



## EXPRESSION OF CIRCADIAN GENES PER2, BMAL1 AND CLOCK IN RAT LIVER, LUNG AND MYOCARD AS MARKER OF METHYL-TERTBUTYL ETHER ACTION ON ORGANISM

Minchenko O.H., Minchenko D.O., Yavorovsky O.P., Paustovsky Y.O., Zavgorodny I.V., Tsuchihara K., Esumi H.

## ЕКСПРЕСІЯ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ PER2, BMAL1 ТА CLOCK У ПЕЧІНЦІ, ЛЕГЕНЯХ ТА МІОКАРДІ ЩУРІВ ЯК ПОКАЗНИК ВПЛИВУ МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЕФІРУ НА ОРГАНІЗМ

**У**

**МІНЧЕНКО О.Г.,  
МІНЧЕНКО Д.О.,  
ЯВОРОВСЬКИЙ О.П.,  
ПАУСТОВСЬКИЙ Ю.О.,  
ЗАВГОРОДНІЙ І.В.,  
ТСУЧИГАРА К., ЕСУМІ Г.**

Інститут біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України,  
Національний медичний  
університет  
ім. О.О. Богомольця,  
м. Київ;  
Харківський національний  
медичний університет;  
Науково-дослідний інститут  
інноваційної онкології Східного  
госпіталю Національного  
онкологічного центру Японії,  
м. Кашива, Японія

УДК 577.112.7:616

більшості живих організмів виробилася здатність до автономних коливань у поведінці та перебігу фізіологічних та біохімічних процесів з періодом, близьким до 24 годин, які називають циркадальними ритмами і які генеруються у гіпоталамусі на молекулярному рівні циркадальним годинником [1-4]. Більшість основних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі має циклічний характер і контролюється низкою циркадальних генів (Per1, Per2, Per3, Clock та Bmal1), які кодують синтез важливих регуляторних та транскрипційних факторів [5-11]. Ці фактори є ключовими регуляторами метаболізму як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах. Циркадальні гени щоденно змінюють циркадальні ритми різних фізіологічних процесів. Більше того, на лімфоцитах крові виявлено існування різних хронотипів експресії циркадальних генів у людей [4]. Експресія циркадальних генів змінюється також циркадально. Встановлено, що порушення у регуляції експресії циркадальних генів мають місце при ряді захворювань і мо-

жуть бути причетними також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [12-20]. Останнім часом виявлено залежність експресії низки циркадальних генів від гіпоксії, що також значною мірою може сприяти прогресії більшості пухлин при порушеннях у функції цих генів [21]. Експресія більшості циркадальних генів та функція білкових факторів, що кодуються ними, контролюється протеїнкіназами, зокрема казеїнкіназою-1ε, яка також бере участь у регуляції низки інших надзвичайно важливих процесів [22-33]. Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1ε зв'язується з Per1, Per2 та Per3 і фосфорилує їх, що істотним чином змінює функціонування генів, які контролюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, Mdm-2, c-myc і Gadd45alpha) та онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин [16, 22, 23, 25, 29, 34]. Ця протеїнкіназа бере участь у дестабілізації β-катенін-деградуючого комплексу [30], у функціонуванні TGF-β сигнального каскаду [27], в інактивації білка bid через його розщеплення каспазою 8 [32], фосфорилує

**ЭКСПРЕССИЯ ЦИРКАДИАЛЬНЫХ ГЕНОВ PER2, BMAL1 И CLOCK В ПЕЧЕНИ, ЛЕГКИХ И МИОКАРДЕ КРЫС КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЭФИРА НА ОРГАНИЗМ**

**Минченко А.Г., Минченко Д.А., Яворовский А.П., Паустовский Ю.А., Завгородний И.В., Тсучигара К., Есуми Г.**

Нарушения регуляции и течения циркадиальных процессов в организме есть одной из причин возникновения ряда патологических процессов, в том числе и злокачественных новообразований. Наиболее важными генами, регулирующими протекание этих процессов в норме и при патологических состояниях, являются циркадиальные гены Per2, Bmal1 и Clock. Полученные нами данные показали, что

экспрессия этих генов значительно изменяется в печени, легких и миокарде крыс под влиянием метил-третбутилового эфира (МТБЭ), токсичного и экологически опасного химического соединения, что может привести к нарушению сигнальных каскадов в клетках и развитию патологических состояний, в том числе к возникновению злокачественных новообразований.

