

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NF- κ B
В ТКАНЯХ ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ И У СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ© 2019 г. А. Е. Бигильдеев^{1,*}, Ю. Ф. Чепурных¹, Н. А. Петинати¹, Н. И. Дризе¹¹ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: bigildeev.ae@gmail.com

Поступила в редакцию 07.02.2018 г.

Факторы транскрипции семейства NF- κ B сопрягают внешний сигнал от провоспалительных цитокинов и транскрипцию их генов-мишеней. Ранее было показано, что в периферической крови облученных молодых и интактных старых мышей поддерживается повышенный уровень интерлейкина-1 β , который представляет собой одновременно активатор и мишень сигнального пути NF- κ B. Мы предположили, что при индуцированном радиационном и естественном старении в различных тканях организма могут проходить схожие процессы, сопровождающиеся активацией NF- κ B. Для проверки этой гипотезы и установления особенностей индуцированного и естественного старения в работе на уровне транскрипции исследовали экспрессию генов семейства NF- κ B, его регуляторного комплекса ИКК и генов-мишеней NF- κ B в костном мозге, селезенке, тимусе, печени и мышцах облученных мышей через 3 мес. после экспозиции и в тех же тканях старых мышей. Из тканей выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию с последующей ПЦР в режиме реального времени. Показано, что в целом характер изменений экспрессии NF- κ B отличается у облученных и старых животных и, к тому же, зависит от типа ткани. Биохимические процессы, протекающие при естественном и ускоренном радиационном старении, затрагивают сигнальный путь NF- κ B, но детали его активации отличаются при этих состояниях. Однако были выявлены общие тенденции. В костном мозге общим для облучения и старения является снижение экспрессии гена *Nemo*, кодирующего субъединицу регуляторного ИКК-комплекса NF- κ B, а в тимусе – снижение экспрессии гена *Ikkb*, кодирующего другую субъединицу того же ИКК-комплекса, что указывает на важную роль этих генов в поддержании нормального функционирования кроветворной ткани. У старых мышей экспрессия гена, кодирующего ИЛ-1 β , была увеличена в тимусе, селезенке и печени. Продукция этими тканями ИЛ-1 β может вносить вклад в повышение его концентрации в периферической крови.

Ключевые слова: сублетальное облучение, факторы транскрипции семейства NF- κ B, интерлейкин-1 β , индуцированное радиацией и естественное старение

DOI: 10.1134/S0869803119060031

Семейство факторов транскрипции NF- κ B играет важную роль в индукции воспаления [1]. В клетках млекопитающих можно обнаружить пять различных представителей этого семейства: p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), p50/p105 (NF- κ B1) и p52/p100 (NF- κ B2). Они образуют друг с другом гомо- и гетеродимеры [2]. В неактивном состоянии они находятся в цитоплазме и связаны с ингибиторными белками семейства ИКВ, которые препятствуют перемещению NF- κ B в ядро (рис. 1).

Существуют классический и альтернативный пути активации NF- κ B. В классическом пути активация происходит при участии провоспалительных цитокинов, например, при связывании ИЛ-1 β с рецептором I-го типа (ИЛ-1R1). В результате последовательных фосфорилирований и убиквитинирований, происходит активация β -субъединицы киназного комплекса (ИКК β) фос-

форилирующего ИКВ по двум остаткам серина. Это приводит к последующему убиквитинированию ИКВ убиквитин лигазой SCF- β TrCP и далее к его протеасомному расщеплению. Расщепление ИКВ открывает сигнальную последовательность, что ведет к транслокации белков NF- κ B в ядро. Кристаллографический анализ показал, что субъединицы ИКВ комплекса связывают димеры p65/p50 или p65/cRel таким образом, что ИКВ закрывает сигнальную последовательность, расположенную на p65, необходимую для транслокации факторов транскрипции в ядро [1].

Альтернативный путь запускается цитокинами семейства фактора некроза опухолей (ФНО). При этом ИКК α активируется и фосфорилирует p100, связанный с RelB, которые существуют в виде гетеродимера, не связанного с ИКВ комплексом. Гетеродимер p100/RelB не может переме-

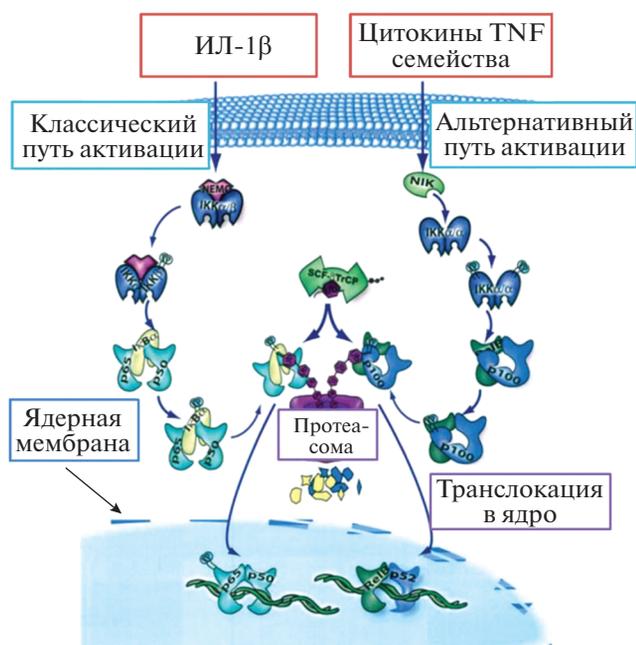


Рис. 1. Способы активации сигнального пути NF-κB.

