

## АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TERC И SIRT2 В ТКАНЯХ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Воропаев Е.В., Зяцьков А.А., Осипкина О.В., Баранов О.Ю.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

*Цель работы* изучить особенности экспрессии генов TERC и SIRT2 в тканях с различной пролиферативной активностью, для последующей разработки набора маркеров для оценки степени сенесценции клеток и тканей.

*Пациенты с сердечно-сосудистой и онкологической патологией, а также группа здоровых. Для оценки биологического возраста использовался анализ экспрессии генов при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени.*

*В образцах тканей с различным календарным возрастом выявлены различия в уровне экспрессии: для локуса TERC, наблюдается общая тенденция к снижению степени транскрипционной активности с увеличением хронологического возраста, а для локуса SIRT 2 отмечается обратная зависимость, что позволяет использовать маркерные гены для оценки процессов клеточной сенесценции.*

**Ключевые слова:** экспрессия, пролиферация, гены, геронтология, онкология.

### Введение

Для тканей человека характерны различия не только по морфофизиологическим, функциональным признакам, но и по степени обновления клеток ткани, и как следствие - разной скорости сенесценции ткани. Медленное обновление тканей способствует старению организма и появлению различных заболеваний, приводит к снижению жизнеспособности и продолжительности жизни организма в целом. В случае активной пролиферации клеток, сопровождающейся неправильной дифференцировкой тканей, возникают онкологические образования, способствующие уменьшению продолжительности жизни индивида. Таким образом, корректное определение уровня пролиферации ткани позволит определять её биологический возраст и своевременно проводить профилактику старения, являющуюся непременным условием активного долголетия [2].

В результате хронологический возраст не способен выступить в качестве точного показателя процесса старения организма, в отличие от биологического возраста, имеющего выраженный генетический компонент (27-57%). Биологический возраст позволяет сравнивать функциональный статус одного индивидуума с другим того же хронологического возраста, что делает возможным сопоставление и получение данных о скорости сенесценции для органов и тканей. Вариация фенотипа биологического возраста во многом определяется аддитивными генетическими факторами и в меньшей степени – средовыми [3, 4].

К наиболее подходящим генам-кандидатам межиндивидуальных различий по биологическому возрасту тканей у человека относятся гены, которые детерминируют метаболизм липидов, гормонов роста, инсулина, ростовых факторов, регулирующие процессы воспаления, метилирования ДНК, эпигенетического сайленсинга (выключения) генов (в том числе генов ДНК-хеликаз и экзонуклеаз). Наряду с вышеперечисленными, изучают гены антиоксидантных ферментов (Sod1 и Sod2), гены стресс-ответа, аполипептопротеина А1, аполипептопротеина С3, аполипептопротеина А4, ингибитора активатора плазминогена типа I и SHC-трансформирующего белка, гены семейства сиртуинов [6] и факторы поддержания теломер [5].

Результаты анализа экспрессии последних двух генетических маркеров, полученные в настоящей работе с использованием доступного биологического материала, оказались, по нашему мнению, наиболее интересны для разработки лабораторных

критериев оценки биологического возраста тканей.

### Материалы и методы исследования

При помощи специализированных поисковых систем и анализа информации в сетевых базах данных были отобраны гены-кандидаты, вовлеченные в процессы клеточной сенесценции, для дальнейшего изучения их транскрипционной активности.

В качестве экспериментального материала были взяты образцы биоптатов желудка, кожи и сосудов. Исследование включало получение мРНК коммерческим набором GeneJET RNA Purification Kit («Thermo Scientific», США). Полученную мРНК переводили в более стабильную форму – кДНК, что позволяло хранить образцы и проводить исследования без существенной деградации нуклеиновых кислот, в течение длительного времени. Для выполнения обратной транскрипции проводили синтез кДНК с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Scientific», США). Уровень экспрессии определялся с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Использовался протокол ПЦР-РВ с применением интеркалирующих флуоресцентных агентов (SYBR Green). Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл составляли следующим образом: 2×ПЦР-буфер Maxima SYBR Green qPCR Master Mix («Thermo Scientific», США) – 12,5 мкл, праймер F (100 мМ р-р) – 0,1 мкл, праймер R (100 мМ р-р) – 0,1 мкл, образец кДНК (20 нг/мкл) – 1 мкл. Конечный объем доводился водой до 25 мкл. Программа амплификации для всех праймеров была следующей: 1 этап (1 цикл). Денатурация. t=10 мин, T=950C. 2 этап (40 циклов). Денатурация. t=15 сек., T = 95 0C. Отжиг. t=30 сек., T=600C. Элонгация. t=30 сек, T=720C. Регистрация сигнала. Структуры праймеров, использованных для оценки уровня экспрессии локуса TERC (детерминирует теломеразную РНК) и локуса SIRT2 (кодирует изоформы белка сиртуина) приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Структура праймеров

Название локуса	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
TERC	TERC – F	CGCCTTCCACCGTTCATCT	222
	TERC – R	CCTGAAAGGCGCTGAACCTCG	
SIRT 2	SIRT2-1 – F	GCGCGCTTCTTACCTAACTG	266
	SIRT2-1 – R	TCTCCAGAGGGTGAGAGGGG	
	SIRT2-2 – F	GAGCCAGACCGACTCAGATT	772
	SIRT2-2 – R	CTTGCTGATGAGGGAGGCCAA	
	SIRT2-3 – F	CATCCACCGCCTCTATGAC	500
	SIRT2-3 – R	CTGCAAGGAGGTACCCATGA	

### Результаты и обсуждение

Изучаемые образцы кДНК предварительно были проанализированы на присутствие транскриптов контрольных EST (expressed sequence tags)-маркеров. В качестве EST-локусов выступали “гены домашнего хозяйства”: B2M (Beta-2 microglobulin), ACTB (beta-actin), использованные далее также и в качестве нормализаторов при расчете уровня экспрессии [9]. Основными требованиями к выбору гена-нормализатора были: применимость к данному типу ткани (т.е. относительное постоянство уровня экспрессии вне зависимости от физиологического состояния ткани), сходное значение GC-состава с тестируемым геном (что определяет сходство кинетических параметров амплификации). Образцы с отсутствием амплификации или высоким значением  $Ct$  ( $>30$  цикла) EST-маркеров (т.е. с незначительным содержанием кДНК в пробе) были исключены из последующего анализа.

Обработку данных выполняли с помощью разработанного оригинального программного обеспечения на основании следующего алгоритма [4]:

- Среди анализируемых образцов выбирали контроль, экспрессию генов которого принимали за 1. Наиболее оптимальным вариантом в качестве контроля являлся образец, характеризующийся наиболее низким средним значением порогового цикла ( $Ct$ ) генов-нормализаторов. Следует отметить, что контроль присутствовал в качестве эталона при ПЦР-РВ анализе каждой партии, для возможности проведения сравнительного анализа разных партий образцов.

- Для всех образцов рассчитывали среднее арифметическое значение  $Ct$  генов-нормализаторов —  $Ct(h)$ . Для  $i$ -образца его обозначали как  $Ct(h)_i$ , контрольного образца —  $Ct(h)_n$ .

- Показатель отношения концентрации кДНК  $i$ -образца ( $N$ ) к контрольному образцу рассчитывали по формуле (1):

$$N = E_h \frac{Ct(h)_i - Ct(h)_n}{n} \quad (1)$$

где  $E_h$  — среднее арифметическое значение показателя эффективности амплификации генов-нормализаторов;  $Ct(h)_i$  — среднее арифметическое значение порогового цикла для  $i$ -образца;  $Ct(h)_n$  — среднее арифметическое значение порогового цикла для контрольного образца.

Для вычисления величин экспоненциальной амплификации и эффективности реакции использовали наклон ( $M$ ) реакции с помощью следующих формул (2 и 3):

$$\text{Экспоненциальная амплификация} = 10^{(-1/\text{наклон})} \quad (2)$$

$$\text{Эффективность реакции} = [10^{(-1/\text{наклон})}] - 1 \quad (3)$$

Наклон рассчитывали делением изменения величины  $Ct$  на изменение логарифма входных данных (например, количество копий).

При этом если показатель отношения концентрации кДНК  $i$ -образца к контрольному образцу  $N > 1$ , это говорит, что изначальная концентрация кДНК в  $i$ -образце в  $N-1$  раз меньше, чем в контрольном образце, и наоборот если  $N < 1$ , то изначальная концентрация кДНК в  $i$ -образце в  $N$  раз больше, чем в контроле.

- Показатель экспрессии изучаемого гена  $i$ -образца относительно контрольного образца рассчитывали по формуле (4):

$$S = (E_c^{(Ct(c)_i - Ct(c)_n)}) \times N \quad (4)$$

где  $E_c$  — показатель эффективности амплифика-

ции изучаемого гена,  $Ct(c)_i$  — значение показателя цикла уровня пороговой флюоресценции  $i$ -образца для изучаемого гена,  $Ct(c)_n$  — значение показателя цикла уровня пороговой флюоресценции контрольного образца для изучаемого гена,  $N$  — показатель отношения концентрации кДНК  $i$ -образца к контролю.

При этом если  $S > 1$ , то уровень экспрессии изучаемого гена  $i$ -образца в  $S$  раз больше по отношению к образцу-нормализатору, и наоборот, если  $S < 1$ , то уровень экспрессии изучаемого гена  $i$ -образца в  $S-1$  раз меньше, чем в образце-нормализаторе.

В ходе исследований были подобраны модельные объекты, имеющие единый генотип среди парных проб, характеризующихся разным уровнем пролиферации, а также организмы с разным генотипом и входящие в разные возрастные группы (таблица 2).

**Таблица 2.** — Характеристика модельных образцов для анализа локусов, ассоциированных с клеточным старением (фрагмент базы данных)

Образец	Уровень пролиферации	Возраст, лет	Диагноз
195н	Низкий	68	Рак желудка
196п	Высокий		
199н	Низкий	67	Рак желудка
200п	Высокий		
221н	Низкий	78	Рак желудка
222п	Высокий		

На первом этапе анализа уровня экспрессии гена TERC было проведено изучение транскрипционной активности в разных по физиологическому статусу (пролиферативной способности) тканей. При этом в качестве ткани с высокой степенью клеточного деления были взяты образцы опухолевой ткани (таблица 3).

**Таблица 3.** – Уровень экспрессии гена TERC в тканях с различным пролиферативным статусом (фрагмент базы данных)

Шифр образца	Возраст	Статус ткани	Относительный уровень экспрессии
221н	78	Норма	1.05
221п		Патология	21.26
199н	67	Норма	13.64
199п		Патология	24.08

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, ткани с высоким уровнем пролиферативной активности характеризуются более высоким уровнем экспрессии гена TERC, что согласуется с результатами исследований, полученными при изучении молекулярно-биологических особенностей опухолей [6]. Таким образом, исходя из тканеспецифических особенностей гена TERC, использование данного локуса для оценки степени сенесценции клеток и тканей возможно лишь при использовании образцов со сходным физиологическим статусом.

Для последующего исследования отбирались биоптаты без явных признаков патологий, взятых у пациентов с разным календарным возрастом. В ходе работы было выявлено отсутствие абсолютной направленности в изменении уровня экспрессии и возрастных особенностей (рисунок 1). Как видно из данных, приведенных на рисунке 1, для локуса TERC наблюдается общая тенденция к сни-

жению степени транскрипционной активности с увеличением хронологического возраста ткани. При этом отсутствие четкой закономерности показателя уровня экспрессии может быть связано с индивидуальными особенностями пациентов и, в частности, с пролиферативной активностью тканей (мест отбора проб), отражающих биологический возраст составляющих их клеточного комплекса.

В целом полученные данные согласуются с результатами исследований, представленными в литературных данных, и базируются на особенностях молекулярно-биологических механизмов клеточного деления эукариотических организмов [1-7].

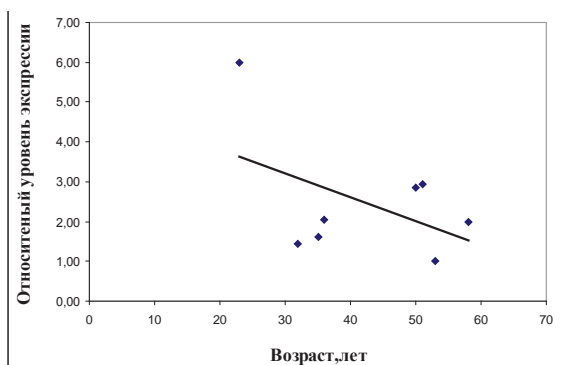


Рисунок 1. – Изучение распределения показателя уровня экспрессии гена TERC в зависимости от хронологического возраста исследуемых тканей

Различия между образцами по данному гену являлись достоверными, поскольку уровень активности данного локуса был высоким. Общепринятым стандартом значений порогового цикла флуоресценции (Ct) при количественной оценке ПЦР обычно является диапазон 15-30, рекомендованный для использования в большинстве сертифицированных протоколов и представленных на рынке коммерческих тест-системах [8].

Абсолютные значения Ct изучаемого локуса гена TERC для большинства образцов находились в пределах 21-25 циклов.

При анализе уровня экспрессии гена SIRT 2 использовали три его изоформы. Первоначально проводили изучение транскрипционной активности тканей, различающихся по физиологическому статусу (пролиферативной способности). При этом в качестве ткани с высокой степенью клеточного деления были взяты образцы опухолевой ткани (таблица 4).

Как видно из данных, приведенных в таблице 4, ткани с высоким уровнем пролиферативной активности характеризуются более низким уровнем экспрессии локуса SIRT 2, что согласуется с результатами других исследователей [6]. Таким образом, исходя из тканеспецифических особенностей локуса SIRT 2, использование данного локуса для оценки биологического возраста ткани возможно лишь при использовании образцов со сходным физиологическим статусом.

При исследовании образцов биоптатов желудка, кожи и сосудов без явных признаков патологии, взятых у пациентов с разным календарным возрастом, было выявлено отсутствие абсолютной направленности в изменении уровня экспрессии и возрастными особенностями тканей (рисунок 2). Как видно из данных, приведенных на рисунке 2, для гена SIRT 2 наблюдается общая тенденция к возрастанию сте-

Таблица 4 – Уровень экспрессии гена SIRT 2 в тканях с различным пролиферативным статусом (фрагмент базы данных)

Шифр образца	Возраст	Уровень пролиферации	Относительный уровень экспрессии	Изоформа локуса SIRT
195н	68	Низкий	252,48	SIRT 2-1
195п		Высокий	153,28	
199н	67	Низкий	174,85	
199п		Высокий	263,20	
195н	68	Низкий	80 684,28	SIRT 2-2
195п		Высокий	56 266,94	
199н	67	Низкий	139 509,13	
199п		Высокий	73 222,53	
195н	68	Низкий	9,78	SIRT 2-3
195п		Высокий	8,11	
199н	67	Низкий	14,52	
199п		Высокий	6,87	

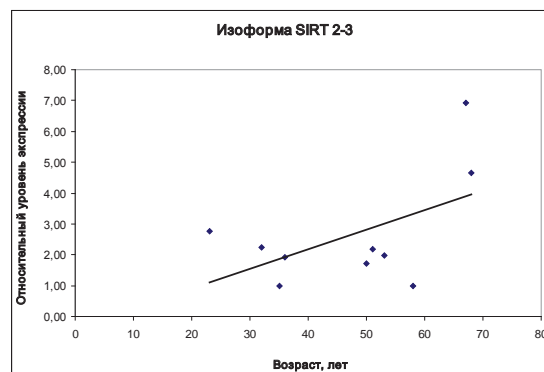
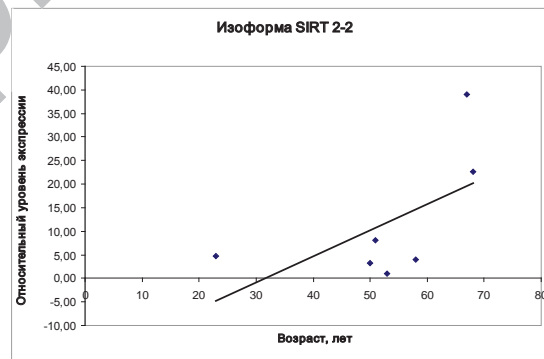
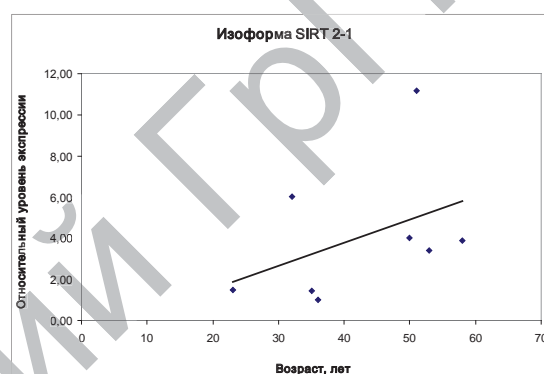


Рисунок 2. – Изучение распределения показателя уровня экспрессии изоформ гена SIRT 2 в зависимости от календарного возраста исследуемых тканей

пени транскрипционной активности с увеличением календарного возраста. При этом отсутствие четкой закономерности показателя уровня экспрессии может быть связано с индивидуальными особенностями пациентов, в частности, с пролиферативной активностью тканей (мест отбора проб), отражающих биологический возраст составляющего их клеточного комплекса.

Полученные данные в целом согласуются с результатами исследований, представленными в литературе, и базируются на особенностях молекулярно-биологических механизмов клеточного деления эукариотических организмов [6]. Различия между образцами по данному гену являлись достоверными, поскольку уровни активности изучаемого локуса для

большинства образцов находятся в пределах 17-30 циклов.

### Выводы

1. В образцах тканей с различным календарным возрастом выявлены отличия в уровне экспрессии: для локуса TERC наблюдается общая тенденция к снижению степени транскрипционной активности с увеличением хронологического возраста. Для локуса SIRT 2 увеличение календарного возраста связано с увеличением степени транскрипционной активности.

2. Полученные результаты будут использованы для оценки процессов клеточной сенесценции и разработки соответствующего диагностического набора на основе ПЦР-РВ.

### Литература

1. Баранов, В.С. Генетические аспекты старения / В. С. Баранов, Е.В. Баранова // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20, № 2. – С. 26–34.
2. Геномика старения и предиктивная медицина / В. С. Баранов [и др.] // Успехи геронтологии. – 2010. – Т. 23, № 3. – С. 329–338.
3. Кишкун, А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции / А.А. Кишкун. – Москва: ГЭОТАР – Медиа, 2008. – 976 с.
4. Методика молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний на основе анализа изменений экспрессии генов циклинов семейства A, B, C, D и E: инструкция по применению № 063-0610: утв. 16.07.2010 г. / Е. В. Воропаев [и др.] // Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний : сб. инструктив.-метод. док. – Минск, 2010. – Вып.: 11, Т. : 7. – С. 22–41.
5. Москалев, А.А. Старение и гены / А.А. Москалев. – СПб.: Наука, 2008. – 358 с.
6. Fabrizio, P. Conserved role of medium acidification in chronological senescence of yeast and mammalian cells / P. Fabrizio, M. Wei // Aging. – 2011. – Vol. 3, № 12. – P. 1127–1129.
7. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men / E.S. Epel [et al.] // Aging. – 2009. – Vol.1. – P. 81–88.
8. Saunders, N.A. Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications / N.A. Saunders, M.A Lee. – Horizon Scientific Press, 2013. – 302 p.
9. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines / Wisnieski F. [et al.] // World J Gastroenterol. – 2013. – Vol. 19, № 41. – P. 7121–7128.

### Literatura

1. Baranov, V.S. Geneticheskie aspekty starenija / V.S. Baranov, E.V. Baranova // Uspehi gerontologii. – 2007. – Т. 20, № 2. – С. 26–34.
2. Genomika starenija i prediktivnaja medicina / V. S. Baranov [i dr.] // Uspehi gerontologii. – 2010. – Т. 23, № 3. – С. 329–338.
3. Kishkun, A.A. Biologicheskij vozrast i starenie: vozmozhnosti opredelenija i puti korrekcii / A.A. Kishkun. – Moskva: GJeOTAR – Media, 2008. – 976 s.
4. Metodika molekularno-geneticheskoi diagnostiki onkologicheskikh zabozevanij na osnove analiza izmenenij jekspressii genov ciklinov semejstva A, B, C, D i E: instrukcija po primeneniju № 063-0610: utv. 16.07.2010 g. / E. V. Voropaev [i dr.] // Sovremennye metody diagnostiki, lechenija i profilaktiki zabozevanij : sb. instruktiv.-metod. dok. – Minsk, 2010. – Vyp.: 11, T. : 7. – S. 22–41.
5. Moskalev, A.A. Starenie i geny / A.A. Moskalev. – SPb.: Nauka, 2008. – 358 s.
6. Fabrizio, P. Conserved role of medium acidification in chronological senescence of yeast and mammalian cells / P. Fabrizio, M. Wei // Aging. – 2011. – Vol. 3, № 12. – P. 1127–1129.
7. Epel EThe rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men / E.S. Epel [et al.] // Aging. – 2009. – Vol.1. – P. 81–88.
8. Saunders, N.A. Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications / N.A. Saunders, M.A Lee. – Horizon Scientific Press, 2013. – 302 p.
9. Wisnieski FReference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines / Wisnieski F. [et al.] // World J Gastroenterol. – 2013. – Vol. 19, № 41. – P. 7121–7128.

## ANALYSIS OF TERC AND SIRT2 GENE EXPRESSION LEVEL IN TISSUES WITH DIFFERENT DEGREES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY

Voropaev E.V., Zjatskov A.A., Osipkina O.V., Baranov O.Y.

Educational Establishment «Gomel State Medical University», Gomel, Belarus

*Aim: to study the particular qualities of TERC and SIRT2 gene expression in tissues with different proliferative activity, for further development of set of markers in order to evaluate senescence degree of cells and tissues.*

*Patients with cardiovascular and oncological pathology, and a group of healthy people. The evaluation of biological age was made using real-time PCR gene expression analysis.*

*In tissue samples with different calendar age differences have been revealed in the level of expression: for TERC locus there is a general tendency to reduce the degree of transcriptional activity with the increase in chronological age, and for SIRT 2 locus there is an inverse relationship that allows to use marker genes for the evaluation of cellular senescence.*

**Key words:** expression, proliferation, genes, gerontology, oncology.

Адрес для корреспонденции: e-mail: cevoropaev@mail.ru

Поступила 15.06.2015