Результаты данной работы свидетельствуют о значительном влиянии МТБЭ на важные механизмы регуляции метаболических процессов в клетках на уровне экспрессии циркадиальных генов, в частности Per2, Bmal1 и Clock, что может служить важным чувствительным показателем вредного действия на организм химических веществ, загрязняющих окружающую среду.

© **Мінченко О.Г., Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Паустовський Ю.О., Завгородній І.В., Тсучігара К., Есумі Г. СТАТТЯ, 2010.**



**EXPRESSION OF CIRCADIAN GENES PER2, BMAL1 AND CLOCK IN RAT LIVER, LUNG AND MYOCARD AS MARKER OF METHYL-TERTBUTYL ETHER ACTION ON ORGANISM**

**Minchenko O.H., Minchenko D.O., Yavorovsky O.P., Paustovsky Y.O.,**

**Zavgorodny I.V., Tsuchihara K., Esumi H.**

*Disturbance the regulation of circadian processes leads to developing of different pathology and cancers in particular. The Per2, BMal1 and Clock are important regulators which control these processes in normal and pathological conditions.*

*We have shown that the methyl-tertbutyl ether (MTBE), toxic and ecologically dangerous chemical compound, significantly changed the expression of Per2, BMal1 and Clock genes in rat liver, lungs and myocard. Disturbance of these genes expression can destroy the cellular signal pathways and leads to developing of pathological processes. Results of our investigation clearly demonstrated that MTBE has significant effect on important regulatory mechanisms which control cell metabolism via circadian gene expression, in particular, Per2, BMal1 and Clock.*

P53, білок, що пригнічує ріст пухлин [33], негативно регулює фосфо-Akt через PTEN [26]. Крім того, для циркадальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку у механізмах регуляції, що надзвичайно важливо для точної і чіткої роботи циркадального годинника [24, 35-36].

Метил-третбутиловий ефір є екологічно небезпечною хімічною сполукою, що використовується для виробництва неетильованих бензинів, яка здатна накопичуватися у ґрунті, що, у свою чергу, призводить до забруднення цієї хімічною підземних джерел водопостачання і можливого отруєння людей [37]. Більше того, враховуючи інтенсивність використання бензинів з метил-третбутиловим ефіром та високу стабільність цієї хімічної сполуки, можна вважати її досить небезпечним глобальним забруднювачем довкілля [37].

**Метою** дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу екологічно небезпечної хімічної сполуки метил-третбутилового ефіру на живі організми. Для цього досліджували вплив метил-третбутилового ефіру на експресію у печінці, легенях та серцевому м'язі щурів генів Per2, BMal1 та Clock, які є важливими регуляторами багатьох основних метаболічних процесів в організмі, у тому числі циркадальних ритмів, порушення яких може призводити до розвитку різноманітних патологій, зокрема до виникнення злоякісних пухлин.

**Матеріали і методи досліджень.** Досліди провадили на щурах-самцях лінії Wistar, вагою 230-260 грамів. Метил-третбутиловий ефір (МТБЕ) вводили тваринам внутрішньовшунково у кількості 0,5; 5; 50 та 500 мг/кг маси тіла один раз

на день, п'ять разів на тиждень протягом двох місяців на фоні холодного стресу.

**Виділення РНК.** Тотальні РНК виділяли із печінки, легень та серця щурів за допомогою реагента Трізол (Trizol; Invitrogen, USA) згідно з протоколом виробника, як описано раніше [38]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75% етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

**Аналіз експресії мРНК Per2, BMal1 та Clock.** Експресію мРНК Per2, BMal1 та Clock досліджували методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР), а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Тотальну РНК з різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу кДНК за допомогою оліго(dT) праймера та SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) згідно з протоколом виробника. Для ампліфікації кДНК Per2, BMal1 та Clock використовували HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина) та специфічні для цих генів щурів пари праймерів. Для ампліфікації кДНК Per2 використовували такі праймери: прямий — 5'-CTGGGAAGATCCTGTACATC-3' та зворотний 5'-GCTGGTAGCGAATCTCATTC-3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 700-719 та 960-941 відповідно у мРНК Per2 щура (GenBank номер NM\_031678). Для ампліфікації кДНК BMal1 були використані прямий (5'-TGACCCCTCATGGAAGGTTAG-3') та зворотний (5'-AATC-CATCTGCTGCCCTGAG-3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 753-772 та 1042-1061 у послідовності мРНК BMal1 щура (GenBank но-

