

Анализ экспрессии генов как метод детектирования малых доз ионизирующих излучений, формальдегида и диоксинов

© 2013. М. В. Шапошников^{1,2}, к.б.н., с.н.с., доцент, Е. Н. Плюснина^{1,2}, к.б.н., н.с., ст. преподаватель, С. Н. Плюсин^{1,2}, к.б.н., н.с., доцент, О. А. Шосталь^{1,2}, к.б.н., н.с., ст. преподаватель, Л. А. Шилова¹, ст. лаборант-исследователь, Н. В. Земская¹, лаборант-исследователь, И. Н. Юраниева², к.б.н., доцент, А. А. Москалев^{1,2,3}, д.б.н., зав. лабораторией, зав. кафедрой,

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

²Сыктывкарский государственный университет,

³Московский физико-технический институт (государственный университет),

e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

За последние 10–15 лет опубликованы десятки работ, в которых изучена экспрессионная активность различных генов при действии диоксинов, формальдегида и ионизирующего излучения. В настоящей работе проведён мета-анализ литературных источников и составлен список из нескольких десятков генов, дифференциально экспрессирующихся при действии указанных факторов. На основании полученной информации возможна разработка биосенсоров, а также проведение мониторинговых исследований объектов животного мира с использованием методов РТ-ПЦР или РНК-чипов низкой плотности.

Over the past 10–15 years dozens of papers were published in which the patterns of genes expression under the impact of dioxins, formaldehyde and ionizing radiation were studied. In this paper a meta-analysis of the literature data were carried out and a list of dozens of genes differentially expressed under the influence of these factors were revealed. The obtained data may be used to develop biosensors, and to conduct monitoring studies by the RT-PCR or RNA-chip low density methods.

Ключевые слова: экспрессия генов, биосенсор, малые дозы, ионизирующие излучения, формальдегид, диоксины

Keywords: gene expression, biosensors, low doses, ionizing radiation, formaldehyde, dioxin

Введение

Организмы постоянно подвергаются хроническому воздействию малых доз неблагоприятных факторов. Одними из наиболее распространённых поллютантов в окружающей среде являются ионизирующие излучения, формальдегид и диоксины. Ионизирующие излучения в малых дозах вызывают вредные стохастические эффекты, зачастую приводящие к отдалённым последствиям (например, лейкозам). Формальдегид, в свою очередь, является одним из наиболее реакционноспособных поллютантов и имеет широкий спектр бытовых и промышленных источников загрязнения. При хроническом воздействии он нарушает функционирование многих физиологических систем. Диоксины являются наиболее сильными синтетическими ядами, эффективными в следовых концентрациях. Это стойкие органические загрязнители, накапливающиеся в почвах и воде, способные к биоаккумуля-

ляции. При этом известные в настоящее время способы выявления диоксинов дорогостоящие и не пригодны для мониторинговых исследований.

В то время как в диапазоне больших доз вредные эффекты (повреждения ДНК, белков, липидов) в тканях накапливаются в линейной зависимости от дозы, в области малых доз результирующий эффект зависит главным образом от эффективности защитных механизмов стресс-ответа, которые выражаются в активации экспрессии генов различных защитных систем клетки (антирадикальной защиты, репарации ДНК, детоксификации ксенобиотиков). За последние 10–15 лет опубликованы десятки работ, в которых изучена экспрессионная активность различных генов при действии диоксинов, формальдегида и ионизирующих излучений (рис. 1). Является ли спектр генов, изменяющих экспрессию, различным в зависимости от действующего фактора? В случае утвердительного ответа, определён-

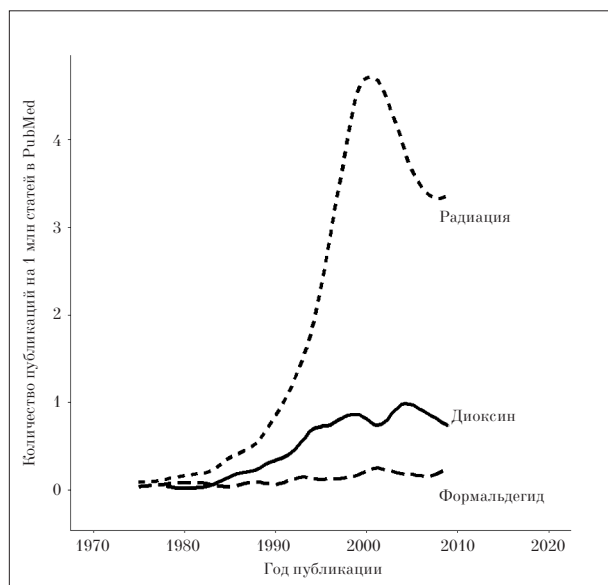


Рис. 1. Количество публикаций в реферативной базе данных PubMed, посвящённых изучению эффектов ионизирующих излучений, диоксинов и формальдегида на экспрессию генов

ные гены или группы генов могут выступать в качестве биосенсоров каждого из загрязнителей, и возникает возможность разработки относительно недорогих методов мониторинга данных видов загрязнений.

