11. Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling / N. Borisov, E. Aksamitiene, A. Kiyatkin [et al.] // Mol. Syst. Biol. 2009. Vol. 5, article number 256.

12. Kuzmina N.B., Borisov N.M. Handling complex rule-based models of mitogenic cell signaling (On the example of ERK activation upon EGF stimulation) // Intl. Proc. Chem. Biol. Envir. Engng. 2011. Vol. 5. P. 76–82.

13. SABiosciences, a Qiagen company. URL: http://www.sabiosciences.com/pathwaycentral.php (data obrashhenija: 20.11.2013).

14. GEO Profiles, a National Center of Biotechnology Information database. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/ (data obrashhenija: 20.11.2013).

15. Cell line derived multi-gene predictor of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a validation study on US Oncology 02–103 clinical trial / K. Shen, Y. Qi, N. Song [et al.] // BMC Med. Genomics. 2012. Vol. 4, article number 51.

16. Seventeen-gene signature from enriched Her^2/Neu mammary tumor-initiating cells predicts clinical outcome for human HER2+ERα-breast cancer / J.C. Liu, V. Voisin, G.D. Bader [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 109. P. 5832–5837.

17. Van der Kogel A., Joiner M. Basic Clinical Radiobiology. Fourth edition. Oxford university press, 2009.

18. New specific molecular targets for radio-chemotherapy of rectal cancer / K. Snipstad, C.G. Fenton, J. Kjaeve [et al.] // Mol. Oncol. 2010. Vol. 4. P. 52–64.

УДК 577.2.043:539.1 Оригинальная статья

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА MMP И RHOA У ЛИЦ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ИОНИЗИРУЮЩЕМУ ИЗЛУЧЕНИЮ

В.Ф. Михайлов *— ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», заведующий лабораторией, кандидат биологических наук;* ***А.А. Шишкина*** *— ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», инженер;* ***Г.Д. Засухина*** *— Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова» Российской академии наук, главный научный сотрудник, профессор, доктор медицинских наук;* ***Л.В. Шуленина*** *— ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», научный сотрудник.*

MMP AND RHOA GENE EXPRESSION IN PERSONS EXPOSED TO IONIZING RADIAT ION

V.F. Mikhailov — *State Scientific Research Center n.a. A.I. Burnazyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Head of laboratory, Candidate of biological sciences;* ***A.A. Shishkina*** *— State Scientific Research Center n.a. A.I. Burnazyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, engineer;* ***G.D. Zasukhina*** *— Institute of Common Genetic n.a. N.I. Vavilov of RAS, leading scientist, doctor of medical sciences, professor;* ***L.V. Shulenina*** *— State Scientific Research Center n.a. A.I. Burnazyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Researcher.*

Дата поступления — 18.11.2013 г. Дата принятия в печать — 16.12.2013 г.

Михайлов В.Ф., Шишкина А.А., Засухина Г.Д., Шуленина Л.В. **Экспрессия генов семейства *MMP* и *RhoA* у лиц, подвергавшихся ионизирующему излучению // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 4. С. 780–783.**

Цель: изучение механизмов пострадиационного изменения экспрессии генов семейства *MMP,* а также *RhoA. Материал и методы*. Исследовали кровь 27 здоровых доноров, 32 больных раком предстательной железы до и после лучевой терапии, а также 32 пациентов, кровь которых была взята в отдаленный период после воздействия клинически значимых доз радиации. Методом ПЦР в реальном времени определяли уровни экспрессии генов *MMP*-7, -13, *TIMP*-2, *RhoA*. *Результаты.*Установлено, что наиболее выраженные изменения экспрессии изученных генов наблюдаются у больных раком предстательной железы в стадии 2 (T2N0M0). По-видимому, изменения обусловлены развитием опухолевого процесса и не связаны с лучевой терапией. У пациентов, перенесших лучевую болезнь, в отдаленный период экспрессия *RhoA* достоверно снижалась.

Ключевые слова*:* экспрессия генов, лучевая терапия, RhoA, MMP, TIMP-2, рак предстательной железы.

Mikhailov V.F., Zasukhina G.D., Shishkina A.A., Shulenina L.V. **MMP and RHOA gene expression in persoms exposed to ionizing radiation // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2013. Vol. 9, № 4. P. 780–783.**

The purpose of the study is to investigate the mechanisms of MMP-7, -13, TIMP-2 and RhoA genes expression in blood cells after ionizing radiation exposure. *Material and methods.*We had examined blood samples from 27 healthy donors, 32 prostate cancer patients before and after radiotherapy, and 32 Chernobyl liquidators by qRT-PCR method. *Result.* Our results suggests that the expression of MMP-7, MMP-13 genes in prostate cancer patients with grade 2 (T2N0M0). Probably, these changes were associated with the tumor process development, but no with radiation therapy. RhoA level in blood of liquidators was decreased.