мер NM\_024362). Для ампліфікації кДНК Clock були використані прямий (5'-TGCACAGTCAGATGCTAGTG-3') та зворотний (5'-TGATCCACAAGATCAGATGG-3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264-283 та 455-436 у послідовності мРНК Clock щура (GenBank номер NM\_021856). Ці пари праймерів були використані для ампліфікації Per2, BMal1 та Clock як у ЗТ-ПЛР, так і у ПЛР у реальному часі. Для контролю кількості РНК, що аналізували, досліджували експресію мРНК β-актину. Експресія кожної смуги кДНК Per2, BMal1 та Clock порівнювалася з експресією мРНК β-актину.

Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом у 2% агарозному гелі, забарвлюючи кДНК бромистим етидієм. Гелі аналізували у системі Quantity One BioRad System (США).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Порушення регуляції та перебігу циркадальних процесів в організмі є однією з причин виникнення низки патологічних процесів, у тому числі і злоякісних новоутворень. У зв'язку з тим, що важливими регуляторами цих процесів у нормі та при патологічних станах є транскрипційні фактори, продукти циркадальних генів, ми досліджували експресію мРНК Per2, BMal1 та Clock, найважливіших циркадальних факторів, у печінці, легенях та серці щурів у нормі та за тривалої дії на тварин метил-третбутилового ефіру (МТБЕ) в умовах холодного стресу методами зворотної транскрипції мРНК та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Одержані нами дані показані на рисунках 1 та 2. Базальний рівень експресії мРНК Per2 коливається у різних органах щурів і є найвищим у легенях, значно мен-

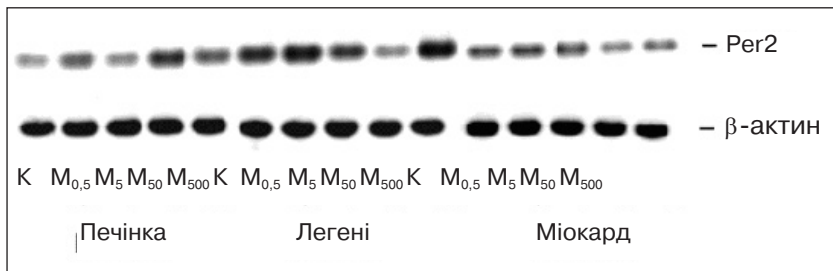
шим — у міокарді, ще меншим — у печінці. Встановлено, що експресія гену *Per2* суттєво змінюється у клітинах цих надзвичайно важливих органів щурів під впливом метил-третбутилового ефіру (МТБЕ), що може призводити до порушення сигнальних каскадів у клітинах та розвитку патологічних станів. Аналіз рівня мРНК *Per2* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі чітко продемонстрував суттєве посилення її експресії у печінці, але чітко виявлялася залежність ефекту МТБЕ від його до-

зи. Максимальна дія МТБЕ за внутрішньошлункового введення його тваринам спостерігалася у дозі 50 мг/кг маси тіла і знижувалася при застосуванні значно меншої (0,5 мг/кг) та значно більшої доз (500 мг/кг) МТБЕ (рис. 2). Водночас під впливом тривалої дії МТБЕ інтенсивність експресії мРНК *Per2* у легенях та міокарді значно знижувалася, причому і у легенях, і у міокарді максимальний ефект МТБЕ спостерігався за його введення тваринам у дозі 50 мг/кг маси тіла, хоча його дія була більш вираженою у

легенях щурів (рис. 2). Проте під впливом тривалої дії меншої дози МТБЕ (5 мг/кг) зниження експресії мРНК *Per2* спостерігалася лише у легенях. Значно більша доза МТБЕ (500 мг/кг) призводила до посилення експресії мРНК *Per2* у легенях, а у міокарді, навпаки, зниження, як і за меншої дози МТБЕ (50 мг/кг). Таким чином, МТБЕ значно змінює експресію гену *Per2* у легенях, печінці та міокарді щурів, причому вираженість та направленість дії цієї хімічної сполуки суттєво залежали від дози МТБЕ і проявлялися по-різному у різних органах тварин.

