

УДК 547.963.3:616-0:577.7

А.Р. Джербашьян¹, Л.П. Симонян, С.А.Торосян, академик С.С. Оганесян**Апоптоз и деградация ДНК: теория отражения физиологического состояния организма в деградированности ДНК**

(Представлено 4/IV 2002)

Характерным признаком апоптоза, как известно, является межнуклеосомная фрагментация ДНК хроматина [1, 2]. Апоптоз необходим для поддержания гомеостаза организма. Гены, как индуцирующие, так и подавляющие апоптоз, интенсивно изучаются [3, 4]. В последнее время особое внимание уделяется апоптозу при старении [5].

В настоящей работе рассматривается апоптоз в лейкоцитах больных шизофренией, а также в мозге и тимоцитах крыс при старении. Обнаружен феномен непрерывной деградации ДНК хроматина в лейкоцитах больных шизофренией и в мозге и тимоцитах крыс при старении.

ДНК хроматина клеток тимоцитов фрагментируется по межнуклеосомным участкам; у старых животных апоптоз проявляется только при их *in vitro* инкубации. Предполагается, что степень сплошной деградированности ДНК хроматина отражает данное физиологическое состояние организма и предшествует процессу апоптоза.

В работе использовали 3-4-недельных (молодые) и 18-21-месячных (старые) крыс. Обработку и инкубацию тимоцитов проводили, как описано ранее [6]. Мозг (в основном из коры больших полушарий) гомогенизировали в 0.32 м сахарозе, 20 мм трис HCl pH 7.5, 3 мм MgCl₂, 100 мкМ ZnSO₄, 0.2 мм EGTA, 1 мм PMSF (фенилметансульфонилфлуорид), в гомогенизаторе Даунс. Центрифугировали 890хg 10мин при 4°C. Из осадка неочищенных ядер выделяли ДНК, как описано ранее [6]. Фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 1.5%-ной агарозе в системе трис. борат pH 8.0 [7].

Человеческие лейкоциты получали обработкой крови в четырех объемах раствора 0.75%-ного хлористого аммония, 10 мм Na-ЭДТА. Инкубировали 20 мин при 37°C и центрифугировали со скоростью 2000 об/мин на центрифуге К-23 10 мин. Осадок лейкоцитов промывали еще 2 раза в растворе хлористого аммония, Na-ЭДТА с последующей инкубацией.

Орган-специфическая непрерывная деградация ДНК хроматина при старении. ДНК, выделенная из ядер мозга старых крыс, значительно более деградирована (рис. 1, ряды 2-5, каждая проба выделена из отдельного животного) по сравнению с ДНК, выделенной у молодых крыс 3-4-недельного возраста (рис.1, ряд 1).

¹ А.Р. Джербашьян, автор корреспонденций

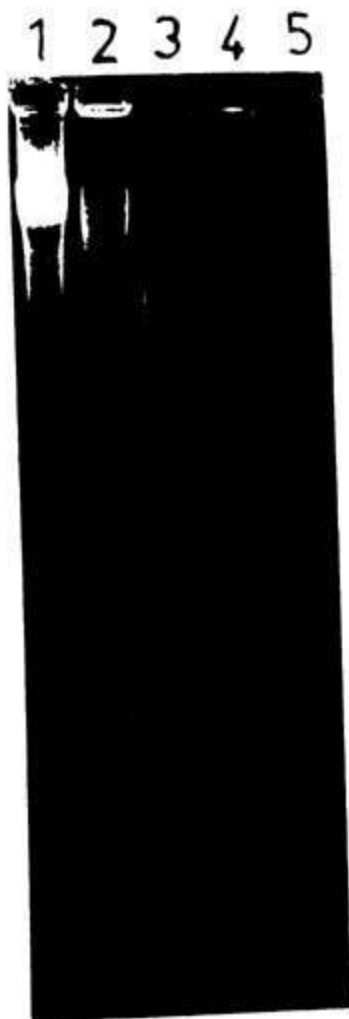


Рис. 1.

Рис. 1. Электрофорез ДНК в 1.5%-ной агарозе, выделенной из неочищенных ядер головного мозга молодых (1) и старых (2-5), крыс; каждая проба выделена из отдельного животного.



Рис. 2.

Рис. 2. Электрофорез ДНК в 1.5%-ной агарозе, выделенной из тимоцитов крыс: 1 - молодые животные, тимус без инкубации; 2, 3 - старые животные, тимус без инкубации; 4 - молодые животные, инкубация тимоцитов с 5 мкг/мл дексаметазон ацетатом; 5 - старые животные, инкубация тимоцитов без добавок.