Key words: gene expression, radiotherapy, RhoA, MMP, TIMP-2, prostate cancer.

Введение. После облучения формируются ранние (до 90 дней) и поздние поражения здоровых тканей, окружающих опухоль. Фиброз является распространенным осложнением лучевой терапии здоровых тканей. Он приводит к уменьшению эластичности органов, ограничению проникновения молекул через мембраны и вызывает стриктуры в полых органах [1]. В выживших клетках фиброз ткани проявляется чрезмерным накоплением коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс поддерживает физическое состояние тканей, обеспечивает межклеточное взаимодействие, диффузию сигнальных молекул. В связи с важностью матрикса для функционирования тканей в течение нескольких десятилетий интенсивно исследуются

Ответственный автор — Шишкина Алена Анатольевна
Адрес: 123182, г. Москва, ул. Живописная, д. 46.
Тел.: 8-499-190-94-57
E-mail: sagittarius1112@yandex.ru

клинические и патологические аспекты влияния радиации на фиброгенез. Ведутся поиски стратегий лучевой терапии, позволяющие снизить формирование отдаленных последствий радиотерапии и повысить ее эффективность для уничтожения злокачественных новообразований. Перепроизводство воспалительных цитокинов инициирует развитие фиброза. Блокирование TGFβ сигнализации и CTGF сигнализации, осуществляемой через Rho-каскад, снижает развитие фиброза в легких и кишечнике [2–4]. Изменение активности матриксных металлопротеиназ также влияет на TGFβ сигнализацию. Анализ экспрессии генов Rho-каскада и семейства MMP позволил авторам работы [5, 6] выявить различия между образцом кишечника с лучевым энтеритом и здоровым кишечником.

Исследование механизмов изменения функциональной активности этих генов в периферической крови позволит определить информационную значимость этих показателей для оценки риска развития осложнений после лучевой терапии.

Цель: определить содержание мРНК генов Rho пути и матричных металлопротеиназ и их ингибиторов в периферической крови больных раком предстательной железы, а также пациентов, перенесших лучевую болезнь, в отдаленный период после воздействия ионизирующей радиации.

Материал и методы. Объектом исследования является кровь человека: 27 здоровых доноров, 32 пациентов с раком предстательной железы до и после лучевой терапии, а также 32 пациентов, кровь у которых была взята в отдаленный период после воздействия клинически значимых доз ионизирующей радиации (ликвидаторы). Сведения о пациентах представлены в работе [7]. Тотальную РНК выделяли тризольным методом с использованием набора Trizol RNA Prep100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) в соответствии с протоколом фирмы производителя. Реакции обратной транскрипции для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием набора реактивов Gene Pak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген»), содержащего обратную транскриптазу M–MLV и случайные гексануклеотидные праймеры, согласно протоколу фирмы производителя. Полученные образцы кДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени. Для анализа уровня экспрессии генов MMP-7, -13, TIMP-2, RhoA применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием технологии Taq Man, набор реактивов для проведения ПЦР-РВМ-428–200 компании «Синтол», или в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I, применяя набор Maxima SYBR Green/ROXqPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США). Амплификацию исследуемых генов проводили на амплификаторе DT-prime (ЗАО НПФ «ДНК-технология», Россия) в объеме 25 мкл, содержащем готовую реакционную смесь для ПЦР, кДНК, а также специфические праймеры (НПФ «Литех», Россия) и зонды (ООО «ДНК-Синтез», Россия). Для MMP-7 использовали прямой праймер: CCATTTAGCAATTATGTCACCCTTTT и обратный: AATAAGACACAGTCACACCATAAAGGA, зонд: FAM-TTGCAGTTGGTTTTTGAATGTCTTTCACTCC-BHQ1, для TIMP-2: прямой: ATGCACATCACCCTCTGTGA и обратный: CTCTGTGACCCAGTCCATCC, для RhoA: прямой: CGCTTTTGGGTACATGGAGT и обратный: CAAGCAAGGGCACCCAGATT, для MMP-13: прямой: CCCTTCTTCACACAGACACTAACG и обратн ый:TAAACAGAATTCAAAGGCCACATC, зонд: FAM-ACCACTGCTCTTTTGTCTCCTGTCTTTAATG-BHQ1.

Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла сравнения (*Ct*) с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» b-actin в каждом образце. Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов использовали метод $\Delta\Delta Ct$. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistica 7.0, который включал в себя определение медианы и интерквартильного размаха. Для оценки значимости различий в группах применялись непараметрические критерии Манна — Уитни. Данные считали достоверными при $p<0.05$.

Результаты. Содержание РНК-генов обследованных пациентов представлено нами в относительных единицах по отношению к значениям медианы группы «доноры», принятой за 1. На рис. 1 показан уровень мРНК гена RhoA. Статистически значимое снижение показателя наблюдали у пациентов второй

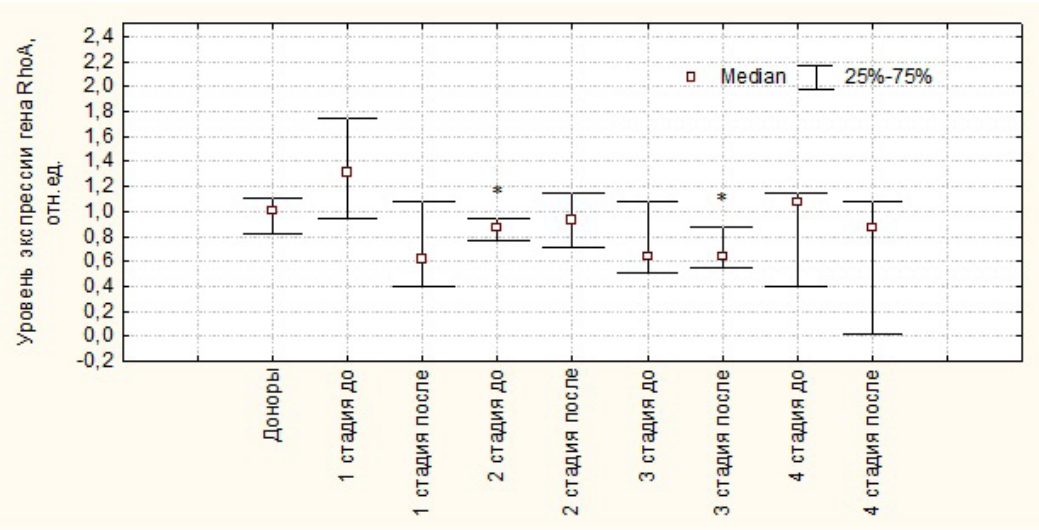

Рис. 1. Экспрессия гена RhoA в клетках периферической крови у больных раком предстательной железы до и после проведения курса лучевой терапии. *– достоверное различие (p<0,05) от контрольной группы («доноры») по критерию Манна–Уитни для двух независимых выборок

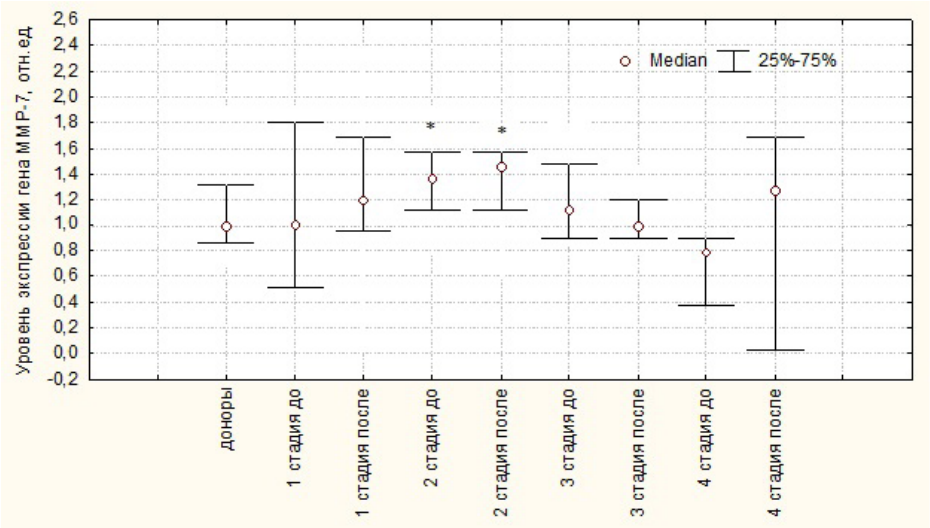

Рис. 2. Экспрессия гена ММР-7 в клетках периферической крови у больных раком предстательной железы до и после проведения лучевой терапии.* — достоверное различие (p<0,05) от контрольной группы («доноры») по критерию Манна–Уитни для двух независимых выборок