Рисунок адаптирован из статьи Hayden et al. [1].

Fig. 1. Mechanisms of NF-κB signal pathway activation.

щаться в ядро, так как p100 закрывает сигнальную последовательность, расположенную на RelB. Далее p100 узнается и убиквитинируется убиквитин лигазой SCF-βTrCP и подвергается протеасомному процессингу или деградации. В результате процессинга часть p100 отщепляется, и образуется p52. В результате деградации p100 расщепляется, а с RelB связывается другой член семейства NF-κB. Таким образом, открывается сигнальная последовательность, расположенная на RelB, и факторы перемещаются в ядро, активируя транскрипцию своих генов-мишеней. Число генов-мишеней NF-κB велико, в их список входят члены ИЛ-1 семейства цитокинов, в том числе ИЛ-1β, циклооксигеназа 2, NF-κB1 [3], NF-κB2 [4], белки семейства ИКВ [5]. Таким образом, ген, кодирующий ИЛ-1β, представляет собой одновременно и ключевой активатор и мишень сигнального пути NF-κB.

Ранее было показано, что облучение мышей в высоких дозах приводит к пролонгированному повышенному содержанию ИЛ-1β в периферической крови облученных животных [6]. Обнаружено, что облучение индуцирует экспрессию ИЛ-1β в клетках костей, однако причины этой активации не были установлены. Последующие эксперименты выявили корреляцию между экспрессией ИЛ-1β и генов семейства NF-κB в стромальных клетках-предшественниках костного мозга [7]. В крови старых мышей также наблюдается стабильно повышенный уровень ИЛ-1β [6]. Мы предположили, что при старении и после облучения в высоких дозах в организме происходят

схожие процессы, связанные с активацией сигнального пути NF-κB в тканях, что проявляется в виде повышенной секреции ИЛ-1β в периферическую кровь. Эта гипотеза легла в основу данной работы. У молодых мышей через 3 мес. после облучения в сублетальной дозе (6 Гр) и у старых необлученных мышей измеряли относительный уровень экспрессии генов, кодирующих факторы транскрипции NF-κB (*Nfkb1*, *Nfkb2*, *Rel*, *Rela*, *Relb*) и их мишеней (*Il1b*, *Ikba*), а также генов, кодирующих регуляторный комплекс ИКК (*Ikkα*, *Ikkβ*, *Nemo*) в костном мозге, тимусе, селезенке, печени и мышцах. Референс контролем был уровень экспрессии указанных генов в соответствующих тканях необлученных молодых мышей той же линии. Обнаруженные изменения в экспрессии генов сравнивали у облученных и старых мышей, анализировали взаимосвязь экспрессии генов семейства NF-κB и ИЛ-1β.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Животные

В работе использовали мышей-самок гибридов линии (СВА×С57Black/J6)F₁ в возрасте от 5 мес. до 2 лет, полученных из питомника “Столбовая”. Животных содержали в пластиковых клетках с металлической сетчатой крышкой при 12-часовом световом дне, они получали еду и питье без ограничений. Эксперименты были одобрены комиссией по биомедицинской этике при Институте медико-биологических проблем РАН, протокол № 257.

Схема эксперимента

В эксперименте было три группы животных: молодые облученные ($n = 3$, возраст 5–8 мес.), молодые необлученные ($n = 3$, возраст 5–8 мес.) и старые необлученные животные ($n = 2$, возраст 27 мес.). Через 3 мес. из контрольных, облученных и старых животных выделяли кроветворные органы (костный мозг и селезенку), лимфоидные ткани (тимус и селезенка) и органы, не участвующие в кроветворении (печень и мышцы). Из указанных тканей выделяли тотальную РНК. Проводили обратную транскрипцию. Методом ПЦР в реальном времени исследовали относительный уровень экспрессии генов сигнального пути NF-κB, его регуляторного комплекса ИКК и генов-мишеней – *Ikba* и *Il1b*. Экспрессию генов интереса нормировали на наиболее стабильные гены “домашнего хозяйства”, подобранные индивидуально для каждой ткани (табл. 1).

Облучение

Мышей подвергали воздействию γ-излучения ⁶⁰Со на установке “Луч-1” (Россия) в дозе 6 Гр

при мощности дозы 417 мГр/мин, фокусное расстояние 100 см.