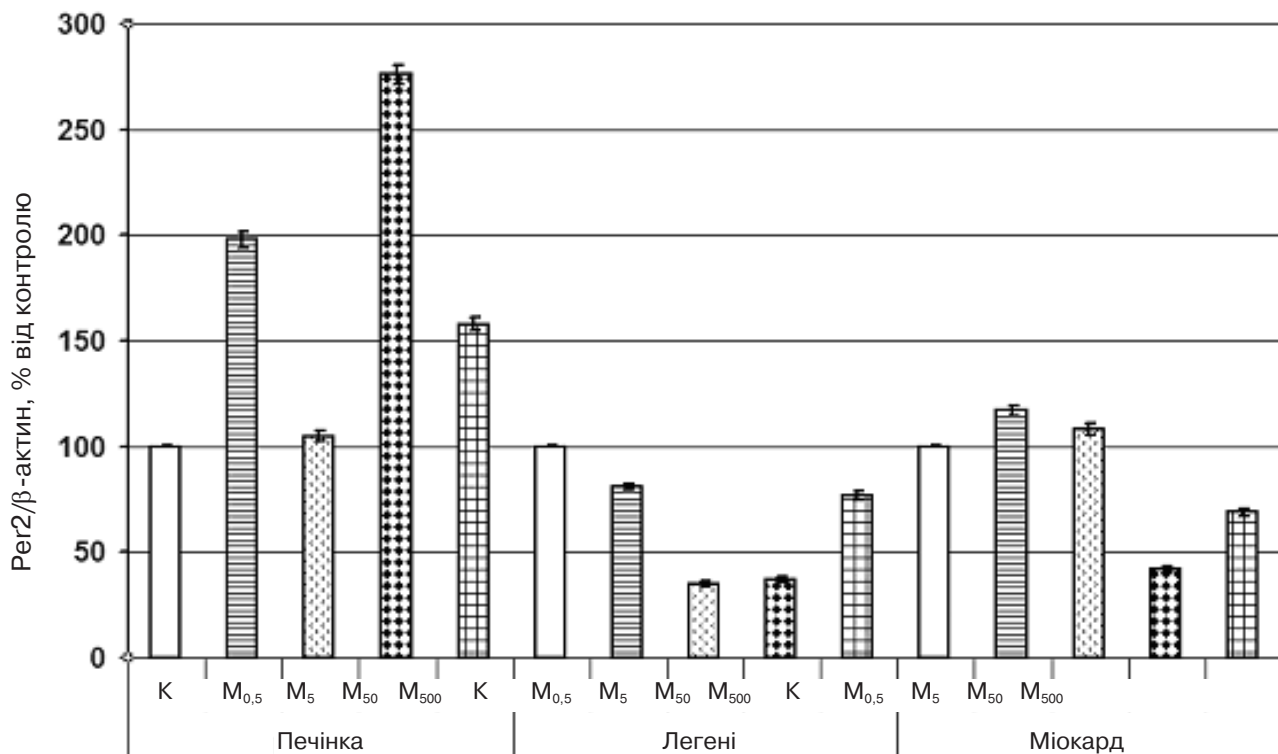
На рисунках 3 та 4 наведено результати досліджень з впливу різних доз МТБЕ (від 0,5 до 500 мг/кг маси тіла) протягом двох місяців на експресію у різних тканинах щурів мРНК *Bmal1*, іншого надзвичайно важливого у регуляції метаболічних процесів в організмі циркадального фактора. Встановлено, що у контрольних тварин рівень експресії мРНК *Bmal1* є різним у різних органах, причому у легенях виявлено значно більший рівень цього транскрипту порівняно з міокардом, а у печінці його рівень

**Рисунок 1**  
Аналіз впливу різних доз МТБЕ [0,5 ( $M_{0,5}$ ); 5 ( $M_5$ ); 50 ( $M_{50}$ ) та 500 ( $M_{500}$ ) мг/кг маси тіла один раз на день, п'ять разів на тиждень протягом двох місяців] на експресію мРНК *Per2* у печінці, легенях та міокарді щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР)



Примітка до рис. 1, 3, 5: К — контрольні тварини. Експресія мРНК-актину досліджувалась як контроль кількості РНК, що аналізується.

**Рисунок 2**  
Аналіз впливу різних доз МТБЕ на експресію мРНК *Per2* у печінці, легенях та міокарді щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі



Примітка: К — контрольні тварини. Експресію мРНК *Per2* нормалізували за  $\beta$ -актином і виражали у процентах від контролю (100%).



був також значно більшим, ніж у міокарді, але меншим порівняно з легенями. Таким чином, базальний рівень експресії мРНК Per2 та BMal1 є найвищим у легенях. Встановлено, що МТБЕ і у малих дозах (0,5 та 5 мг/кг маси тіла), і у значно більших (50 та 500 мг/кг маси тіла) пригнічує експресію мРНК BMal1 у печінці, хоча найбільш виражений ефект МТБЕ проявлявся у дозі 50 мг/кг маси тіла (рис. 4). Пригнічуючий ефект МТБЕ на рівень експресії мРНК BMal1 спостерігався і у міокарді, але його вираженість була значно меншою, а також максимальною у дозі МТБЕ у 50 мг/кг маси тіла. Водночас рівень експресії мРНК BMal1 у легенях під впливом МТБЕ посилювався при менших дозах (5 мг/кг маси тіла) і знижувався при максимальній дозі (500 мг/кг маси тіла).

Встановлено, що базальний рівень експресії мРНК Clock суттєво не відрізнявся у різних органах щурів і змінювався під впливом МТБЕ значно меншою мірою порівняно з мРНК Per2 та BMal1 (рис. 5). Стимулююча дія МТБЕ на експресію мРНК Clock проявлялась у печінці у дозі 50 мг/кг маси тіла, а у міокарді — 5 мг/кг маси тіла. За тривалої дії МТБЕ у легенях спостерігалось пригнічення рівня експресії мРНК Clock, але лише у випадку використання цієї сполуки у дозі 5 мг/кг маси тіла.

Таким чином, результати даної роботи переконливо свідчать про виражену дію МТБЕ на експресію генів надзвичайно важливих циркадальних факторів регуляції транскрипції у таких життєво важливих органах, як печінка, легені та серце. Отримані результати вказують на те, що МТБЕ може порушувати

метаболізм у клітинах організму, впливаючи на центральні ланцюги системи регуляції обміну речовин, змінюючи експресію циркадальних генів, які контролюють більшість метаболічних процесів в організмі. Ці принципово нові дані щодо впливу МТБЕ є фундаментом подальших наукових досліджень молекулярних механізмів токсичної та канцерогенної дії цієї хімічної сполуки і низки інших екологічно небезпечних сполук та пошуку шляхів нейтралізації їхніх негативних впливів на організм. Проведені нами дослідження є важливим внеском у молекулярну медицину, оскільки вони розкривають молекулярні основи дії на організм екологічно небезпечних сполук на рівні регуляції обмінних процесів і сприятимуть розробці принципово нових молекулярних підходів до їх діагностики, профілактики та лікування.

