыс трех возрастных групп. Видно, что величина сигнала гибридизации пропорциональна количеству препарата тотальной РНК, нанесенной на мембранный фильтр, и изменяется как с возрастом животных,

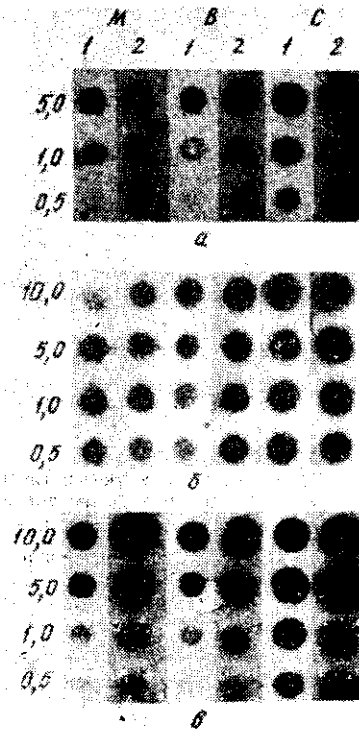
так и под влиянием перфузии. Денситометрия радиоавтографов позволила оценить их количественно.

Данные, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том, что с возрастом у животных экспрессия исследуемых генов изменяется неодинаково как количественно, так и качественно. В печени взрослых крыс экспрессия генов АДА и альбумина увеличивается, а экспрессия гена *c-myc* уменьшается по сравнению с молодыми животными, тогда как в печени старых крыс экспрессия всех трех генов увеличивается по сравнению и с молодыми, и со взрослыми. Наиболее выраженные возрастные изменения отмечаются в экспрессии гена АДА, а наименее выраженные, хотя и статистически значимые, — в экспрессии *c-myc*.

Как свидетельствуют данные литературы, с возрастом увеличивается синтез альбумина в клетках печени крыс [12], в то время как в отношении синтеза АДА возрастных изменений не обнаружено [9]. Экспрессия гена *c-myc* увеличивается с возрастом в печени крыс линии Fisher-344 [11]; кроме того, известно, что экспрессия *c-myc* повышается в ответ на различные стимулы, вызывающие клеточную пролиферацию, такие как фактор роста эпидермиса и частичная гепатэктомия [5].

Предполагалось, что суммарное снижение синтеза тотальной РНК в печени

Рис. 1. Гибридизация тотальной РНК печени крыс разного возраста с зондами, содержащими последовательности генов АДА (а), альбумина (б) и *c-myc* (в): 1 — интактная; 2 — перфузированная печень. М — молодые; В — взрослые; С — старые. Слева указано количество тотальной РНК (мкг), нанесенной на мембранный фильтр



и мозге у старых животных является результатом падения активности РНК-полимераз, и/или уменьшения доли транскрибируемой ДНК [1], которое обусловлено связыванием и экранированием последовательностей ДНК белками хроматина. Высказывались предположения и о том, что при старении возрастает количество ДНК-белковых ковалентных связей, чему способствует увеличение числа однопочечных разрывов ДНК [4]. В некоторых исследованиях было показано повышение уровня экспрессии ряда генов с возрастом [3, 6, 7], что может быть связано как с изменениями гормонального статуса организма и метаболических процессов в различных тканях, так и со структурными перестройками хроматина. Увеличение с возрастом числа поперечных сшивок в хроматине, способных изменять его структуру, вероятно, обусловлено различными причинами, в том числе и присутствием свободных радикалов [1, 4, 10]. Последние, вызывая образование одно- и двунитчатых разрывов в ДНК, также могут делать доступными для факторов транскрипции некоторые последовательности ДНК, находящиеся в не-транскрибируемых участках генома.

Результаты наших исследований показали, что величина стимулирующего эффекта перфузии печени крыс перекисью водорода на экспрессию изучаемых генов в значительной степени зависит от возраста животных (рис. 3). Это может быть связано как с разной степенью активации внутриклеточных процессов, приводящих к индукции синтеза РНК данных генов, так и с возрастными особенностями структуры хроматина этих генов.

В перфузированной печени повышается синтез мРНК генов альбумина, АДА и *c-myc* у молодых и старых крыс, причем у старых животных степень индукции экспрессии этих генов наиболее выражена. У взрослых животных перфузия  $H_2O_2$  оказывает значимый стимулирующий эффект лишь на экспрессию гена АДА. Можно предположить, что механизмы увеличения экспрессии исследованных в этой работе генов в условиях оксидативного стресса имеют какие-то общие черты вследствие прямого воздействия свободных радикалов или продуктов их реакции на структуру хроматина посредством образования одно- и двуничатых разрывов. Следовательно, особен-

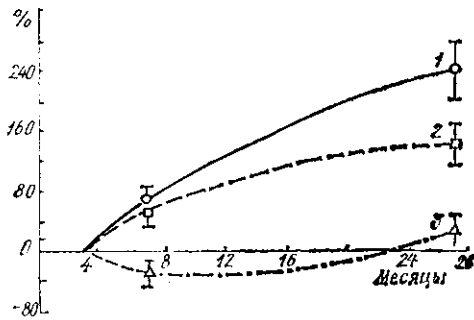


Рис. 2. Возрастные особенности изменения экспрессии генов АДА (1), альбумина (2) и *c-myc* (3). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ) между группой старых и взрослых животных и между группой старых и молодых животных

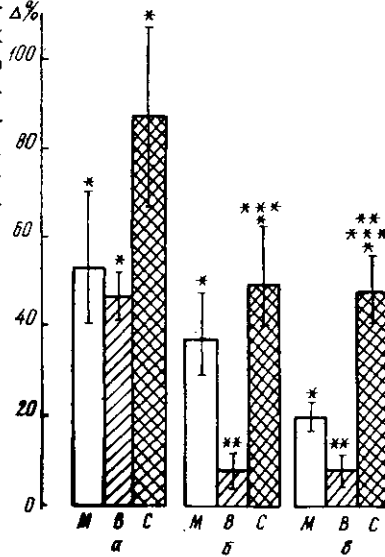


Рис. 3. Влияние перфузии печени раствором  $H_2O_2$  на уровень экспрессии генов АДА (а), альбумина (б) и *c-myc* (в) в печени крыс разного возраста. М — молодые, В — взрослые, С — старые; \* различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными, \*\* молодыми и \*\*\* взрослыми животными

ности структурной организации хроматина клеток печени у молодых и старых крыс отличаются от таковых у взрослых животных, что делает геном более уязвимым для повреждающих факторов, в том числе и действия продуктов свободно-радикальных реакций. При этом нужно учитывать, что повышение уязвимости хроматина отдельных генов может быть следствием как возрастных особенностей их физиологической регуляции, так и количества их структурных повреждений, полученных в процессе онтогенеза.

**Резюме.** Досліджено вплив віку та оксидативного стресу на рівень експресії генів аденозиндезамінази, альбуміну і *c-myc*. Оксидативний стрес моделювали перфузією печінки щурів *in situ* 17 мМ  $H_2O_2$ . Рівень експресії генів оцінювали за допомогою дот-гібридаційного аналізу препаратів тотальної РНК. Виявлено зростання експресії досліджуваних генів за старіння. Показано підвищення рівня мРНК цих генів у молодих та старих тварин за умов оксидативного стресу.

**Summary.** The effect of aging and oxidative stress on the expression of adenine deaminase, albumin and *c-myc* were explored. The liver was perfused *in situ* by 17 mM  $H_2O_2$ . The expression (mRNA levels) of these genes was estimated by dot-hybridization analysis of total RNA. Our results indicate that the expression of these genes increases during rats senescence. It was shown that the oxidative stress induced the increase of mRNA levels these genes in liver of young and old rats.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Канунго М. Биохимия старения.— М.: Мир, 1982.— 289 с.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.

3. Rao G., Xia E., Richardson A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fisher F 344 rats // *Mech. Aging and Develop.*—1990.—53, N 1.— P. 49—60.
4. Harman D. The aging process // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78, N 11.— P. 7124—7128.
5. Cochran K. K. B. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor // *Cell.*—1983.—35, N 3.— P. 603—610.
6. Smith J. R., Pereria-Smith O. M. Further studies on the genetic and biochemical basis of cellular senescence // *Exp. Gerontol.*—1989.—24, N 5—6.— P. 377—381.
7. Freidman V., Wagner J., Danner D. B. Isolation and identification of ageing-related cDNAs in the mous // *Mech. Aging and Develop.*—1990.—52, N 1.— P. 27—43.
8. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // *Physiol. Rev.*—1979.—59, N 3.— P. 527—605.
9. Rothstein N. Exchanges in enzymatic porteins during aging // *Mol. basis of aging / Eds A. K. Roy, B. Chatterjee.*—Orlando: Acad. press, 1984.— P. 299—231.
10. Castes de Paulet A. Radicaux libres et vieillissement // *Annu. Biol. Clin.*—1990.—48, N 5.— P. 323—330.
11. Matocha M. F., Cosgrove J. M., Atack J. R., Rapoport S. I. Selective elevation of c-myc transcript levels in the liver of the aging-Fisher-F344 rats // *Biochem. and Biophys. Res. Communs.*—1987.—147, N 1.— P. 1—7.
12. Bulther J. A. The effect of aging on the synthesis hepatocyte-specific proteins // *J. Cell. Physiol.*—1989.—141, N 2.— P. 400—409.
13. Chomczynski P., Sacchif N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—162, N 1.— P. 156—159.

Ин-т геронтологии АМН Украины, Киев

Получено 01.06.93