Выделение РНК

Для выделения РНК были использованы селезенка, печень, тимус, костный мозг и мышцы. Фрагменты тканей селезенки, печени и тимуса были измельчены в стеклянном ручном гомогенизаторе Поттера с 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Размер измельчавшихся фрагментов варьировал в зависимости от ткани, но в среднем составлял 0,125 см³ (для печени, селезенки, тимуса). Костный мозг вымывали 1 мл ФСБ в пробирку 1.5 мл из полостей двух бедер и двух голени и превращали в одноклеточную суспензию с помощью шприца с иглами 21G или 23G. Клеточные суспензии центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость сливали, ресуспендировали осадок в 1 мл ФСБ и центрифугировали повторно в тех же условиях. Супернатант сливали, осадок, содержащий клетки, лизировали 600 мкл денатурирующего раствора ДР (25 ммоль/л цитрат натрия (“Sigma”, США), 0.5% N-лаурил саркозин (“ICN Biomedicals”, США), 4 моль/л гуанидина изотиоцианат (“MP Biomedicals”, США), 0.1 моль/л меркаптоэтанол (“MP Biomedicals”, США)). Фрагменты мышц (примерно 0.250 см³) помещали в керамическую ступку, предварительно охлажденную жидким азотом. Добавляли небольшое количество жидкого азота и растирали фрагменты тканей в порошок пестиком, также предварительно охлажденным жидким азотом. В ступку по каплям добавляли 600 мкл раствора ДР, и перемешивали с порошком ткани. РНК выделяли по методу Хомчинского [8], с изменениями, как описано [7].

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Определение уровня экспрессии генов проводили методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (модификация TaqMan) на приборе ABI Prism 7500 (“Applied Biosystems”, США). Для построения первых цепей ДНК после гибридизации мРНК со смесью поли-Т праймеров и случайных гексамеров использовали обратную транскриптазу М-MLV (“Promega”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР проводили в следующих условиях: предварительный нагрев до 95°C в течение 10 мин, 40 циклов периодических изменений температуры 95°C – 15 с (плавление), 60°C – 45 с (гибридизация праймеров и элонгация). Детекцию флуоресценции проводили в конце каждого этапа элонгации. Последовательности использованных праймеров и зондов приведены в приложении. Данные, полученные в ходе ПЦР, обрабатывали при помощи модифицированного метода $\Delta\Delta C_t$ в

Таблица 1. Гены “домашнего хозяйства” для нормализации результатов экспрессии
Table 1. Housekeeping genes for normalization of expression data

Орган/Ткань	Гены, выбранные для нормализации результатов		
Костный мозг	<i>Tbp</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Sdha</i>
Тимус	<i>Tbp</i>	<i>Hmbs</i>	<i>Sdha</i>
Селезенка	<i>B2m</i>	<i>Ubs</i>	<i>Sdha</i>
Печень	<i>B2m</i>	<i>Rpl13a</i>	<i>Sdha</i>
Мышцы	<i>Tbp</i>	<i>Hmbs</i>	<i>Sdha</i>

программе Excel (“Microsoft”, США) [25]. Для каждой мышцы находили уровень экспрессии гена интереса по отношению к каждому из выбранных генов домашнего хозяйства, вычисляя значение $\Delta C_{t_i} = 2^{-(C_i^{GOI} - C_i^{HK_i})}$, где C_i^{GOI} – пороговый цикл гена интереса, $C_i^{HK_i}$ – пороговый цикл для i -го гена домашнего хозяйства. Пороговый цикл для каждого исследованного гена определяли в трех технических повторах. Из этих повторов вычисляли среднее арифметическое и использовали для дальнейших расчетов. Далее усредняли полученный относительный уровень экспрессии по всем мышам экспериментальной группы (контроль, облучение, старые животные). Находили изменение уровня экспрессии гена интереса в экспериментальной группе (облучение, старые животные) к контролю, вычисляя отношение. Таким способом получали значения для каждого i -го гена домашнего хозяйства. После этого вычисляли среднее арифметическое значение $\langle R_i \rangle$ по всем i генам домашнего хозяйства, находя нормализованное по нескольким генам домашнего хозяйства изменение относительного уровня экспрессии гена интереса в опытной группе по отношению к контрольной.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программах Statistica 6.0 (“StatSoft”, США) и Excel (“Microsoft”, США). Различия в экспрессии генов оценивали между группами с помощью критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследовали относительный уровень экспрессии генов, кодирующих факторы транскрипции NF- κ B, генов регуляторного комплекса IKK и генов-мишеней сигнального каскада NF- κ B – *IkBa* и *I κ B β* , – в различных тканях и органах облученных мышей и старых необлученных животных той же линии. Исследование было про-

ведено на уровне сравнения транскрипции указанных генов в опытных и соответствующих контрольных группах. Основные результаты исследования приведены на рис. 2.

В целом профили относительного уровня экспрессии исследуемых генов в облученных и старых мышцах существенно различаются, т.е. процессы, происходящие с участием сигнального пути NF-κB при индуцированном и естественном старении, не сходны в исследуемых тканях. В большинстве случаев изменение экспрессии происходило не более чем в 2–3 раза.

В костном мозге молодых мышшей через 3 мес. после облучения снижена экспрессия *Nfkb1*, и увеличена транскрипция *Nfkb2* (рис. 2, а). Экспрессия всех генов, кодирующих регуляторный комплекс ИКК, была снижена через 3 мес. после радиационного воздействия. В костном мозге старых мышшей наблюдали изменения в экспрессии других генов семейства NF-κB: уровень *Relb* был снижен, а *Rela* — повышен (рис. 2, б). У старых мышшей также наблюдали сниженный уровень *Nemo*, в то время как экспрессия двух других генов ИКК не отличалась от контроля. Вероятно, *Nemo* участвует в процессах как индуцированно, так и естественного старения в костном мозге.