#### Висновки

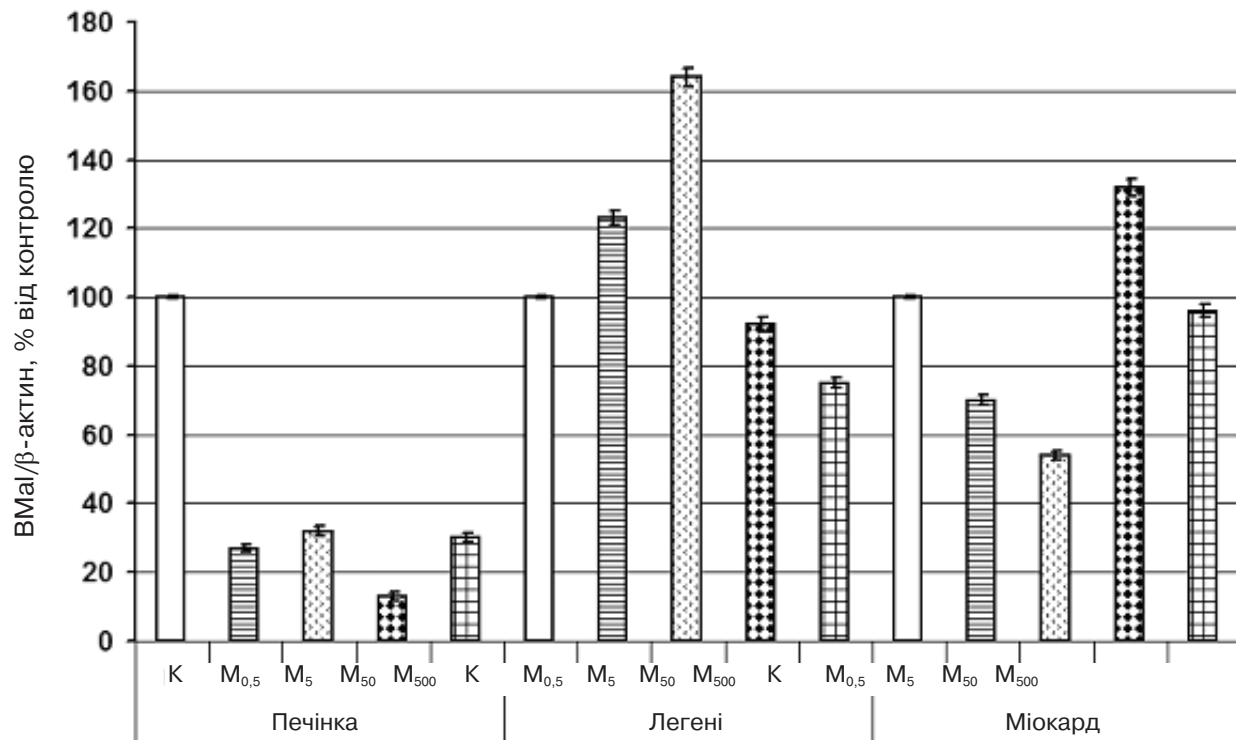
1. Тривала дія МТБЕ на організм призводить до змін в експресії генів Per2, BMal1 та Clock у таких життєво важливих органах, як печінка, легені та серце.

2. Зміни в експресії генів Per2, BMal1 та Clock, які контролюють перебіг більшості циркадальних процесів в організмі, можуть порушувати регу-

**Рисунок 3**  
**Аналіз впливу різних доз МТБЕ на експресію мРНК BMal1 у печінці, легенях та міокарді щурів**



**Рисунок 4**  
**Аналіз впливу різних доз МТБЕ на експресію мРНК BMal1 у печінці, легенях та міокарді щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі**



ляцію основних метаболічних процесів в організмі і сприяти виникненню злоякісних новоутворень.

3. Експресія генів *Per2*, *Bmal1* та *Clock* може слугувати важливим чутливим показником шкідливої дії хімічних забруднювачів довкілля.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Gonze D. Circadian rhythms and molecular noise / D. Gonze, A. Goldbeter // *Chaos*. — 2006. — 16, № 2. — P. 026110 (1-11).

2. Dunlap J.C. Molecular bases for circadian clocks / J.C. Dunlap // *Cell*. — 1999. — 96, № 2. — P. 271-290.

3. Harmer S.L. Molecular bases of circadian rhythms / S.L. Harmer, S. Panda, S.A. Kay // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 2001. — V. 7. — P. 215-253.

4. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells / M. Teboul, M.-A. Barrat-Petit, X.M. Li et al. // *J. Mol. Med.* — 2005. — 83. — P. 693-699.

5. Eide E.J. Control of mammalian circadian rhythm by CKlepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation / E.J. Eide, M.F. Woolf, H. Kang // *Mol. Cell. Biol.* — 2005. — 25, № 7. — P. 2795-2807.

6. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice / F.W. Turek, C. Joshu, A. Kohsaka et al. // *Science*. — 2005. — V. 308, № 5724. — P. 1043-1045.

7. Oishi K. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice / K. Oishi, H. Shirai, N. Ishida // *Biochem. J.* — 2005. — 386, PT 3. — P. 575-581.

8. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis / R.D. Rudic, P. McNamara, A.M. Curtis et al. // *PLoS Biol.* — 2004. — 2, № 11. — P. E377.

9. The basic-helix-loop-helix-

PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors / J.B. Hogenesch, Y.Z. Gu, S. Jain, C.A. Bradfield // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1998. — 95, № 10. — P. 5474-5479.

10. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism / N. Gekakis, D. Staknis, H.B. Nguyen et al. // *Science*. — 1998. — 280, № 5369. — P. 1564-1569.

11. Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells / O. Tsinkalovsky, R. Smaaland, B. Rosenlund et al. // *J. Biol. Rhythms*. — 2007. — 22, № 2. — P. 140-150.