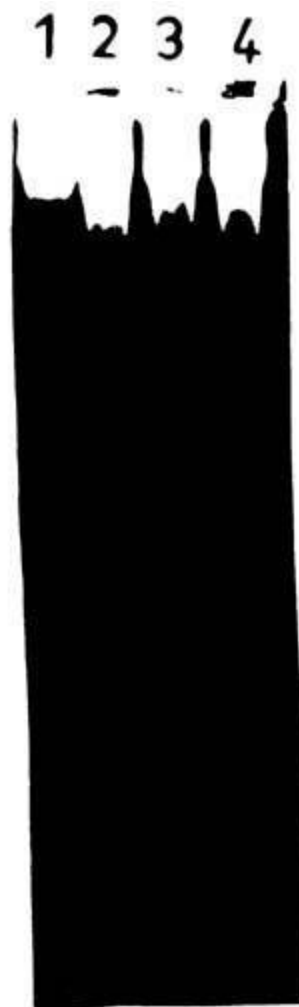


Рис. 3.

Рис. 3. Электрофорез ДНК в 1.5%-ной агарозе, выделенной из лейкоцитов донорской крови (1) и из лейкоцитов больных шизофренией (2-4); каждая проба выделена из лейкоцитов отдельного пациента.

ДНК, выделенная из тимоцитов старых крыс, более деградирована (рис. 2, ряды 2, 3), чем ДНК, выделенная из тимоцитов молодых животных (рис.2, ряд 1), в области молекулярных весов от 20 тыс. пар нуклеотидов (п.н.) до 0.2 тыс. п.н.

Эффект деградации ДНК при старении орган - специфичен, значительно сильнее

наблюдается в мозге, чем в тимоцитах (рис.1, 2).

Индукцирование апоптоза тимоцитов крыс при инкубации клеток *in vitro* в процессе старения. При инкубации клеток тимуса старых крыс в среде RPMI 1640 ДНК фрагментируется по межнуклеосомным участкам хроматина (рис.2, ряд 5). Инкубация клеток тимуса молодых крыс в среде RPMI 1640 вызывает очень слабый апоптоз, межнуклеосомную фрагментацию ДНК хроматина [6]. Апоптоз наблюдается при инкубации клеток с дексаметазонацетатом (рис. 2, ряд 4).

Непрерывная деградация ДНК хроматина лейкоцитов у больных шизофренией. В данном эксперименте выделяли ДНК из лейкоцитов донорской крови и крови больных шизофренией (12 человек), возраст которых не превышал 42 года. Больные принимали нейролептики и транквилизаторы. ДНК лейкоцитов больных шизофренией (рис.3, ряды 2-4, каждая проба выделена у отдельного пациента) отличается от ДНК из донорской крови заметной деградацией в области молекулярных весов от 20 до 0.2 тыс. п.н. Согласно литературным данным, содержание белков Bcl-2 уменьшается при шизофрении [8].

Наши исследования показали также, что ДНК лейкоцитов больных инфарктом деградирована сильнее, чем у больных шизофренией. Феномен деградации ДНК тканеспецифичен - при старении этот процесс в мозге выражен сильнее (рис.1), чем в тимусе (рис.2, ряды 2,3).

Интенсивность деградации ДНК выше в лейкоцитах при инфаркте миокарда, чем в лейкоцитах у больных шизофренией, т.е. деградация ДНК проявляется по-разному в разных патологиях и, следовательно, зависит от вида патологии.

Деградация ДНК проявляется *in vivo*, тогда как межнуклеосомная деградация ДНК, апоптоз, обнаруживается только при инкубации клеток *in vitro*.

Известно, что апоптоз при старении в разных органах и видах протекает по-разному [5]. Причем в индукцию апоптоза при старении могут вовлекаться разные гены. Так, в клетках миоцитов крыс при старении не меняется содержание белков P53, Bax и Bcl-2 [9], тогда как у Т-лимфоцитов человека при старении уменьшается содержание белков Bcl-2 [10].

Механизмы апоптоза при старении и болезни Паркинсона различны [11]. Апоптоз усиливается при нейродегенеративных болезнях Паркинсона и Альцгеймера [4].

Так как деградация ДНК орган-специфична и зависит от вида патологии, можно предположить, что феномен деградации ДНК и нуклеотидные последовательности деградированных фрагментов ДНК специфичны и отражают данное физиологическое состояние организма, предшествуя процессу апоптоза.