В селезенке облученных мышшей из всех изученных генов NF-κB и ИКК была увеличена экспрессия только *Rela* (рис. 2, в). Одновременно с этим наблюдались изменения в уровне экспрессии генов-мишеней NF-κB: повышение экспрессии *Ikba* было статистически значимым, а для *Il1b* была отмечена тенденция к повышению. Это указывает на активацию классического сигнального пути NF-κB в селезенке облученных мышшей за счет *Rela*. У старых животных экспрессия всех исследованных генов сигнального пути NF-κB, за исключением *Ikka*, была снижена (рис. 2, г). Продукт *Ikka* задействован в альтернативном пути активации NF-κB. Не было обнаружено статистически значимых изменений в уровне представленности транскриптов гена-мишени NF-κB *Ikba*, а *Il1b* был повышен, но не существенно.

Экспрессия генов семейства NF-κB не отличалась от контроля в тимусе мышшей через 3 мес. после облучения. Исключение составлял *Nfkb1*, экспрессия которого была снижена (рис. 2, д). Транскрипционная активность генов ИКК-комплекса *Ikka* и *Ikkb* также уменьшалась. Уровень генов-мишеней не изменен. В тимусе старых мышшей детектировали повышенный уровень экспрессии генов *Rel* и *Relb* и сниженный уровень транскрипции *Ikkb* (рис. 2, е). Наиболее выраженным было увеличение экспрессии *Il1b* (более чем в 10 раз). Экспрессия *Ikba* была незначительно снижена.

В печени после облучения повышалась экспрессия всех изученных генов. Статистически значимые отличия от контроля наблюдались для

генов *Relb* и *Ikka* (рис. 2, ж), участвующих в альтернативном пути активации NF-κB, что указывает на превалирование этого пути над классическим. Повышение экспрессии *Relb* сопровождалось повышением экспрессии *Il1b* (рис. 2, з).

Несмотря на то что поперечно-полосатые мышцы не имеют отношения к регуляции иммунитета, в этой ткани обнаружена экспрессия практически всех генов семейства NF-κB и его регуляторного комплекса ИКК (исключение составлял только *Ikkb*, который не экспрессировался ни в одной из исследованных групп животных, что было отличительной особенностью именно этой ткани). Через 3 мес. после облучения, как и у старых животных, наблюдались выраженные изменения экспрессии генов NF-κB, ИКК и их мишеней — *Ikba* и *Il1b* (рис. 2, и, к). Характер этих изменений был во многом схож между экспериментальными группами. И у облученных, и у старых животных уровень экспрессии *Ikba*, *Relb* был повышен, а *Nfkb2* и *Il1b* — существенно снижен.

Обобщенные результаты по исследованию изменения уровня экспрессии генов семейства NF-κB и его регуляторного комплекса ИКК через 3 мес. после облучения приведены в табл. 2.

В табл. 3 представлены обобщенные результаты по изменению экспрессии генов NF-κB в тканях старых мышшей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия факторов транскрипции семейства NF-κB у облученных мышшей спустя 3 мес. после воздействия отличалась от таковых показателей у контрольных молодых животных во всех исследованных тканях. Аналогичные различия с молодым контролем наблюдались и у старых интактных мышшей. В большинстве случаев экспрессия генов изменялась не более чем в 2–3 раза. Обнаруженные отклонения стоит принимать во внимание, поскольку известно, что в случае факторов транскрипции даже небольшие флуктуации в уровне их экспрессии могут приводить к драматическим последствиям в клетках. Снижение концентрации факторов транскрипции в 2 раза, связанное с гаплонедостаточностью, в ряде случаев приводит к развитию тяжелых заболеваний [10].

В костном мозге снижение экспрессии *Nfkb1* и повышение *Nfkb2* после облучения указывают на пролонгированную активацию альтернативного сигнального пути NF-κB, так как эти гены не только кодируют факторы транскрипции NF-κB, но одновременно являются генами-мишенями NF-κB. Изменения в экспрессии *Rela* и *Relb* у старых мышшей свидетельствуют о доминировании классического пути активации NF-κB в костном мозге. Таким образом, механизмы радиационного и естественного старения в клетках костного

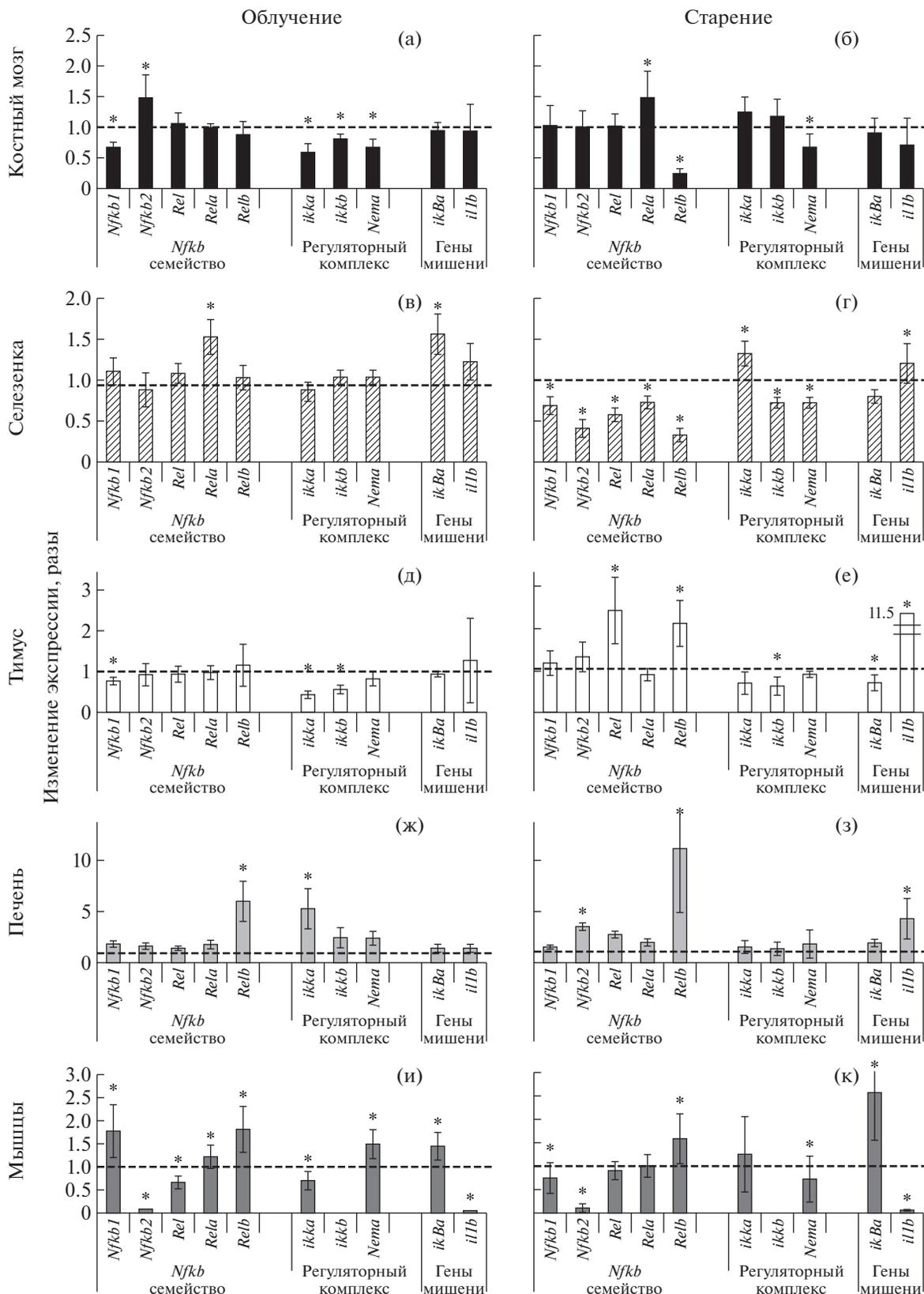


Рис. 2. Сравнение экспрессии генов в тканях облученных и старых животных. Представлены данные для костного мозга (а, б), селезенки (в, г), тимуса (д, е), печени (ж, з) и мышц (и, к) облученных и старых необлученных мышей той же линии. За 1 принят уровень экспрессии у молодых необлученных мышей (обозначен пунктирными линиями). Приведены средние значения и стандартные ошибки среднего. * Статистически значимые ($p < 0.05$) отличия от контроля согласно критерию Манна–Уитни.

Fig. 2. Comparison of gene expression level in tissues of irradiated and intact old animals.

Таблица 2. Сравнение отдаленных эффектов облучения в различных тканях
Table 2. Comparison of long-term effects of irradiation in different tissues

Путь активации	Ген/Ткань	Костный мозг	Тимус	Селезенка	Печень	Мышцы
Классический	<i>Nfkb1</i>	↓	↓	—	—	↑
	<i>Rel</i>	—	—	—	—	↓
	<i>Rela</i>	—	—	↑	—	↑
	<i>Ikkb</i>	↓	↓	—	—	—
Альтернативный	<i>Nfkb2</i>	↑	—	—	—	↓
	<i>Ikka</i>	↓	↓	—	↑	↓
	<i>Relb</i>	—	—	—	↑	↑
Оба пути	<i>Nemo</i>	↓	—	—	—	↑

Примечание. ↑ — уровень экспрессии статистически значимо повышен, ↓ — понижен, — отсутствовали статистически значимые изменения.

Таблица 3. Сравнение эффектов старения в различных тканях
Table 3. Comparison of ageing effects in different tissues

Путь активации	Ген/Ткань	Костный мозг	Тимус	Селезенка	Печень	Мышцы
Классический	<i>Nfkb1</i>	—	—	↓	↑	↓
	<i>Rel</i>	—	↑	↓	—	—
	<i>Rela</i>	↑	—	↓	—	—
	<i>Ikkb</i>	—	↓	↓	—	—
Альтернативный	<i>Nfkb2</i>	—	—	↓	—	↓
	<i>Relb</i>	↓	↑	↓	↑	↑
	<i>Ikka</i>	—	—	↑	—	—
Оба пути	<i>Nemo</i>	↓	—	↓	—	↓

Примечание. ↑ — уровень экспрессии статистически значимо повышен, ↓ — понижен, — отсутствовали статистически значимые изменения.

мозга различаются. Снижение уровня экспрессии *Nemo* в обеих группах говорит о наличии общих черт и о важности *Nemo* для регуляции пути NF-κB в костном мозге.