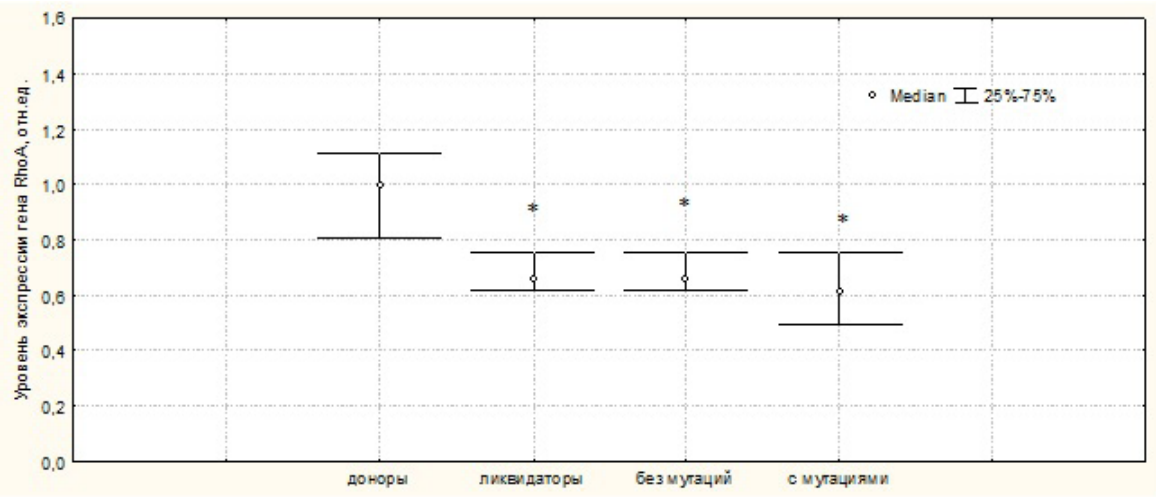

Рис. 3. Экспрессия гена RhoA в клетках периферической крови у ликвидаторов.
* — достоверное различие (p<0,05) от контрольной группы («доноры»)

стадии (T2N0M0) до проведения лучевой терапии и у больных 3-й стадии (T3N0M0).

Экспрессия гена RhoA в остальных группах обследованных больных не отличалась от содержания мРНК у доноров.

Результаты изучения мРНК гена ММР-7 представлены на рис. 2. Видно, что у пациентов 2-й стадии ((T2N0M0) содержание мРНК гена ММР-7 достоверно увеличивалось по сравнению с контрольным уровнем (группа «доноры»). Такая же закономерность выявлена и для генов ММР-13 и TIMP-2.

Исследование пациентов через десятки лет после воздействия ионизирующей радиации в клинически значимых дозах показало, что экспрессия RhoA была у них ниже, чем у доноров (рис. 3). Экспрессия гена TIMP-2 у пациентов этих групп не отличалась от величин, наблюдаемых у доноров.

Обсуждение. Проведенное исследование показывает, что у больных раком предстательной железы наиболее выраженные изменения экспрессии изученных генов характерны для стадии 2 (T2N0M0). Для генов ММР-7, ММР-13 и TIMP-2 увеличение экспрессии наблюдается как до, так и после лучевой терапии. Для RhoA снижение экспрессии у больных стадии T2N0M0 выявлено только до лучевой терапии. Таким образом, изменения обусловлены, по-видимому, развитием опухолевого процесса и не связаны с лучевой терапией. Обращает на себя внимание однонаправленный процесс увеличения содержания ММР и TIMP в крови у больных T2N0M0. Он свидетельствует о сохранении баланса активности генов ММР и их ингибиторов. У пациентов, перенесших лучевую болезнь, в отдаленный период экспрессия *RhoA* достоверно снижалась. Причем такое же изменение экспрессии *RhoA* наблюдали у лиц, имеющих точковые мутации в генах *P53* и *NRas* (группа «мутации») [7].

Заключение. Наиболее выраженная динамика пострадиационной экспрессии генов семейства *ММР,* а также *RhoA* наблюдается у больных раком предстательной железы в стадии 2 (T2N0M0). Это может быть обусловлено развитием опухолевого процесса

и не связано с лучевой терапией. У пациентов, перенесших лучевую болезнь, в отдаленном периоде экспрессия *RhoA* достоверно снижалась.

Библиографический список

1. Yarnold J., Brotjns M–C.V. Patogenetic mechanisms in radiation fibrosis // Radiotherapy Oncology. 2010. Vol. 97. P. 49–161.

2. Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation / M.S. Anscher, B. Thrasher, Z. Rabbani, B. Teicher // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2006. Vol. 65. P. 876–881.

3. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats / V. Haydont [et al.] // Clin. Cancer Res. 2007. Vol. 13. P. 5331–5340.

4. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice / H. Zheng, J. Wang, V.E. Koteliansky, P. J. Gotwals // Gastroenterology. 2000. Vol. 119. P. 1286–1296.

5. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis / C. Strup-Perrot, D. MatheLinard [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2004. Vol. 287, № 4. P. 875–885.

6. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization / M.C. Vozenin-Brotons, F. Milliat, C. Linard [et. al.] // Radiat. Res. 2004. Vol. 161, № 3. P. 299–311.

7. Михайлов В.Ф., Ушенкова Л.Н., Шагирова Ж.М., Шуленина Л.В. Исследование мутаций в онкогенах и генах-супрессорах опухолей как подход к изысканию способов индивидуального прогноза отдаленных последствий облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50, № 2. С. 128–133.

Translit

1. Yarnold J., Brotjns M–C.V. Patogenetic mechanisms in radiation fibrosis // Radiotherapy Oncology. 2010. Vol. 97. R. 49–161.

2. Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation / M.S. Anscher, V. Thrasher, Z. Rabbani, B. Teicher // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2006. Vol. 65. R. 876–881.

3. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats / V. Haydont [et al.] // Clin. Cancer Res. 2007. Vol. 13. R. 5331–5340.

4. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice / H. Zheng, J. Wang, V.E. Koteliansky, P. J. Gotwals // Gastroenterology. 2000. Vol. 119. P. 1286–1296.

5. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis / C. Strup-Perrot, D. MatheLinard [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2004. Vol. 287, № 4. P. 875–885.

6. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization / M.C. Vozenin-Brotons, F. Milliat, C. Linard [et. al.] // Radiat. Res. 2004. Vol. 161, № 3. P. 299–311.

7. Mihajlov B.F., Ushenkova L.N., Shagirova Zh.M., Shulenina L.V. Issledovanie mutacij v onkogenah i genah-supressorah opuholej kak podhod k izyskaniju sposobov individual'nogo prognoza otdalennyh posledstvij obluchenija // Radiacionnaja biologija. Radiojekologija. 2010. T. 50, № 2. S. 128–133.

УДК [57+61]::575.224.232:616–00 **О**бзор

ЧАСТОТА АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ В ЛИМФОЦИТАХ И РИСК РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР)

В.Ю. Нугис *— ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», заведующий лабораторией, доктор биологических наук;* ***М.Г. Козлова*** *— ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», научный сотрудник.*

CHROMOSOME ABERRATION FREQUENCY IN LYMPHOCYTES AND THE DEVELOPMENT RISK OF DISEASES (REVIEW)

V.Yu. Nugis *— State Scientific Research Center n.a. A.I. Burnazyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Head of laboratory, Doctor of biological sciences;* ***M.G. Kozlova*** *— State Scientific Research Center n.a. A.I. Burnazyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, research assistant.*

Дата поступления — 10.12.2013 г. Дата принятия в печать — 16.12.2013 г.

Нугис В.Ю., Козлова М.Г. **Частота аберраций хромосом в лимфоцитах и риск развития заболеваний (обзор) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 4. С. 783–787.**

Представлен анализ опубликованных данных по проблеме прогноза риска развития заболеваний по частотам аберраций хромосом в культурах лимфоцитов периферической крови человека. В последнее двадцатилетие появились данные, свидетельствующие о возможности такого прогноза в отношении злокачественных болезней, когда в целом цитогенетические показатели не превышают контрольные значения. Однако имеются существенные неопределенности и сложности, обусловленные межиндивидуальной и внутрииндивидуальной вариабельностью и различением аберраций хромосом, индуцированных внешне средовыми воздействиями и обусловленных внутренними процессами, происходящими в организме.

Ключевые слова: культура лимфоцитов периферической крови, аберрации хромосом, риск развития заболеваний, радиация.

Nugis V.Yu., Kozlova M.G. **Chromosome aberration frequency in lymphocytes and the development risk of diseases (review) // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2013. Vol. 9, № 4. P. 783–787.**

This article presents an analysis of the data published in connection with the problem of forecast of the development risk of diseases by chromosome aberration frequencies in cultures of human peripheral blood lymphocytes. In the last twenty years evidence of the possibility of such forecast for malignant disease was appeared when in the whole cytogenetic indices did not exceed control values. At the same time there are significant uncertainties due to interindividual and intraindividual variability. In addition there are significant difficulties of distinction of chromosome aberrations induced by environmental influences and caused by internal processes in the body.

Key words: peripheral blood lymphocyte culture, chromosome aberrations, risk of disease development, radiation.