Цель настоящей работы заключается в выявлении, на основе анализа литературных источников, генов, воспроизводимо увеличивающих свою активность при действии ионизирующих излучений, формальдегида и диоксинов.

Биологическое действие ионизирующих излучений

Ионизирующие излучения (ИИ) в малых дозах (МД) оказывали воздействие на биоту Земли с момента её появления в результате влияния радиационного фона планеты и космического излучения. В последние десятилетия существенный вклад вносит антропогенное радиационное загрязнение в результате испытаний ядерного оружия, деятельности атомных электростанций, использования неорганических удобрений, содержащих радиоизотопы, в сельском хозяйстве. Даже очень МД повышают риск возникновения заболеваний человека и нарушений в компонентах экосистем. Особое значение имеют отдалённые последствия облучения – рак, изменение продолжительности жизни и эффекты в потомстве.

ИИ может вызывать как прямое повреждение макромолекул клетки при передаче энергии атомам (ионизации), так и опосредованно, через индукцию свободнорадикаль-

ных процессов. В результате происходит образование модифицированных оснований, одно- и двуниевых разрывов ДНК, перекрёстных сшивок ДНК-ДНК и ДНК-белок. Накопление окислительных модификаций ДНК и агрегатов белков приводит к увеличению частоты микроядер, хромосомных перестроек и транслокаций, дицентрических хромосом, преждевременной конденсации хромосом во время митоза и клеточной гибели.

Биологическое действие ИИ в области МД (до 50 сГр) имеет две характерные особенности – немишенный характер и нелинейность эффектов. Немишенный характер проявляется в возникновении радиационно-индуцированных эффектов в клетках (эффект свидетеля) и тканях (абскопальный эффект), напрямую не подвергавшихся облучению, и генетической нестабильности, которая способна сохраняться на протяжении нескольких клеточных делений или передаваться потомкам облучённых родителей и обуславливать отдалённые последствия генотоксического стресса [1]. По сравнению с линейной зависимостью «доза – эффект» эффект воздействия ИИ в диапазоне МД может отклоняться как в сторону увеличения негативных последствий (гиперрадиочувствительность), так и в сторону их уменьшения до величин, находящихся ниже контрольного уровня (радиационный гормезис). Кроме того, после облучения в МД у клеток и организмов может повышаться устойчивость к острому действию стрессоров радиационной и нерадиационной природы (радиоадаптивный ответ).

Реакция клетки и организма на действие ИИ в МД обусловлена стохастическими эффектами (возникновением мутаций, генетической нестабильностью, бласттрансформацией и т.д.) и детерминистическими эффектами (активный ответ живой системы на воздействие) [1]. Последние зависят от способности транскрипционного аппарата клетки быстро реагировать на воздействие и изменять паттерны генной экспрессии. В результате воздействия ИИ в МД часть генов увеличивает экспрессию, тогда как активность других генов снижается. При этом изменение транскрипционной активности может являться специфическим для определённого диапазона доз [2].

Поскольку ИИ является прежде всего генотоксическим воздействием, одними из первых изменяют экспрессию гены ответа на повреждение ДНК. Обнаружение повреждений ДНК и запуск каскада ответных реакций обеспечивают киназы ATR и ATM и транскрипци-

онные факторы p53, FOXO и NF-κB. Они регулируют контрольные точки клеточного цикла, репарацию ДНК и апоптоз, обеспечивая выживание клеток и поддержание стабильности генома [2–4]. При действии ИИ, начиная с 1 сГр, наблюдают повышение количества транскриптов самих этих белков [4]. МД ИИ индуцируют экспрессию генов детоксикации свободных радикалов [2].

Кроме того, ответные реакции клетки на МД ИИ опосредуются митоген-активируемыми протеинкиназами (МАРК), регулирующими апоптоз, выживание клеток и развитие организма. В частности, под воздействием γ-излучения в дозе 1–10 сГр усиливается экспрессия генов различных МАРК (*JIP2*, *MAPK3*, *MYC*, *MAX*, *MAPKAPK2*) и гена транскрипционного фактора *ATF1* в лимфообластах человека [4].

При радиационном воздействии в МД показана активация генов эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований (*GADD45α*, *XPC*, *PCNA*, *DDB2*) [5] и гомологичной рекомбинации (*RAD51L1*) [2]. Воздействие ИИ в дозах 2–60 сГр на клетки млекопитающих индуцирует экспрессию генов контроля клеточного цикла (*CDKN1A*, *Cyclin E*, *GADD45α*) и апоптоза (*BAX*) [2–4]. При действии МД ИИ также происходит активация гена *MDM2*, продукт которого по механизму обратной связи негативно регулирует функцию p53 [3].

ИИ в МД вызывает значительные изменения профилей экспрессии генов, вовлечённых в метаболизм белков и аминокислот, нуклеиновых кислот, липидов и жирных кислот, гормонов и других веществ [4]. Облучение лимфообластов человека в диапазоне доз 1–10 сГр изменяет активность генов ответа на стресс эндоплазматического ретикулума (*EIF2AK3*, *XBP1*, *HSPA5*), продукты которых участвуют в формировании вторичной и третичной структуры белков [4]. Кроме того, ИИ в МД индуцирует гены энергетического метаболизма, связанные с циклом трикарбоновых кислот, транспортом электронов и синтезом АТФ [4]. Таким образом, МД ИИ стимулируют процессы биосинтеза, которые необходимы для выживания клеток в условиях стресса, однако требуют больших энергетических затрат.

Изменяют свою экспрессию структурные гены, что связано с радиационно-индуцированными преобразованиями тканей и клеток организма. Например, в клетках лёгких мышей в ответ на ИИ в дозе 1 сГр активируются гены, регулирующие синтез и метаболизм коллагена (*Col1a1*, *Mmp-14*, *Mmp-15*) [6].

Большую долю среди генов, повышающих экспрессию при облучении в МД, имеют гены внутриклеточного и межклеточного транспорта катионов и анионов, кислорода, нуклеотидов, аминокислот, жирных кислот, глюкозы, а также регуляторных белков и гормонов [4].

В передаче сигналов при действии ИИ особую роль играют провоспалительные цитокины. В клетках периферической крови людей, облучённых в результате аварии на Чернобыльской АЭС в дозе 0,18–49 мГр, наблюдали повышенную экспрессию генов, кодирующих рецептор серин/треонин протеинкиназы, ростовой фактор TGF, белок EB13 и лиганд CD40, а также генов интерлейкинов 6, 8, 8R и TGFα [7]. При различных дозах ИИ также активируются гены факторов некроза опухоли (*Tnfaip8*, *Tnfrsf19*, *Tnfrsf21*) [8].

МД ИИ влияют на гены, связанные с развитием организма, клеточной дифференциацией и пролиферацией, иммунным ответом [8]. Например, облучение мышей в дозе 5 сГр повысило экспрессию генов общего иммунного ответа и селекции Т-клеток в тимусе [8].

Биологическое действие формальдегида

Формальдегид (Ф) представляет собой альдегид муравьиной кислоты с химической формулой HCHO. Различают эндогенные и экзогенные формы Ф. Эндогенный Ф образуется в процессе метаболизма аминокислот (серина, глицина, метионина, холина), при окислении метанола, перекисного окисления липидов. Образующийся в клетках эндогенный Ф постоянно подвергается детоксикации под действием ферментов формальдегидтранскетоллазы, формальдегиддегидрогеназы, формальдегиддисмутазы [9]. Экзогенный Ф встречается повсеместно в окружающей среде. Антропогенными источниками экзогенного Ф в атмосфере являются химические предприятия, использующие Ф и содержащие его материалы в своей деятельности, автотранспорт и стационарные топливосжигающие установки. В качестве антисептика Ф применяется в медицине, зоологических и анатомических музеях, научных учреждениях. Кроме того, источниками являются торфяные и городские пожары, свалки бытовых и промышленных отходов, табачный дым [9]. В быту человек подвергается действию Ф при эмиссии его из мебели, созданной с использованием МДФ и лакокрасочных материалов, и при вдыхании табачного дыма.

В газообразном виде Ф попадает в организм человека через контакт с кожей и слизистой глаз, а также ингаляционным путём. Длительное воздействие Ф приводит к различным заболеваниям верхних дыхательных путей, к некрозу печени и почек [10]. Ф оказывает токсические эффекты на центральную нервную систему, вызывает апоптоз клеток гиппокампа у человека [10]. Ф обладает иммунотоксическим действием, угнетает пролиферацию лимфоцитов человека, а также приводит к утрате хромосом [11]. Ф индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов IL-4, IFN-gamma, IL-13 в селезёнке и лимфатических узлах [12].

Токсическое действие Ф на клетки связывают с образованием активных форм кислорода и ковалентному связыванию с внутриклеточными белками и ДНК [10]. Ф может оказывать мутагенное и канцерогенное действие, повреждая ДНК и ингибируя репликацию и репарацию ДНК. Ф легко формирует сшивки между лизиним и дезоксигуанозином, может вызвать ДНК моноаддукты, ДНК-ДНК сшивки, ДНК-белковые сшивки. Ф вызывает денатурацию, агрегацию и полимеризацию белков, легко реагируя с тиоловыми и аминокетильными группами полипептидных молекул [10]. При вдыхании Ф наблюдается повышение активности hsp70, что является маркером стресса, вызванного денатурацией белков [13].

Эффекты формальдегида на клетки и организм опосредуются влиянием на экспрессию генов. У дрожжей более одной трети генов, меняющих свою экспрессию под действием Ф, относятся к категории генов, регулирующих синтез белка. Также существенно у данного организма меняют свою экспрессию гены, ответственные за обмен азота, серы и селена, регулирующие восстановление и защиту клетки, вирулентность [14].

Выявлено, что при воздействии формальдегида общая экспрессия мРНК снижается в эпителиальных клетках лёгких и в клетках некоторых типов опухолей [9].

Среди белков плазмы крови крыс вестерн-блот анализом в качестве маркеров воздействия Ф было идентифицировано тридцать два белка, из них 19 увеличивало своё присутствие. По своим функциям это белки, участвующие в апоптозе, транспорте, сигнализации, энергетическом метаболизме и поддержании клеточной структуры и подвижности. Среди них идентифицированы аполипопротеин Е, глутатион S трансфераза, субъединица 1 активаторного комплекса проте-

асомы, пролиферин инозитол монофосфатаза 1 и др. [15].

В назальном дыхательном эпителии крыс под воздействием Ф индуцировалась экспрессия 24 из 1185 исследованных генов. Идентифицированные гены с Ф-индуцированными изменениями в экспрессии относятся к следующим функциональным категориям: метаболизм ксенобиотиков, клеточный цикл, апоптоз и репарация ДНК [16]. В другой работе были проведены исследования повторных и острых воздействий формальдегида на клетки назального эпителия у крыс. Большая часть генов, менявших экспрессию, по своей функциональной роли связана с внеклеточными компонентами, цитоскелетом и плазматической мембраной: гены белков, образующих комплекс с микротрубочками, белки связывания с мембраной, формированием липидных кластеров, промежуточных филаментов, синапсом [17]. Исследовали изменения экспрессии генов в тканях лёгких у крыс, подверженных воздействию Ф. У двух генов уровень активности существенно увеличивался. Это гены *Kcnj12* (ген калиевого канала) и *Timm8a* (ген фермента транслоказы внутренней митохондриальной мембраны) [18].

Проводился анализ общей экспрессии генов в фибробластах трахеи человека линии Hs 680 Tg в ответ на воздействие формальдегида [19]. Было обнаружено 54 гена, изменивших свою активность в ответ на воздействие формальдегида. При этом повышенную экспрессию показали гены *BHLHB2*, *CCNL1*, *SE20-4*, *C8FW*, *PLK2* и *SGK*. Исследуемые гены задействованы в клеточных реакциях стресс-ответа: в воспалительных и иммунных реакциях и канцерогенезе. В таких же фибробластах трахеи в другой работе [20] было идентифицировано 27 различных формальдегид-индуцируемых генов, включая гены: кодирующие белок класса IA главного комплекса гистосовместимости, кальциктин, глутатион S-трансферазу, MDM2, рецептор тромбоцитарного фактора роста. Перечисленные гены связаны с процессами клеточной пролиферации и дифференцировки, иммунитета, воспаления и детоксификации.

Исследование влияния компонентов табачного дыма на экспрессию генов в клетках лёгких человека показало, что Ф индуцирует экспрессию трёх генов – *CYP7A1*, *HMOX1* и *PTGS1* [21]. В другой работе получены более обширные данные. Среди компонентов табачного дыма Ф дал сильнейший отклик в эпителиальных клетках альвеол лёгких челове-

ка: в общей сложности 66 генов были более чем в 1,5 раза дифференциально экспрессированы. Эти гены, главным образом, участвуют в апоптозе и связанных с повреждением ДНК процессах [22].

Нет сомнений в том, что Ф, являясь высоко реакционно-способным соединением, легко вступающим во взаимодействие с нуклеиновыми кислотами и белками, способен активно влиять на экспрессию генов. Он легко метаболизируется клеточными ферментами и представляет опасность для организма в том случае, когда его воздействия носит хронический характер. Проанализированные литературные данные показывают, что повышенные уровни экспрессии описанных выше генов, вероятно, связаны с токсичностью, индуцированной формальдегидом, и могут использоваться для оценки в качестве потенциальных биомаркеров для выявления интоксикации формальдегидом.

Биологическое действие диоксинов

Диоксинами называют обширную группу полициклических хлорорганических соединений. Наиболее распространённым и токсичным среди них является 2,3,7,8-тетрахлордибензопара-диоксин (ТХДД). В качестве естественных источников диоксинов могут выступать пожары или извержения вулканов. Однако основная масса диоксинов образуется в результате деятельности человека. Антропогенными источниками являются химические предприятия по производству хлорорганических пестицидов, хлора, хлорбензолов и полихлорированных бифенилов (используются в качестве технических жидкостей), растворителей ряда хлорзамещённых алканов, целлюлозно-бумажные производства, мусоросжигательные заводы и даже автомобильный транспорт. Диоксины попадают в воду в некотором количестве при её хлорировании. Диоксины относятся к персистентным органическим загрязнителям и на протяжении долгого времени сохраняются в депонирующих средах – почве и донных отложениях.