12. The circadian clock component *bmal1* is a critical regulator of *p21waf1/cip1* expression and hepatocyte proliferation / A. Grechez-Cassiau, B. Rayet, F. Guillaumond et al. // *J. Biol. Chem.* — 2008. — 283, № 8. — P. 4535-4542.

13. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression / S. You, P.A. Wood, Y. Xi-ong et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2005. — 91, № 1. — P. 47-60.

14. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers / S.T. Chen, K.B. Choo, M.F. Hou et al. // *Carcinogenesis*. — 2005. — 26, № 7. — P. 1241-1246.

15. Expression of the circadian clock genes *Per1* and *Per2* in sporadic and familial breast tumors / S.L. Winter, L. Bosnoyan-Collins, D. Pinnaduwage, I.L. Andrulis // *Neoplasia*. — 2007. — 9, № 10. — P. 797-800.

16. Lee C.C. The circadian clock and tumor suppression by mammalian period genes / C.C. Lee // *Methods Enzymol.* — 2005. — 393. — P. 852-861.

17. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo / L. Fu, H. Pelicano, J. Liu et al. // *Cell*. — 2002. — 111, № 1. — P. 41-50.

18. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial car-

cinoma / K.T. Yeh, M.Y. Yang, T.C. Liu et al. // *J. Pathol.* — 2005. — 206, № 1. — P. 111-120.

19. Disturbance of circadian gene expression in endometrial cancer: detection by real-time quantitative RT-PCR / H.C. Shih, K.B. Choo, T.J. Chang et al. // *Oncol. Rep.* — 2005. — 14, № 6. — P. 1533-1538.

20. Transcription profiling of C/EBP targets identifies *Per2* as a gene implicated in myeloid leukaemia / S. Gery, A.F. Gombart, W.S. Yi et al. // *Blood*. — 2005. — 106, № 8. — P. 2827-2836.

21. Hypoxia affects expression of circadian genes *PER1* and *CLOCK* in mouse brain / D. Chilov, T. Hofer, C. Bauer et al. // *FASEB J.* — 2001. — 15. — P. 2613-2622.

22. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon / E. Vielhaber, E. Eide, A. Rivers et al. // *Mol. Cell. Biol.* — 2000. — 20, № 13. — P. 4888-4899.

23. Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase I epsilon / G.A. Keesler, F. Camacho, Y. Guo et al. // *Neuroreport*. — 2000. — 11, № 5. — P. 951-955.

24. Gietzen K.F. Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon / K.F. Gietzen, D.M. Virshup // *J. Biol. Chem.* — 1999. — 274, № 45. — P. 32063-32070.

25. SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein / T. Shirogane, J. Jin, X.L. Ang, J.W. Harper // *J. Biol. Chem.* — 2005. — 280, № 29. — P. 26863-26872.

26. Casein kinase I epsilon down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells / A. Okamura, N. Iwata, A. Tamekane et al. // *Life Sci.* — 2006. — 78, № 14. — P. 1624-1629.

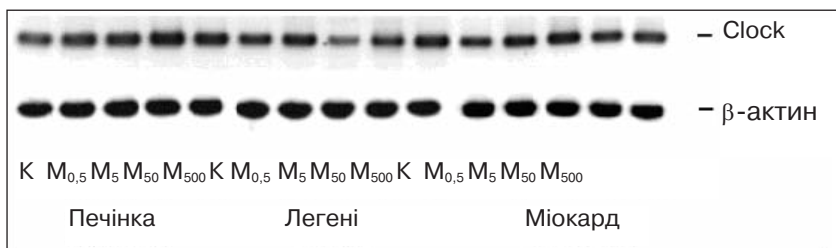
27. Casein kinase I epsilon plays a functional role in the transforming growth factor-beta signaling pathway / D.S. Waddell, N.T. Liberati, X. Guo et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — 279, № 28. — P. 29236-29246.

28. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon / E.J. Eide, E.L. Vielhaber, W.A. Hinze, D.M. Virshup // *J. Biol. Chem.* — 2002. — 277, № 19. — P. 17248-17254.

29. Akashi M., Tsuchiya Y.,

#### Рисунок 5

#### Аналіз впливу різних доз МТБЕ на експресію мРНК *Clock* у печінці, легенях та міокарді щурів





Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells // Mol. Cell. Biol. — 2002. — 22, № 6. — P. 1693-1703.