В селезенке облученных мышей одновременное увеличение экспрессии *Rela* и *IκBa* говорит об активации классического сигнального пути NF-κB. В отличие от облученных животных, у старых мышей изменена экспрессия всех исследованных генов (табл. 2 и 3). Возможно, это обусловлено тем, что при старении изменяется клеточный состав селезенки. Обнаруженное увеличение экспрессии *Ikka* одновременно с *I1b* связано с альтернативным сигнальным путем NF-κB.

В тимусе через длительное время после облучения не наблюдалось активации сигнального пути NF-κB. У старых животных выявленные изменения указывают на активацию обоих сигнальных путей NF-κB, сопровождающуюся существенным повышением уровня транскрипции *I1b*. Известно, что с возрастом происходит инволюция тимуса. В нем практически не остается Т-клеток и уменьшается количество стромаль-

ных клеток, поддерживающих лимфопоэз, которые заменяются жировыми клетками [11]. Возможно, наблюдаемые отклонения в сигнальном пути NF-κB связаны с изменением клеточного состава тимуса. Как после облучения, так и у старых мышей в этом органе снижена экспрессия *Ikkb*. Это может отражать важность *Ikkb* для регуляции пути NF-κB в данной ткани и указывать на возможные параллели в процессах индуцированного и естественного старения тимуса.

Изменения экспрессии исследованных генов в печени облученных мышей свидетельствуют о запуске альтернативного пути NF-κB. Известно, что этот путь активируется после связывания белков семейства фактора некроза опухолей (ФНО) с соответствующими рецепторами. Таким образом, можно предполагать роль белков ФНО в долгосрочных изменениях в печени после облучения. Однако статистически значимого увеличения экспрессии генов-мишеней NF-κB не было обнаружено, что указывает на пороговый характер реализации данного сигнального пути. Это подтверждается тем, что в печени старых мышей

выявлено более выраженное повышение экспрессии *Relb*, что сопровождалось возрастанием уровня транскрипции *I11b* (рис. 2, з), т.е. при старении уровень активации NF-κB превышает пороговый, и это влечет за собой повышение экспрессии генов-мишеней. Белок RELB – репрессор транскрипции генов-мишеней сигнального пути NF-κB в случае, если он функционирует в качестве мономера [2]. При образовании гетеродимеров с другими белками семейства NF-κB продукт *Relb* активирует гены-мишени. Так как в печени одновременно повышалась экспрессия *Relb* и *I11b*, то можно предполагать, что *Relb* функционировал в составе гетеродимера – активатора экспрессии генов-мишеней сигнального пути NF-κB, в частности *I11b*. Предположение о пороговом характере активации подтверждается также данными, полученными в костном мозге, где одновременно с увеличением экспрессии *Nfkb2* у облученных мышей и *Rela* у старых животных наблюдалось понижение экспрессии генов регуляторного комплекса ИКК, и не происходила активация экспрессии генов-мишеней NF-κB.

В печени после облучения и у старых животных задействован альтернативный путь активации. Таким образом, в отличие от всех других исследованных тканей процессы естественного и индуцированного старения в печени схожи.

В мышечной ткани облученных и старых мышей транскрипция большинства исследованных генов была изменена. Известно, что при старении сердечной мышцы, представляющей синцитий, происходит снижение уровня экспрессии всех генов семейства NF-κB [12]. В данном исследовании показано, что у старых мышей в ткани поперечно-полосатой мышцы повышалась экспрессия гена *Relb*, а транскрипция остальных генов была либо снижена, либо не изменена, что согласуется с результатами упомянутого исследования. Различия между облученными и старыми животными заключались в том, что экспрессия *Ikka* у первых уменьшалась, а у вторых – увеличивалась, а экспрессия *Nfkb1* и *Nemo*, наоборот, увеличивалась у облученных мышей и снижалась у старых. В мышцах при индуцированном и естественном старении затрагиваются оба пути активации факторов семейства NF-κB.

Из табл. 2 видно, что характер наблюдаемых изменений сильно зависел от ткани. Показано, что схожие изменения наблюдались в костном мозге и тимусе облученных животных, при этом в селезенке изменения практически отсутствовали. Наиболее частые изменения наблюдались в мышцах. У старых животных больше были выражены изменения в селезенке (табл. 3). Во всех исследованных тканях уровень экспрессии *Relb* был разнонаправленно изменен. Этот ген может быть за-

действован в процессах, происходящих при старении. Благодаря гибкой регуляции, связанной со способностью образовывать мономеры и гетеродимеры, данный белок при старении различных тканей изменяется по-разному. Необходимо отметить, что данное исследование проведено на уровне определения относительного количества мРНК генов сигнального пути NF-κB, а не на уровне белков и их посттрансляционных изменений. Тем временем для факторов транскрипции NF-κB фосфорилирование белков играет важную роль в их активации. В связи с этим применение методов, позволяющих проанализировать именно белки NF-κB и их фосфорилированные формы, даст более полную информацию об изменениях этого сигнального пути после облучения и при старении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе впервые проведено сравнение уровней транскрипции генов сигнального пути NF-κB у мышей, подвергшихся отдаленному (3 мес.) радиационному воздействию в сублетальных дозах, и у старых интактных животных. Исследованные ткани включали кроветворную и некроветворные, различающиеся по клеточному составу и по скорости самообновления. Во многих из них наблюдались изменения экспрессии NF-κB. Были выявлены общие тенденции: в костном мозге общим для облучения и старения является снижение экспрессии гена *Nemo*, кодирующего субъединицу регуляторного ИКК-комплекса NF-κB, а в тимусе – снижение экспрессии гена *Ikkb*, кодирующего другую субъединицу того же ИКК-комплекса. Вероятно, ИКК-комплекс играет важную роль для поддержания нормальной физиологической функции костного мозга и тимуса. Другие изменения в сигнальном пути NF-κB были разнонаправлены и зависели от типа ткани.

В работе оценивали экспрессию двух генов-мишеней сигнального пути NF-κB – *Ikbα* и *I11b*. Не установлено однозначной корреляции между экспрессией этих генов и NF-κB. Через 3 мес. после облучения не наблюдалось изменений экспрессии *I11b* в печени, селезенке, тимусе, костном мозге и мышцах. Известно, что в сыворотке крови облученных мышей и старых интактных мышей длительное время поддерживается повышенная концентрация ИЛ-1β [6]. Результаты этой работы позволяют заключить, что исследованные ткани не вносят вклад в наблюдаемый эффект у облученных мышей, и источник длительной секреции ИЛ-1β следует искать в других тканях. У старых мышей экспрессия *I11b* была увеличена в тимусе, селезенке и печени. Продукция ИЛ-1β этими тканями может участвовать в

повышении его концентрации в периферической крови. Связь экспрессии отдельных генов семейства NF- κ B и ИЛ-1 β остается неоднозначной и нуждается в дальнейшем исследовании. Показано, что биохимические процессы, протекающие при естественном и ускоренном радиационном старении, затрагивают сигнальный путь NF- κ B, но отличаются друг от друга в аспекте его активации.

Это подтверждается как различиями в экспрессии генов-мишеней, так и генов, кодирующих сами факторы NF- κ B. Следует подчеркнуть, что в связи с ограниченным размером выборки полученные результаты носят предварительный характер и могут быть уточнены в последующих экспериментах.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 4. Последовательности праймеров и зондов, использованные в работе
Table 4. Nucleotide sequences of primers and probes used in the study

Ген	Нуклеотидные последовательности	
<i>Il1b</i>	F	ATTCTCTTCAGCCAATCTTCA
	R	AAGGAGCACTTCATCTGTTTA
	зонд	FAM-AGAACAAGTCATCCTCATTGCCAC-RTQ1
<i>Ikba</i>	F	CAGTGTAGCAGTCTTGACGC
	R	AGCACCCAAAGTCACCAAGT
	зонд	FAM-CACACCCCAGCATCTCCACTCCGT-RTQ1
<i>Ikka</i>	F	ATCCAGATTATGAAGAAGTTG
	R	AATTTTCTGGTTTGTGAGCA
	зонд	FAM-CAATGTTGTAAAGGCCTGTGATGTTCC-RTQ1
<i>Ikkb</i>	F	TGAGGGGATGCAGAACTTG
	R	ATGAAGGTATCTAAGCGCAG
	зонд	FAM-CTTCCCGCAGACCACAGCAGTTCTCAAAC-RTQ1
<i>Nemo</i>	F	CGCTGCCTGGAGGAGAATC
	R	GGAACCTGCACATGAGGAAC
	зонд	FAM-CCAAGCCAGCCAGAGGGAGGAGAAG-RTQ1
<i>NFKB1</i>	F	GCAGAAGATGATCCATATTTG
	R	ATTTGAAGGTATGGGCCATC
	зонд	FAM-TTTCATTTGGATCCTTCTTTGACTCATACA-RTQ1
<i>NFKB2</i>	F	TCCAGCCCATCCATGACAG
	R	CTCATAGAACCGAACCTCAATG
	зонд	FAM-TGAAGATTTCTCGAATGGACAAGACAGC-RTQ1
<i>Rel</i>	F	GCTCTTCCTCCTGTTGTCTC
	R	CAAAACGAACTTCTATGTCATC
	зонд	FAM-ACCCAATTTATGACAACCGTGCTCCAA-RTQ1
<i>Rela</i>	F	TCCTTTCTCATCCCATCTTTG
	R	CTTTCTGCACCTTGTCACAC
	зонд	FAM-CAAGATCTGCCGAGTGAACCGAAAC-RTQ1