Диоксины – ксенобиотики, являющиеся крайне токсичными для живых существ. Накапливаясь в пищевых цепях, очень долго метаболизируются, поэтому их опасность, в первую очередь, связана с долгосрочным действием. Концентрация диоксинов увеличивается по мере следования по пищевой цепи. В тканях хищников они достигают наивысших концентраций. В организме животных диоксины

накапливаются прежде всего в жировой ткани и печени. Основной путь попадания – через желудочно-кишечный тракт с водой или пищей. Попав в организм, диоксины долгое время сохраняются в нём благодаря своей химической устойчивости. Период их полураспада в организме человека оценивается в 7–11 лет. Молекулярная структура диоксинов в организме является комплементарной некоторым рецепторам гормонов. Поэтому их основными мишенями служат регулирующие системы организма – эндокринная, иммунная, нервная. Диоксины обладают свойствами канцерогенности, эмбриотоксичности и тератогенности. Хроническое действие диоксинов может приводить к бесплодию и нарушениям функций сердечно-сосудистой системы [23].

Большинство токсических эффектов ТХДД связано с изменением уровня экспрессии генов, опосредованной арил-гидро-карбонным рецептором (AhR) [24]. После связывания лиганда AhR в составе комплекса перемещается в ядро. В качестве лиганда AhR могут выступать полициклические или галогенированные ароматические углеводороды (такие как бенз(а)пирен и ТХДД), а также некоторые компоненты потребляемых в пищу растений (индол-3-карбинол, 7,8-дигидрорутакарпин, дибензоилметаны, куркумин и некоторые каротиноиды) [25]. В отличие от большинства лигандов (такие как бенз(а)пирен и компоненты растений), ТХДД не метаболизируется (время полувыведения для человека составляет 7–10 лет) и активирует AhR-зависимый сигнальный путь на продолжительное время, что ведёт к долговременным физиологическим нарушениям [26].

Увеличение уровня транскрипции генов в ответ на воздействие ТХДД может происходить по нескольким механизмам:

1. Активация транскрипции комплексом AhR/Arnt. AhR/Arnt активирует транскрипцию, связываясь со специфическими последовательностями ДНК (DRE – dioxin response elements) в промоторных областях генов-мишеней [27]. Коровая консенсусная последовательность DRE содержит 5 нуклеотидов: 5'-GCGTG-3' [28]. По данному механизму активируются гены, кодирующие ферменты метаболизма ксенобиотиков фазы I (*Adh7*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *Por*) и II (*Nrf2*, *NQO1*, *GSTA2*, *UGT1A1*, *UGT1A6*), а также гены, участвующие в апоптозе (*Bax*), контроле клеточного цикла (*p21*, *p27*), дифференцировке (*Filaggrin*, *Hes-1*) и опухолеобразовании (*c-jun*, *junD*) [29, 30];

2. Активация транскрипции при взаимодействии AhR и NF-κB. AhR может образовывать комплексы с RelA и RelB субъединицами транскрипционного фактора NF-κB без участия Arnt [31, 32]. Комплекс AhR/RelA связывается с NF-κB-респонсивными элементами и активирует транскрипцию гена *c-myc*

[32]. AhR/RelA может связываться как с регуляторными элементами NF-κB, так и с консенсусной последовательностью DRE, что позволяет осуществлять совместную регуляцию транскрипции генов AhR и NF-κB сигнальных путей [33]. Комплекс AhR/RelB активирует транскрипцию генов контроля иммуни-

Таблица

Гены, активирующиеся в ответ на воздействие радиации, формальдегида и диоксинов*

| Функция | Ионизирующие излучения | Формальдегид | ТХДД |
|--------------------------------|---|---|--|
| Ответ на повреждение ДНК | <i>TRP53, BRCA1, PARP1</i> | <i>DDIT3, TRP53</i> | – |
| Репарация ДНК | <i>POLB, ERCC6, XPA, MLH1, RAD51, XRCC5</i> | – | – |
| Регуляция клеточного цикла | <i>GADD45A, CDKN1A, MAPK1, AREG, MOS, RAF1, AGGF1</i> | <i>CDKN1A, MDM2, MDM4, FOSL1, AREG, ARHGAP5</i> | <i>CDKN1A, CDKN1B, IGFBP1, AREG, HBEGF, BTG2</i> |
| Апоптоз | <i>BAX, CASP9, FAS, ING2, CD59A, TNF</i> | <i>TNFRSF12A</i> | <i>BAX, TNF</i> |
| Антиоксидантная защита | <i>GPX1, SOD1</i> | <i>PRDX1, TXN1, TXNRD1, SRXN1</i> | <i>GSTA2, NFE2L2</i> |
| Провоспалительная сигнализация | <i>LTBP1</i> | <i>IL4, IFNG, PVR, PLA2G4A</i> | <i>IL2, CCL2, CXCL1, CCL1, IL6, PTGS2, IL8, CRP, IL17RB, IL9, TNFSF13B, CXCL13, IRF3</i> |
| Стресс-ответ | <i>MAPK8</i> | <i>MAP3K8, MAP3K1</i> | <i>JUN, JUND, TIPARP, AHRR</i> |
| Дифференциация клеток | <i>GNB2L1, EGFR, EGR1, EGR3, ZEB2, SMGC</i> | <i>PTHLH, EGR2</i> | <i>FLG, HESX1, CEBPB, EGR1, CTGF, FOXQ1</i> |
| Внутриклеточный транспорт | <i>RAB6A, GJC1, ACTRIA</i> | <i>SEC22A</i> | <i>MICAL2, ARL6IP5, MYOF, SLC7A5, SCIN, FLNB</i> |
| Деградация белков | <i>EIF3E, KLK1B21, KLK1B4</i> | <i>SERPINA12</i> | <i>SPINT1, SERPINB2, MMP8</i> |
| Шаперонная активность | <i>CCT6A, HSPA1B, HSPA8</i> | <i>HSPA5, HSPB1</i> | – |
| Регуляция биосинтеза белков | <i>RPL24, RPS8</i> | <i>POLR2D, ATRX</i> | <i>GM5662</i> |
| Метаболизм | <i>OAZ1, ELOVL5, G6PC, ATP10D, ATP1B2</i> | <i>HMOX1, PLAUR, SLC25A15, GALNT7</i> | <i>GANC, NMT2, FST</i> |
| Циркадные ритмы | – | <i>PER2, ARNTL</i> | – |
| Поддержание стволовых клеток | – | <i>PUM1</i> | – |
| Детоксификация ксенобиотиков | – | – | <i>ADH7, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, UGT1A6A, NQO1, ALDH3A1, POR</i> |
| Функция неизвестна | – | – | <i>CLDN25, 4931440P22RIK</i> |

Примечание: представлены гены, выявленные в исследованиях на клетках млекопитающих (мыши, крысы, человек). Названия генов приведены в соответствие со стандартными названиями генов мыши. Перекрывающиеся гены выделены жирным шрифтом.

тета (*BAFF*), воспалительного процесса (*IL-8*, *CCL1*, *IFR3*) и хемокинов (*BLC*) [33, 34].

Таким образом, ТХДД ведёт к активации широкого спектра генов, что обуславливает многообразие диоксин-индуцируемых негативных биологических эффектов.

Обсуждение

На основании анализа литературных источников составлен список генов, активирующихся в ответ на воздействие радиации, формальдегида и диоксинов (табл.). Как показано на рисунке 2, лишь небольшая часть этих генов перекрывается, активируясь при разных воздействиях. Как при действии ионизирующих излучений, так и при воздействии формальдегида активируются гены *TRP53*, *CDKN1A*, *AREG*. И для радиации, и для диоксинов свойственна индукция генов *CDKN1A*, *BAX*, *AREG*, *EGR1*, *TNF*. Диоксины и формальдегид могут вызывать перекрёстно экспрессию генов *CDKN1A* и *AREG*. Общими для всех трёх воздействий из представленного списка являются лишь два гена – *CDKN1A* и *AREG*. Ген *CDKN1A* кодирует ингибитор циклин-зависимых киназ p21, останавливающий клеточный цикл при наличии повреждений клеточных структур, таких как ДНК. В результате остановки предотвращается удвоение ДНК или деление повреждённой клетки, в свою очередь клетка получает время, необходимое для устранения повреждений. *AREG* принадлежит к семейству эпидермального фактора роста и участвует в регуляции роста и пролиферации клеток.

По данным таблицы, ряд функциональных групп генов является более представленным при одних воздействиях и менее – при других. В частности, при действии ионизирующих излучений активируется большое количество генов ответа на повреждение ДНК и генов репарации ДНК. Воздействие диоксинов способствовало активации генов провоспалительного ответа и детоксификации ксенобiotиков. Формальдегид индуцировал гены регуляции биосинтеза белков и молекулярные шапероны.

С использованием ресурса g:Orth Orthology search (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gorth.cgi>) нами была проанализирована эволюционная консервативность генов, приведённых в таблице. Многие из генов, дифференциально экспрессирующихся в ответ на рассматриваемые воздействия, являются высоко консер-

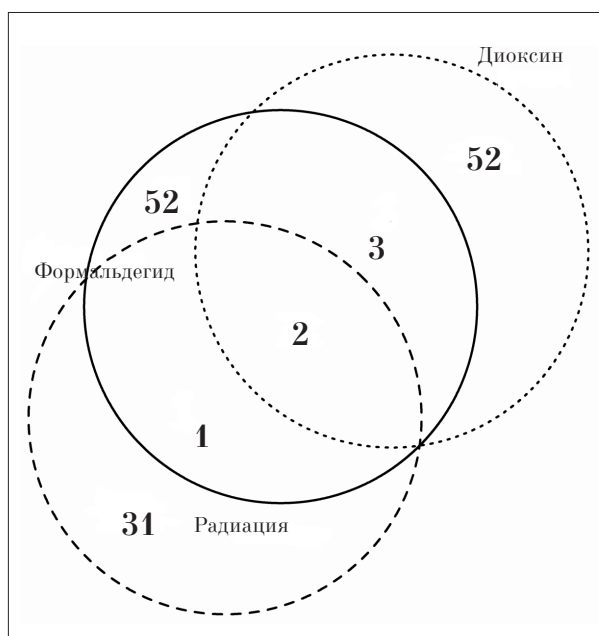


Рис. 2. Количество перекрывающихся генов, активируемых при разных воздействиях

вативными в эволюции. Например, в геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеют ортологи 18 из 48 генов, индуцируемых ионизирующими излучениями у млекопитающих, 28 ортологов генов – в геноме дрозофил. Из 34 формальдегид-индуцированных генов 10 имеют ортологов в геноме дрожжей, 13 – у дрозофил. Индуцируемые ТХДД 60 генов млекопитающих имеют 7 ортологов у дрожжей и 19 у дрозофил.

Таким образом, анализ литературных источников позволил составить списки из нескольких десятков генов, дифференциально экспрессирующихся при действии радиации, формальдегида и диоксинов. На основании данной информации с использованием методов РТ-ПЦР или РНК-чипов низкой плотности возможно осуществлять мониторинговые исследования объектов животного мира, испытывающих указанные воздействия. Используя имеющиеся данные, возможна разработка биосенсорных технологий. Например, на основе биолюминесценции белка GFP под промотором генов стресс-ответа компанией Gentrionix была разработана технология оценки генотоксичности GreenScreen HC [35].

Исследование поддержано грантом Федеральной программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» № 14.В37.21.0560.

Литература

1. Kadhim M., Salomaa S., Wright E., Hildebrandt G., Belyakov O.V., Prise K.M., Little M.P. Non-targeted effects of ionising radiation-Implications for low dose risk // *Mutat. Res.* 2013. V. 752. № 2. P. 84–98.
2. Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P., Junta C.M., Donadi E.A., Passos G.A., Sakamoto-Hojo E.T. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays // *Radiat. Res.* 2007. V. 168. № 6. P. 650–665.
3. Saini D., Shelke S., Mani Vannan A., Toprani S., Jain V., Das B., Seshadri M. Transcription profile of DNA damage response genes at G(0) lymphocytes exposed to gamma radiation // *Mol. Cell. Biochem.* 2012. V. 364. № 1–2. P. 271–281.
4. Wyrobek A.J., Manohar C.F., Krishnan V.V., Nelson D.O., Furtado M.R., Bhattacharya M.S., Marchetti F., Coleman M.A. Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation // *Mutat. Res.* 2011. V. 722. № 2. P. 119–130.
5. Manning G., Kabacik S., Finnon P., Bouffler S., Badie C. High and low dose responses of transcriptional biomarkers in *ex vivo* X-irradiated human blood // *Int. J. Radiat. Biol.* 2013. in press.
6. Tian J., Tian S., Gridley D.S. Comparison of acute proton, photon, and low-dose priming effects on genes associated with extracellular matrix and adhesion molecules in the lungs // *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013. V. 6. № 1. P. 4.
7. Albanese J., Martens K., Karanitsa L.V., Schreyer S.K., Dainiak N. Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology // *Exp. Hematol.* 2007. V. 35. № 4. Suppl 1. P. 47–54.
8. Rudqvist N., Parris T.Z., Schuler E., Helou K., Forssell-Aronsson E. Transcriptional response of BALB/c mouse thyroids following in vivo astatine-211 exposure reveals distinct gene expression profiles // *EJNMMI Res.* 2012. V. 2. № 1. P. 32.
9. Swenberg J.A., Moeller B.C., Lu K., Rager J.E., Fry R.C., Starr T.B. Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment // *Toxicol. Pathol.* 2013. V. 41. № 2. P. 181–189.
10. Kim K.H., Jahan S.A., Lee J.T. Exposure to formaldehyde and its potential human health hazards // *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews.* 2011. V. 29. № 4. P. 277–299.
11. Pongsavee M. *In vitro* study of lymphocyte anti-proliferation and cytogenetic effect by occupational formaldehyde exposure // *Toxicol. Ind. Health.* 2011. V. 27. № 8. P. 719–723.
12. Xu B., Aoyama K., Takeuchi M., Matsushita T., Takeuchi T. Expression of cytokine mRNAs in mice cutaneously exposed to formaldehyde // *Immunol. Lett.* 2002. V. 84. № 1. P. 49–55.
13. Ozen O.A., Akpolat N., Songur A., Kus I., Zararsiz I., Ozacmak V.H., Sarsilmaz M. Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study // *Toxicol. Ind. Health.* 2005. V. 21. № 10. P. 249–254.
14. Yasokawa D., Murata S., Iwahashi Y., Kitagawa E., Nakagawa R., Hashido T., Iwahashi H. Toxicity of methanol and formaldehyde towards *Saccharomyces cerevisiae* as assessed by DNA microarray analysis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 160. № 6. P. 1685–1698.
15. Im H., Oh E., Mun J., Khim J.Y., Lee E., Kang H.S., Kim E., Kim H., Won N.H., Kim Y.H., Jung W.W., Sul D. Evaluation of toxicological monitoring markers using proteomic analysis in rats exposed to formaldehyde // *Journal of proteome research.* 2006. V. 5. № 6. P. 1354–1366.
16. Hester S.D., Benavides G.B., Yoon L., Morgan K.T., Zou F., Barry W., Wolf D.C. Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium // *Toxicology.* 2003. V. 187. № 1. P. 13–24.
17. Andersen M.E., Clewell H.J., 3rd, Bermudez E., Willson G.A., Thomas R.S. Genomic signatures and dose-dependent transitions in nasal epithelial responses to inhaled formaldehyde in the rat // *Toxicol. Sci.* 2008. V. 105. № 2. P. 368–383.
18. Sul D., Kim H., Oh E., Phark S., Cho E., Choi S., Kang H.S., Kim E.M., Hwang K.W., Jung W.W. Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde // *Arch. Toxicol.* 2007. V. 81. № 8. P. 589–597.
19. Li G.Y., Lee H.Y., Shin H.S., Kim H.Y., Lim C.H., Lee B.H. Identification of gene markers for formaldehyde exposure in humans // *Environ. Health Perspect.* 2007. V. 115. № 10. P. 1460–1466.
20. Lee M.H., Kim Y.A., Na T.Y., Kim S.H., Shin Y.K., Lee B.H., Shin H.S., Lee M.O. Identification of formaldehyde-responsive genes by suppression subtractive hybridization // *Toxicology.* 2008. V. 243. № 1–2. P. 224–235.
21. Sexton K., Balharry D., BeruBe K.A. Genomic biomarkers of pulmonary exposure to tobacco smoke components // *Pharmacogenetics and genomics.* 2008. V. 18. № 10. P. 853–860.
22. Cheah N.P., Pennings J.L., Vermeulen J.P., van Schooten F.J., Opperhuizen A. In vitro effects of aldehydes present in tobacco smoke on gene expression in human lung alveolar epithelial cells // *Toxicol. In Vitro.* 2013. V. 27. № 3. P. 1072–1081.
23. Marinkovic N., Pasalic D., Ferencak G., Grskovic B., Stavljenic Rukavina A. Dioxins and human toxicity // *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 2010. V. 61. № 4. P. 445–453.

24. Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995. V. 35. P. 307–340.
25. Denison M.S., Nagy S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003. V. 43. P. 309–334.
26. Bock K.W., Köhle C. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions // *Biochem. Pharmacol.* 2006. V. 72. № 4. P. 393–404.
27. Sogawa K., Fujisawa-Sehara A., Yamane M., Fujii-Kuriyama Y. Location of regulatory elements responsible for drug induction in the rat cytochrome P-450c gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 21. P. 8044–8048.
28. Jones P.B., Durrin L.K., Galeazzi D.R., Whitlock J.P., Jr. Control of cytochrome P1-450 gene expression: analysis of a dioxin-responsive enhancer system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 9. P. 2802–2806.
29. Faust D., Vondráček J., Krčmář P., Smerdová L., Prochazkova J., Hrubá E., Hulinkova P., Kaina B., Dietrich C., Machala M. AhR-mediated changes in global gene expression in rat liver progenitor cells // *Arch. Toxicol.* 2013. V. 87. № 4. P. 681–698.
30. Le Vee M., Jouan E., Fardel O. Involvement of aryl hydrocarbon receptor in basal and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced expression of target genes in primary human hepatocytes // *Toxicol. In Vitro.* 2010. V. 24. № 6. P. 1775–1781.
31. Vogel C.F., Matsumura F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family // *Biochem. Pharmacol.* 2009. V. 77. № 4. P. 734–745.
32. Kim D.W., Gazourian L., Quadri S.A., Romieu-Mourez R., Sherr D.H., Sonenshein G.E. The RelA NF- B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the *c-myc* promoter in mammary cells // *Oncogene.* 2000. V. 19. № 48. P. 5498–5506.
33. Vogel C.F., Sciallo E., Matsumura F. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007. V. 363. № 3. P. 722–726.
34. Vogel C.F., Li W., Wu D., Miller J.K., Sweeney C., Lazennec G., Fujisawa Y., Matsumura F. Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF- B subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression // *Arch Biochem Biophys.* 2011. V. 512. № 1. P. 78–86.
35. Walmsley R.M., Tate M. The GADD45a-GFP GreenScreen HC assay // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 817. P. 231–250.