

Влияние низких доз радиации на содержание РНК супероксиддисмутазы в различных тканях мышей

В. И. Прима, Е. И. Мартыненко, Ю. В. Вагин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Исследовано содержание мРНК CuZn-содержащей изоформы супероксиддисмутазы (CuZn-СОД) в клетках различных тканей мышей. С помощью ДНК-РНК-гибридизации установлено, что длительное действие низких доз радиации вызывает ингибирование транскрипции CuZn-СОД в селезенке и яичках и стимулирует экспрессию гена этого фермента в печени и мозге облученных животных. Обсуждается вопрос о возможном участии CuZn-СОД в обеспечении радиорезистентности клеток млекопитающих.

Введение. Среди ферментов, защищающих клеточные структуры от разрушительного воздействия свободных радикалов и перекисей, важное место занимает супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1). Этот фермент обезвреживает супероксидные анион-радикалы посредством дисмутации и превращения в менее реакционно способные молекулы перекиси водорода и триплетного кислорода [1]. Некоторые исследования указывают на важную роль СОД в формировании радиорезистентности тканей [1, 2]. С другой стороны, под действием ионизирующей радиации активность СОД *in vivo* претерпевает изменения: высокие дозы радиации (6—30 Гр) инактивируют СОД в эритроцитах, энтероцитах, клетках печени и мозга в пределах одних суток после облучения [3, 4]. В отношении же низких доз радиации данные литературы противоречивы [5]. Имеются сведения как о стимуляции [6, 7], так и об угнетении [8, 9] активности СОД при облучении суммарной дозой до 1 Гр. Все эти данные получены при измерениях ферментативной активности и оставляют открытым вопрос о степени влияния радиации на экспрессию генов СОД на более высоких уровнях, в частности, на уровне синтеза и накопления РНК. Изучению этого влияния в различных тканях животных, подвергшихся

хроническому облучению низкими дозами радиации, посвящена эта работа.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали 4-месячных самцов мышей линии Black из двух родственных групп. Одна из них находилась в виварии ИМБиг НАН Украины (Чернобыль) в 1989—90 гг. В рацион питания этой группы входил радиоактивный зеленый корм, загрязненность радионуклидами которого составляла 0,1—0,01 мкКи/кг, что создавало суммарное облучение животных примерно на порядок выше природного фона. Другая, контрольная группа животных, находилась в виварии ИМБиг НАН Украины (Киев), в ее рацион питания входили только чистые продукты.

Препараты тотальной РНК выделяли модифицированным методом [10] из печени, мозга, яичек и селезенки мышши. Для этого навеску ткани замораживали и растирали в жидком азоте, добавляли (5 мл на 1 г ткани) буфер STEL (0,2 % SDS, 10 мМ трис-НСl, рН 7,0, 10 мМ ЭДТА, 100 мМ LiCl) и равный объем 80 %-го фенола, насыщенного этим буфером. После фенольной депротенинизации суспензию дважды обрабатывали смесью фенол — хлороформ и один раз — хлороформом. Молекулы РНК и ДНК разделяли в присутствии 3 М LiCl в течение 1 ч на ледяной бане. При этом РНК выпадала в осадок, а надосадочная жидкость содержала преимущественно ДНК. В ряде случаев пре-

параты РНК дополнительно очищали от ДНК, обрабатывая их ДНКазой («Sigma», США).

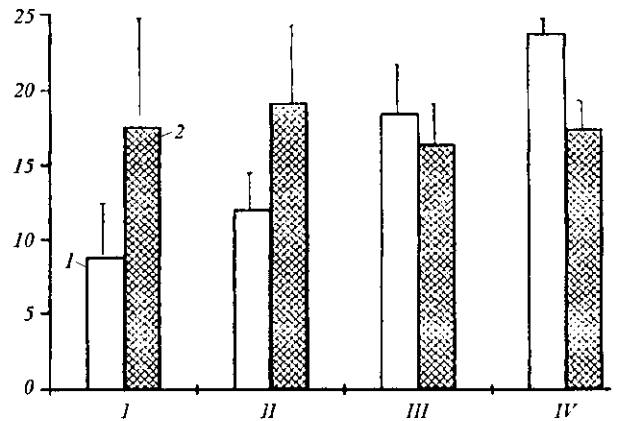
Аликвоты суммарного препарата РНК (по 10 мкг на точку) денатурировали в растворе $10 \times$ SSC и 18 % формальдегида в течение 10 мин при температуре 65 °С, охлаждали во льду, наносили на нейлоновые мембраны Hybond N («Amersham», Англия) и фиксировали на протяжении 3 мин ультрафиолетом (254 нм).

В качестве зонда в ДНК-РНК-гибридизации использовали фрагмент гена CuZn-зависимой СОД человека (500 п. н.) в составе *pBR322*, любезно предоставленной В. А. Ковалевым [11]. Для контроля постоянства количества РНК в пятнах на фильтрах использовали рекомбинантную плазмиду *pBrB3*, содержащую фрагмент гена рибосомной 18S РНК крысы [12]. ДНК, меченную ^{32}P , с удельной радиоактивностью порядка $1 \cdot 10^8$ имп/мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ получали в реакции с «рассеянной» затравкой [13].

Гибридизацию осуществляли в течение 18—24 ч при 42 °С в растворе (50 %-й формамид, 750 мМ NaCl, 75 мМ Na-цитрат, 0,2 %-й SDS, 0,1 %-й пиррофосфат Na, 0,1 мг/мл гепарина), содержащем около 10^6 имп·мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$ денатурированного меченного ^{32}P зонда ДНК. От несвязавшейся радиоактивности фильтры отмывали при той же температуре последовательно в течение 30 мин в растворах: $2 \times$ SSC; $1 \times$ SSC + 0,1 % SDS; $0,2 \times$ SSC + 0,1 % SDS. Мембраны радиоавтографировали на пленке PMB в течение 3—7 сут. Пленки с радиоавтографами сканировали на лазерном денситометре (LKB Ultrosap XL, Швеция). Для повторной гибридизации с другим зондом фильтры полностью отмывали от радиоактивной метки в двух сменах воды по 2 мин при 90 °С.

Результаты и обсуждение. Анализ данных Нозерн-гибридизации выявил особенности тканеспецифической экспрессии гена CuZn-СОД у мышей контрольной группы. Согласно данным, представленным на рисунке, преимущественный синтез мРНК указанного ферментного антиоксиданта наблюдался в яичках и селезенке исследованных животных, тогда как в тканях мозга и печени имело место снижение содержания мРНК СОД. Такие вариации в уровнях транскрипции гена цитозольного изофермента СОД, возможно, и обуславливают специфическую обеспеченность СОД клеток разных органов мышей.

Особый интерес вызывают экспериментальные данные, показывающие, что влияние продолжительного облучения низкой мощности на экспрессию гена СОД в клетках мышей очень зависит от типа ткани (см. рисунок). Длительное действие малых доз ионизирующей радиации уменьшало



Относительное содержание РНК, транскрибированной с генов CuZn-супероксиддисмутазы, в различных тканях мышей из «киевской» (1) и «чернобыльской» (2) групп: I — печень; II — мозг; III — селезенка; IV — яички. Данные микроденситометрии радиоавтографов представлены в произвольных единицах оптической плотности. Для каждого органа результат является средним для 4—6 различных образцов

уровни синтеза мРНК CuZn-СОД в яичках животных чернобыльской группы в 1,4 раза, а в селезенке — в 1,3 раза. Можно предположить, что ингибирование транскрипции гена этого изофермента СОД связано с повышенной радиочувствительностью репродуктивных и кроветворных органов мышей. В то же время в тканях печени и мозга радиация вызывала увеличение количества CuZn-СОД-транскриптов в 2,0 и 1,7 раза соответственно. Эти результаты согласуются с данными Харца и соавт. [14], показавшими, что измеренное иммунохимическими методами высокое содержание СОД в таких органах человека, как мозг, печень, почка, сердечная мышца, коррелирует с их радиорезистентностью, тогда как органы с низким уровнем фермента — костный мозг, селезенка — более уязвимы в отношении ионизирующего облучения.

В настоящее время нет полной ясности относительно механизма участия этого фермента в радиобиологических процессах. Например, данные работ [15—18] указывают на прямую корреляцию радиорезистентности клеток млекопитающих с высоким уровнем транскрипционной и ферментативной активности Mn-содержащей митохондриальной изоформы СОД. Что касается роли цитозольного CuZn-зависимого изофермента СОД в этих процессах, то немногочисленные данные неоднозначны

[16, 18]. Имеющиеся сведения противоречивы и трудно сопоставимы, так как получены в разных экспериментальных условиях и системах.

Таким образом, приведенные в настоящей работе экспериментальные данные, полученные на уровне синтеза РНК, представляют собой начальный этап исследований потенциальной роли CuZn-SOD в обеспечении радиорезистентности клеток млекопитающих и показывают, что при малых дозах облучения эндогенная СОД может быть отнесена к ферментным системам радиационной защиты клетки.

V. I. Prima, O. I. Martynenko, Yu. V. Vagin

Вплив низьких доз радіації на вміст РНК супероксиддисмутази в різних тканинах мишей

Резюме

Досліджено вміст мРНК ізоформи супероксиддисмутази, що містить CuZn (CuZn-SOD), у різних тканинах мишей. За допомогою ДНК-РНК-гібридизації з'ясовано, що довгострокова дія низьких доз радіації призводить до пригнічення транскрипції CuZn-SOD у селезінці і яєчках та стимулює експресію гена цього ферменту в печінці і мозку опромінених тварин. Обговорюється питання щодо можливої участі CuZn-SOD у забезпеченні радіостійкості клітин ссавців.

V. I. Prima, E. I. Martynenko, Yu. V. Vagin

The influence of low doses of radiation on the content of superoxide dismutase RNA in different tissues of mice

Summary

The content of mRNA coding copper-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) was studied in cells of different tissues of mice. With the help of DNA-RNA hybridization it was found that long effect of low doses of radiation causes the inhibition of CuZn-SOD transcription in spleen and testicle and stimulates the gene expression of this enzyme in liver and brain of irradiated animals. The question about possible participation of CuZn-SOD in radioresistance of mammals cells is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев В. А., Брусов О. С., Панченко Л. Ф. Супероксиддисмутаза — радиобиологическое значение и возможности (Обзор) // *Вопр. мед. химии.*—1980.—26, № 3.—С. 291—301.
2. Peng T. X., Moya A., Ayala F. J. Irradiation-resistance conferred by superoxide dismutase: Possible adaptive role of a natural polymorphism in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 3.—P. 684—687.
3. Гончаренко Е. Н., Гудзь Т. И., Пешкова Е. Г. Изучение активности супероксиддисмутази при лучевом поражении животных // *Биол. науки.*—1980.—№ 7.—С. 34—37.
4. Липиньски С., Линецка К., Донец Я. и др. Влияние ионизирующего излучения на активность супероксиддисмутази, определяемой хемиллюминесцентным методом // *Радиобиология.*—1976.—16, № 5.—С. 665—670.
5. Барабой В. А., Олійник С. А., Хмелевський Ю. В. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності // *Укр. біохім. журн.*—1994.—66, № 4.—С. 3—18.
6. Yamaoka K., Edamatsu R., Mori A. Time dependent changes in SOD activities and lipid peroxides levels in organs of rats after low dose X-ray irradiation // *J. Radiat. Res.*—1991.—32, N 1.—P. 73.
7. Гацко Г. Г., Мажуль Л. М., Шаблинская О. В. и др. Влияние ионизирующего излучения на перекисное окисление липидов в крови крыс // *Радиобиология.*—1990.—30, № 3.—С. 413—415.
8. Tanaka H., Iwasaki S., Suzuki H. et al. Biochemical analyses of cerebrum of fetal rats X-irradiated in utero. Content and composition of DNA, superoxide dismutase and lipid peroxide // *Radiat. Risks Developing Nervous Syst. Int. Symp.*—Stuttgart; New York, 1986.—P. 231—242.
9. Гацко Г. Г., Мажуль Л. М., Вольхина В. Е. и др. Влияние повышенного радиационного фона на перекисное окисление липидов в крови экспериментальных животных // *Материали I Науч.-практ. конф.*—Минск, 1990.—С. 203—208.
10. Raha S., Merante F., Proteau G., Reed J. K. Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride // *Genet. Anal.*—1990.—7, N 7.—P. 173—177.
11. Ковалев В. А., Трояновский Б. М. Клонирование Cu/Zn зависимой супероксиддисмутази человека в экспрессирующих векторных плаزمидях // *Новые направления биотехнологии: Тез. докл. Всесоюз. конф.*—М., 1988.—С. 54.
12. 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.—P. 249—262.
13. Feinberg A. P., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Analyt. Biochem.*—1984.—137.—P. 266—267.
14. Hartz J. W., Deutsch H. F., Funakosi S. Superoxide dismutase radiobiological significance and potential importance // *Clin. chim. acta.*—1973.—46, N 1.—P. 125—132.
15. Otero G., Aliva M. A., Emfietzoglou D., Clerch L. B., Massaro D., Notario V. Increased manganese superoxide dismutase activity, protein, and mRNA levels and concurrent induction of tumor necrosis factor alpha in radiation-initiated Syrian hamster cell // *Mol. Carcinog.*—1996.—17.—N 4.—P. 175—180.
16. Zhong W., Oberley L. W., Oberley T. D., Yan T., Domann F. E., St. Clair D. K. Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cell // *Cell Growth. Differ.*—1996.—7, N 9.—P. 1175—1186.
17. Epperly M., Bray I., Kraeger S., Zwacka R., Engelhardt I., Travis E., Greenberger I. Prevention of late effects of irradiation lung damage by manganese superoxide dismutase gene therapy // *Gene Ther.*—1998.—5, N 2.—P. 196—208.
18. Sun J., Chen Y., Li M., Ge Z. Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance // *Free Radic. Biol. Med.*—1998.—24, N 4.—P. 586—593.

УДК 547.963.3

Поступила в редакцию 07.05.98