Таблица 4. Окончание

Ген	Нуклеотидные последовательности	
<i>Relb</i>	F	AGAGCAGCACCGAGGCCAG
	R	TCACCTCCACCTCCCGCAG
	зонд	FAM-CGGAGCTCGATGGCGGGCAGCGTCT-RTQ1
<i>Ikba</i>	F	CAGTGTAGCAGTCTTGACGC
	R	AGCACCCAAAGTCACCAAGT
	зонд	FAM-CACACCCCAGCATCTCCACTCCGT-RTQ1
<i>Ubc</i>	R	TCTGCTGTGTGAGGACTGC
	F	GATGGTCTTACCAGTTAAGG
	зонд	ROX-CACCACCGCTGACGATGCAGATCTTTGTGA-BHQ2
<i>Rpl13a</i>	R	TCTGGAGGAGGAACGGAAGGAAA
	F	TTGAGGACCTCTGTGAACTTG
	зонд	ROX-AAGATGCACTATCGGAAGAAGAAGCAGATC-BHQ2
<i>Gapdh</i>	R	CGTCCCGTAGACAAAATGGT
	F	ATGAGGGGGTTCGTTGATGG
	зонд	ROX-TCGGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG-BHQ2
<i>TBP</i>	R	GAGAATAAGAGAGCCACGGAC
	F	TTTTCTTGCTGCTAGTCTGGAT
	зонд	ROX-TTCTTCACTCTTGGCTCCTGTGC-BHQ2
<i>SDHA</i>	F	GAACACTGGAGGAAGCACAC
	R	CACAGTCAGCCTCATCAAG
	зонд	ROX-CTTTGGAGTACAGACCTGTTATCGAC-BHQ2
<i>Hmbs</i>	F	GTGTTGCACGATCCTGAAACT
	R	GTTGCCCATCTTTCATCACTGTA
	зонд	ROX-CTCCTTCCAGGTGCCTCAGAAAAGC-BHQ2

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Президента для молодых ученых – кандидатов наук МК-6016.2018.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hayden M.S., Ghosh S.* Signaling to NF- κ B // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 18. P. 2195–2224.
2. *Saccani S., Pantano S., and Natoli G.* Modulation of NF- κ B activity by exchange of dimers // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. № 6. P. 1563–1574.
3. *Ten R.M., Paya C.V., Israël N. et al.* The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF- κ B indicates that it participates in its own regulation // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 1. P. 195–203.
4. *Lombardi L., Ciana P., Cappellini C. et al.* Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 12. P. 2328–2336.
5. *Rupec R.A., Poujol D., Grosgeorge J. et al.* Structural analysis, expression, and chromosomal localization of the mouse *ikba* gene // *Immunogenetics.* 1999. V. 49. № 5. P. 395–403.
6. *Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Lubkova O.N. et al.* Interleukin-1 beta is an irradiation-induced stromal growth factor // *Cytokine.* 2013. V. 64. № 1. P. 131–137.
7. *Bigildeev A.E., Zezina E.A., Drize N.J.* The effects of interleukin-1 beta and gamma-quantum braking radia-

- tion on mesenchymal progenitor cells // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2017. V. 51. № 3. P. 393–403.
8. *Chomczynski P., Sacchi N.* The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 2. P. 581–585.
 9. *Schmittgen T.D., Livak K.J.* Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3. № 6. P. 1101–1108.
 10. *Seidman J.G., Seidman C.* Transcription factor haploinsufficiency: when half a loaf is not enough // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 109. № 4. P. 451–455.
 11. *Rezzani R., Nardo L., Favero G., et al.* Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview // *Age (Dordr)*. 2014. V. 36. № 1. P. 313–351.
 12. *Khatiwala R.V., Zhang S., Li X., et al.* Inhibition of p16INK4A to rejuvenate aging human cardiac progenitor cells via the upregulation of anti-oxidant and NFκB signal pathways // *Stem Cell Rev. Reports*. 2018. V. 14. № 4. P. 612–625.

Features of the Expression of NF-κB Pathway Genes in Tissues of Irradiated Mice and in Old Animals

A. E. Bigildeev^{a,#}, Yu. F. Chepurnykh^a, N. A. Petinati^a, and N. J. Drize^a

^a National Research Center for Hematology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

[#]E-mail: bigildeev.ae@gmail.com

The transcription factors of the NF-κB family match the external signal from pro-inflammatory cytokines and the transcription of their target genes. It was previously shown that in the peripheral blood of irradiated young and nonirradiated old mice, an increased level of interleukin-1β is maintained, which is simultaneously the activator and the target gene of the NF-κB signaling pathway. We suggested that during both induced by radiation and natural aging, similar processes can take place in various tissues of the body, accompanied by the activation of NF-κB. To test this hypothesis and establish the characteristics of induced and natural aging, we studied the expression of NF-κB family genes, its IKK regulatory complex and NF-κB target genes at the level of transcription in bone marrow, spleen, thymus, liver and muscles of irradiated mice three months after exposure and in the same tissues of old mice. RNA was extracted from the tissues, reverse transcription was performed followed by real-time PCR. It was shown that, in general, the pattern of changes in the expression of NF-κB differs in irradiated and old animals and, moreover, depends on the type of tissue. Biochemical processes occurring during natural and accelerated radiation-induced aging affect the NF-κB signaling pathway, but the details of its activation differ from each other under these conditions. However, general trends were identified. In the bone marrow, common for irradiation and aging is a reduction in the expression of the Nemo gene encoding the subunit of the regulatory IKK complex. In the thymus, common feature for these conditions was a decrease in *Ikkb* expression, which encodes another subunit of the same IKK complex. This indicates an important role of these genes in maintaining normal functioning of hematopoietic tissue. In older mice, expression of the gene encoding IL-1β was increased in the thymus, spleen, and liver. The production of IL-1β by these tissues may contribute to an increase in its concentration in peripheral blood.

Key words: sublethal irradiation, NF-κB transcription factors, interleukin-1β, induced by radiation and natural aging