30. Gao Z.H., Seeling J.M., Hill V. et al. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2002. — 99, № 3. — P. 1182-1187.

31. Rubinfeld B., Tice D.A., Polakis P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon // J. Biol. Chem. — 2001. — 276, № 42. — P. 39037-39045.

32. Desagher S., Osen-Sand A., Montessuit S. et al. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8 // Mol. Cell. — 2001. — 8, № 3. — P. 601-611.

33. Knippschild U., Milne D.M., Campbell L.E. et al. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase1 delta in response to topoisomerase-directed drugs // Oncogene. — 1997. — 15, № 14. — P. 1727-1736.

34. Miyazaki K., Nagase T., Masaki M. et al. Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts // Biochem. J. — 2004. — 380, PT 1. — P. 95-103.

35. Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H. et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function // Nat. Genet. — 2006. — 38, № 3. — P. 312-319.

36. Motzkus D., Loumi S., Cadenas C. et al. Activation of human period-1 by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways // Chronobiol. Int. — 2007. — 24, № 5. — P. 783-792.

37. Яворовський О.П., Зенкіна В.І. Метил-третбутиловий ефір як глобальний забруднювач довкілля. Токсикологічні та екологічні аспекти ризику впливу в Україні // Довкілля та здоров'я. — 2005. — 35, № 4. — P. 75-80.

38. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O., Oguira T., Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // FEBS Lett. — 2004. — 576, № 1. — P. 14-20.

Надійшла до редакції 10.03.2010.

## EXOGENOUS NITRIC OXIDES IMPACT ON THE LEVEL OF S-NITROSO COMPLEXES IN BLOOD OF RATS IN A NORM AND AT TUMOUR GROWTH

Mikhailenko V.M.

## ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ ОКСИДІВ АЗОТУ НА РІВЕНЬ НІТРОЗИЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ У КРОВІ ЩУРІВ У НОРМІ ТА ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ



**МИХАЙЛЕНКО В.М.**

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

УДК: 616-006.04:661.98:616.155.16

**Ключові слова: оксиди азоту, нітрозотиоли, нітрозильні комплекси гемоглобіну, метгемоглобін, трансферин, церулоплазмін, нітрозативний стрес, карцинома Герена.**

Оксиди азоту (ОА) є одними з основних забруднювачів повітря з високим нітрозуючим потенціалом. Внаслідок техногенної діяльності людини щорічно в атмосферу надходять понад 50 млн. тонн ОА з продуктами згоряння і 25 млн. тонн — з промисловими викидами [1]. Екзогенний монооксид азоту (NO) в атмосфері окислюється до діоксиду азоту, що справляє токсичну дію на живі організми.

Екзогенний NO потрапляє до організму переважно через легені, звідки надходить у кров. Там він зв'язується з гемоглобіном, альбуміном та іншими залізо- та SH-вмісними білками і сполуками, транспортується судинами до різних тканин і органів [2]. NO може окислюватися до нітритів та/або нітратів, які зазвичай виводяться з організму. Як і молекули кисню, молекула NO легко дифундує крізь клітинні мембрани, що і забезпечує його дію без посередництва клітинних рецепторів. Частина NO може зворотньо зв'язуватися з біологічними молекулами, утворюючи S-нітрозотиоли

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ОКСИДОВ АЗОТА НА УРОВЕНЬ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КРОВИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ**

**Михайленко В.М.**

Изучали влияние экзогенных оксидов азота (ОА) на образование и изменение содержания нитрозильных комплексов гемоглобина, метгемоглобина, нитрозотиолов, трансферина и церулоплазмينا в сыворотке крови крыс в норме и при опухолевом росте. Показана взаимосвязь между развитием нитрозативного стресса и нарушениями свободнорадикального гомеостаза в организме. Длительное воздействие экзогенных ОА у крыс с карциномой Герена вызывало снижение содержания церулоплазмينا, что негативно влияет на антиоксидантные процессы.

**Ключевые слова: оксиды азота, нитрозотиолы, нитрозильные комплексы гемоглобина, метгемоглобин, трансферин, церулоплазмин, нитрозативный стресс, карцинома Герена.**

© Михайленко В.М. СТАТТЯ, 2010.