Изучение вышеуказанных деградированных фрагментов ДНК, определение и идентификация нуклеотидных последовательностей, регуляции экспрессии могут служить ключевым подходом в познании молекулярно-биологических процессов патологий (особенно неинфекционных заболеваний), а также старения мозга и психики на уровне ДНК. Предполагается, что эти фрагменты могут быть использованы в качестве зондов для диагностики, включая раннюю.

Используя феномен деградации ДНК, можно изучать молекулярно-биологические механизмы патологий, старения мозга и психики на уровне ДНК как причину данного состояния.

Психонейромолекулярно-биологические исследования могут также дать возможность

изучить связь между молекулярной биологией мозга и психикой человека на уровне ДНК.

Благодарности: данная работа была финансирована Д.А.Р. (Джербашьян А.Р.), Министерством образования и науки Республики Армения; гранты: 94-30, 00-253. Авторы благодарят С.Н. Симонян и Н.С. Аветисян за участие в некоторых экспериментах.

Институт тонкой органической химии НАН РА

Психиатрическая больница Нубарашена

Литература

1. *Захарян Р.А., Погосян Р.Г.* - ДАН Арм ССР. 1978. Т. 67. N2. С. 110-114.
2. *Willie A.N.* - Nature. 1980. V.284. P.555-556.
3. *Steller H.* - Science. 1995. V. 267. P.1456-1462.
4. *Коршунов О.А., Преображенская И.О.* - Неврологический журнал. 1998. N1. С. 40-46.
5. *Warner H.R.* - Curr.Top. Cell Regul. 1997. V. 35. P.107-121.
6. *Джербашьян А.Р., Захарян Р.А., Казарян П.А., Симонян С.Н., Карагезян К.Г.* - ДНАН Армении. 2000. Т. 100. N1. С. 60-63.
7. *Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж.* - Методы генетической инженерии. М. 1984. 477 с.
8. *Jarskog L.F., Gilmore J.H., Selinga E.S., Lieberman J.A.* - Biol. Psychiatry. 2002. V. 48. P.641-650.
9. *Nitahara J.A., Cheng W., Liu Y, Li B., Leri A., Li P., Mogul D., Gambert S.R., Kajstura J., Anversa P.* - J.Mol. Cell. Cardiol. 1998. V. 30. P. 519-535.
10. *Aggarwal S., Gupta S.* - J. Immunol. 1998. V. 160. P. 1627-1637.
11. *Anglade P., Vyas S., Hirsch E.C., Agid Y.* - Histol. Histopathol. 1997. V. 12. P. 603-610.

Ա.Ռ.Զրբաշյան, Լ.Փ.Միմոնյան, Ս.Ա.Թորոսյան, ակադեմիկոս Ս.Ս.Հովհաննեսյան

Ապոպտոզը և ԴՆԹ դեգրադացիան. օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական վիճակի արտապատկերման տեսությունը ԴՆԹ դեգրադացիայով

Հայտնաբերվել է ԴՆԹ-ի դեգրադացիայի երևույթը շիզոֆրենիայով հիվանդների լեյկոցիտներում և առնետների գլխուղեղում ու թիմուսում ծերության ժամանակ:

Միջնուկլեոսոմային ֆրագմենտացիան՝ ապոպտոզը, դիտարկվում է ծերության ժամանակ թիմոցիտներում, երբ բջիջները ինկուբացնում ենք *in vitro*:

ԴՆԹ դեգրադացիայի երևույթը օրգանսպեցիֆիկ է և արտահայտվում է տարբեր աստիճանով տարբեր պաթոլոգիաների ժամանակ:

Ենթադրվում է, որ ԴՆԹ դեգրադացիայի երևույթը և դեգրադացված ԴՆԹ ֆրագմենտների նուկլեոտիդային հաջորդականությունները սպեցիֆիկ ձևով արտապատկերում են օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական վիճակը:

Այս ԴՆԹ ֆրագմենտների նուկլեոտիդային հաջորդականությունների որոշումը, էքսպրեսիայի հետազոտությունները կարող են հանդիսանալ բանալի տվյալ պաթոլոգիայի, ծերության, ուղեղի, հոգեկանի մոլեկուլային կենսաբանական մեխանիզմների հետազոտությունների համար, ԴՆԹ մակարդակով, որպես պատճառ: Ենթադրվում է նաև, որ ԴՆԹ ֆրագմենտները կարելի է օգտագործել որպես զոնդ ախտորոշման և վաղ ախտորոշման նպատակներով՝ հիվանդությունների կանխարգելման համար: