

EFFECT OF METHYL TERTIARY-BUTYL ETHER ON THE EXPRESSION OF SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 AND CLOCK mRNA IN RAT LUNG AND LIVER

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

ЕКСПРЕСІЯ МРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 ТА CLOCK У ЛЕГЕНЯХ ТА ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЕФІРУ

В

**МІНЧЕНКО Д.О.,
ЯВОРОВСЬКИЙ О.П.,
ПАУСТОВСЬКИЙ Ю.О.,
МІНЧЕНКО О.Г.**

Національний медичний
університет
ім. О.О. Богомольця, м. Київ;
Інститут біохімії
ім. О.В. Палладіна
Національної академії наук
України, м. Київ

УДК 577.112.7:616

Більшість основних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі має здатність до автономних коливань з періодом, близьким до 24 годин, які називають циркадальними ритмами і які генеруються у гіпоталамусі системою біологічного годинника, молекулярну основу якого складають регуляторні та транскрипційні фактори, що кодуються циркадальними генами груп Період (Period) та Криптохромів (Cryptochromes), газеїнкінази, BMAL (brain and muscle ARNT-like protein) та CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) [1-3]. Циркадальні ритми з періодом, близьким до 24 годин, регулюють фундаментальні фізіологічні функції в організмі і тісно пов'язані з метаболічним гомеостазом. Вони можуть мати ви-

дові особливості та індивідуальні. Циркадальні фактори є ключовими регуляторами різноманітних метаболічних процесів як в нормі, так і за різних патологічних станів. Рівень експресії генів, що кодуєть синтез циркадальних регуляторних факторів, щоденно зазнає автономних коливань і визначає циркадальний характер перебігу різноманітних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі. Дисрегуляція циркадальних ритмів, зокрема сну, який є інтегральною частиною нашого життя і контролюється біологічним годинником, може сильно впливати на здоров'я, змінювати метаболізм і призводити до ожиріння та метаболічних захворювань [4].

Основа біологічного годинника ссавців складає група

ЭКСПРЕССИЯ мРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 И CLOCK В ЛЕГКИХ И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕТИЛТРЕТБУТИЛОВОГО ЭФИРА

**Минченко Д.А., Яворовский А.П.,
Паустовский Ю.А., Минченко А.Г.**

Цель исследования — изучение экспрессии наиболее важных генов циркадиальных регуляторных факторов, являющихся молекулярными компонентами системы циркадиальных часов (CSNK1E, PER1, BMAL1 и CLOCK), а также протеинкиназы SNARK при действии на организм метил-третбутилового эфира, токсического и экологически опасного соединения. Это обусловлено тем, что биологические часы играют чрезвычайно важную роль в регуляции большинства физиологических и метаболіческих процессов в организме, и нарушение протекания их функции есть одной из причин возникновения ряда патологических процессов.

Методы исследования. Уровень экспрессии генов CSNK1E, PER1, BMAL1, CLOCK и SNARK определяли в легких и печени крыс с помощью опосредованной обратной транскрипцией количественной полимеразной реакции в реальном времени в условиях продолжительного (в течение месяца) действия предельно допустимой концентрации метил-третбутилового эфира в воздухе, используя специальную камеру.

Результаты. Установлено, что уровень экспрессии циркадиальных генов PER1, BMAL1 и CLOCK

значительно усиливается в легких и в печени крыс под влиянием продолжительного (в течение месяца) действия предельно допустимой концентрации метил-третбутилового эфира в воздухе, причем в легких обнаружены более выраженные изменения в уровнях экспрессии генов PER1 и CLOCK. Показано также, что уровень экспрессии протеинкиназы CSNK1E, что контролирует функциональную активность циркадиальных факторов при действии метил-третбутилового эфира, значительно увеличивается как в легких, так и в печени. В этих же условиях метил-третбутилового эфира почти вдвое усиливает экспрессию гена SNARK, что кодирует синтез чувствительной к действию различных стрессовых факторов протеинкиназы.

Выводы. Результаты данной работы свидетельствуют о выраженном влиянии низких концентраций метил-третбутилового эфира на важные механизмы регуляции метаболіческих процессов в клетках жизненно важных органов на уровне экспрессии циркадиальных генов CSNK1E, PER1, BMAL1 и CLOCK, а также протеинкиназы SNARK, что может приводить к нарушению сигнальных каскадов в клетках и развитию разнообразных патологических состояний. Уровень экспрессии этих генов может быть чувствительным показателем вредного действия на организм метил-третбутилового эфира и, возможно, других химических веществ, загрязняющих окружающую среду.

© **Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Паустовський Ю.О., Мінченко О.Г.** Стаття, 2012.

3 **ENVIRONMENT & HEALTH** № 3 2012

EFFECT OF METHYL TERTIARY-BUTYL ETHER ON THE EXPRESSION OF SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 AND CLOCK mRNA IN RAT LUNG AND LIVER

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

Aims. The effect of methyl tertiary-butyl ether, a toxic and an ecologically dangerous chemical compounds, on the expression of most of the important molecular factors, components of circadian clock system (CSNK1E, PER1, BMAL1 and CLOCK), as well as, protein kinase SNARK. Biological clock plays an important role in the regulation of most physiological and metabolic processes in the organism. The disturbance of circadian processes behaviour in the organism leads to the development of different pathology.

Methods. The expression level of CSNK1E, PER1, BMAL1, CLOCK and SNARK genes was determined in rat lungs and liver by reverse transcription mediated real-time quantitative polymerase chain reaction. Rats were treated in special chamber during one month with aximum permissible concentration of methyl tertiary-butyl ether in air.

Results. It was shown that the expression level of PER1, BMAL1 and CLOCK genes increases both in the lungs and liver in rats treated with maximum

permissible concentration of methyl tertiary-butyl ether in air. Moreover, the changes in the expression level of PER1 and CLOCK genes were more significant in the lungs. We have also shown that methyl tertiary-butyl ether increases the expression level of protein kinase CSNK1E, which controls the functional activity of circadian factors, both in rat lungs and liver. At these experimental conditions methyl tertiary-butyl ether in two fold induces the expression SNARK gene, which encodes the synthesis of sensitive to the action of different stress factors protein kinase.

Conclusions. Results of this investigation demonstrate that low concentrations of methyl tertiary-butyl ether affects important regulatory mechanisms of metabolic processes in the cells of vital organs at the expression level of circadian genes CSNK1E, PER1, BMAL1 and CLOCK as well as protein kinase SNARK. Disruption of the normal of expression of these genes can destroy the cellular signal pathways and lead to the development of pathological processes. It could be an important sensitive marker of toxic action on the organism of methyl tertiary-butyl ether and possibly other ecologically dangerous chemical compounds.

Keywords: methyl tertiary-butyl ether, gene expression, CSNK1E, PER1, BMAL1, CLOCK, SNARK, lung, liver, rats.

протеїнів, яка включає не менше восьми факторів: CLOCK, BMAL1, PER1 (period 1), PER2, PER3, CRY1 (cryptochrome 1), CRY2 та REV-ERВальфа. BMAL1 та CLOCK є транскрипційними факторами, що утворюють транскрипційно активний комплекс шляхом гетеродимеризації, здатний зв'язуватися з cis-діючим елементом у промоторі різних генів-мішеней,

включаючи PER1, PER2, PER3, CRY1 та CRY2, і посилювати транскрипцію самого BMAL1, генеруючи позитивну петлю системи біологічного годинника. З іншого боку, комплекс CRY-PER формує негативну петлю взаємозв'язків годинника шляхом пригнічення транскрипційної активності гетеродимерного комплексу CLOCK / BMAL1. Іншу негативну петлю

взаємозв'язків циркадального годинника формує REV-ERВальфа, який пригнічує транскрипційну активність комплексу CLOCK/BMAL в ядрі [2].

Низкою досліджень було встановлено, що порушення у регуляції експресії циркадальних генів мають місце за деяких захворювань і можуть бути причетними також до виникнення та прогресії злоякісних

Рисунок 1

Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК SNF1 протеїнкінази, що активується AMP, (SNARK) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК (кДНК), отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 — контрольні тварини, 2 — дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження.

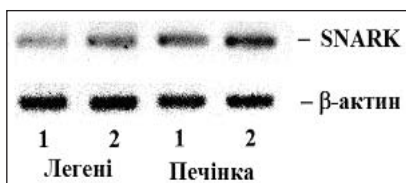
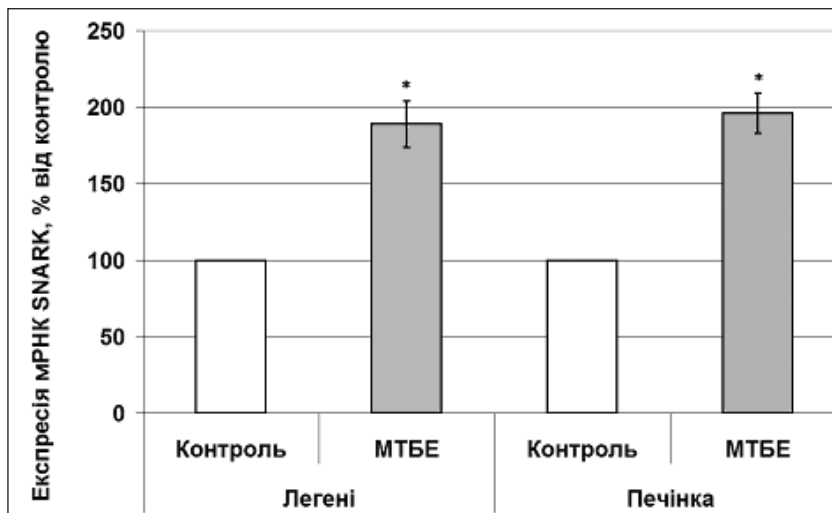


Рисунок 2

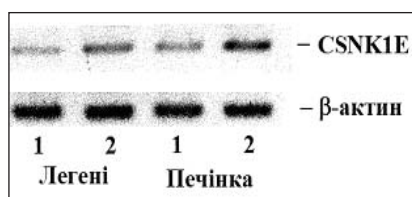
Кількісне визначення рівня експресії мРНК SNF1 протеїнкінази, що активується AMP, (SNARK) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК SNARK нормалізували за бета-актином і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100%.



пухлин [5-7]. Останнім часом виявлено залежність експресії низки циркадіальних генів від гіпоксії, що також значною мірою може сприяти прогресії більшості злоякісних пухлин у разі порушень у функції цих генів. Експресія більшості циркадіальних генів та функція факторів, що кодується ними, перебуває під контролем протеїнкінази, зокрема казеїнкінази-1ε (сигма-1), яка також беруть участь у регуляції низки інших надзвичайно важливих процесів [8, 9]. Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1ε зв'язується з PER1, PER2, PER3 і фосфорилує їх, що істотно змінює функціонування генів, які контролюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, MDM2, cMYC і GADD45α) та низки онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин [8, 10]. Ця протеїнкіназа бере участь у дестабілізації β-катенін-деградуєчого комплексу, у функціонуванні TGF-β сигнального каскаду, в інактивації білка BID через його розщеплення каспазою 8, фосфорилує P53, протеїн, що пригнічує ріст пухлин, негативно регулює фосфо-AKT через PTEN [9]. Крім того, для циркадіальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку у механізмах регуляції, що надзвичайно важливо для точної і чіткої роботи циркадіального годинника [11, 12].

Рисунок 3

Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК казеїнкінази-1ε (CSNK1E) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК.
1 — контрольні тварини, 2 — дія МТБЕ.
Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження.



ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

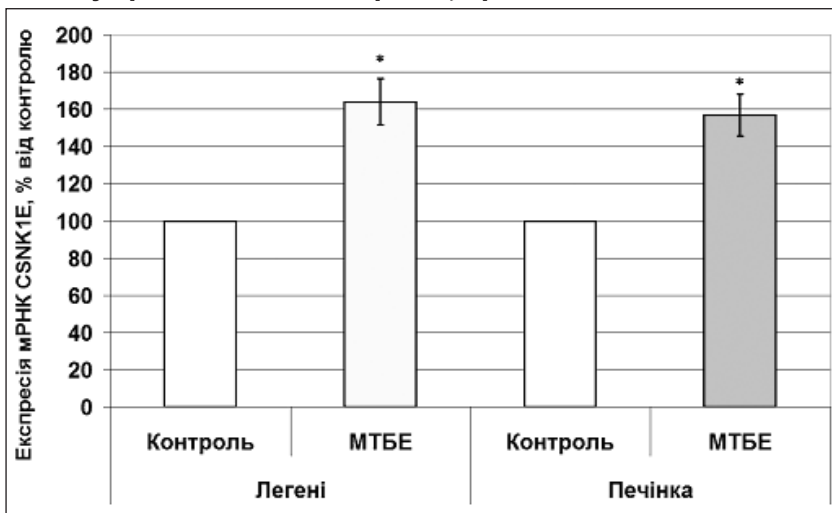
Протеїнкіназа SNARK (SNF1 протеїнкіназа, що активується AMP) є представником AMPK кінази, що належить до серин/треонінових протеїнкіназ [13]. Відомо, що активність протеїнкінази SNARK змінюється за різноманітних стресових станів клітин, але не у всіх типах клітин, суттєво залежить від рівня глюкози і глютаміну у клітинах, бере участь в індукованій CD95 рухливості та інвазивності. Недавно було виявлено, що нокаутні за геном протеїнкінази SNARK миші характеризуються ожирінням, відповідними порушеннями метаболізму і мають схильність до виникнення злоякісних пухлин подібно до тварин, нокаутних за циркадіальними генами [14, 15].

Метил-третбутиловий ефір — 2-метокси-2-метил-пропан (МТБЕ) є екологічно небезпечною хімічною сполукою, що використовується для виробництва неетильованих бензинів. Дослідженнями останніх років

встановлено, що МТБЕ є одним з найнебезпечніших глобальних хімічних забруднювачів довкілля у зв'язку з його високою стабільністю, здатністю накопичуватися у ґрунті і підземних джерелах водопостачання та вираженим негативним впливом на здоров'я людей [16, 17]. Забруднення цією сполукою довкілля може стати причиною отруєння людей, може ініціювати розвиток різних патологічних станів: хронічних нефропатій, гіпертрофії печінки, алергічних та респіраторних захворювань, нейротоксичних проявів, у тому числі і виникнення злоякісних новоутворень у нирках, печінці, сім'яниках та лімфовузлах, може ініціювати розвиток лейкемії [17-19]. Більше того, враховуючи інтенсивність використання бензинів з МТБЕ та високу стабільність цієї хімічної сполуки, можна вважати її досить небезпечним глобальним забруднювачем довкілля [18].

Рисунок 4

Кількісне визначення рівня експресії мРНК казеїнкінази-1ε (CSNK1E) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК CSNK1E нормалізували за бета-актином і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100%.



В експериментах на щурах та мишах встановлено, що повторні інгаляції МТБЕ призводять до порушення функції нирок, появи різних злоякісних пухлин та збільшення смертності [16, 17]. У досліджах на двох видах риб було показано, що короткотривала експозиція риб у воді з МТБЕ або третбутанолом призводить до деформації очей і ротової порожнини та до підвищеної смертності личинок. Основними метаболітами МТБЕ у крові є метанол та третбутиловий алкоголь, тоді як у печінці він перетворюється за участі цитохрому Р-450 до формальдегіду та третбутанолу, але основним місцем накопичення МТБЕ є жирова тканина і дещо меншою мірою кров та мозок [21, 22]. Разом з тим, детальні механізми токсичної дії МТБЕ, що ініціюють розвиток різних захворювань, зокрема злоякісних пухлин, залишаються нез'ясованими.

Раніше нами було встановлено, що внутрішньошлункове введення різних доз МТБЕ щурам протягом 1-2 місяців призводить до значних порушень в експресії циркадальних генів, протеїнази та PFKFB, а також альтернативного сплайсингу PFKFB4 та VEGF, що переконливо свідчило про високу чутливість протеїнази SNARK та циркадальних генів, як і альтернативний сплайсинг PFKFB4 до дії цієї токсичної хімічної сполу-

ки [23-26]. Актуальним постало питання про можливість впливу на організм гранично допустимої концентрації (ГДК) МТБЕ у повітрі робочої зони.

У зв'язку з цим, **метою** даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу екологічно небезпечної хімічної сполуки МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на організм. Для цього досліджували тривалу (протягом місяця) дію цієї хімічної сполуки на експресію протеїнази SNARK та циркадальних генів у легенях і печінці щурів.

Матеріали і методи досліджень. Досліди проводили на щурах лінії Wistar вагою 230-260 г. Тварин піддавали дії МТБЕ у концентрації 100 мг/м³ (на рівні нині чинної в Україні ГДК цієї речовини у повітрі робочої зони) у спеціальній камері по 4 години на день, п'ять днів на тиждень протягом чотирьох тижнів.

Виділення РНК. Тотальні РНК виділяли із печінки та легень щурів за допомогою реагенту Тризол (Trizol; Invitrogen, USA) згідно з протоколом виробника, як описано раніше [27]. Осаджували РНК із водної фази рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75% етанолом, розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз, і використовували для синтезу комплементарних ДНК (кДНК).

Аналіз експресії мРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK. Експресію мРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, отриманих методом зворотної транскрипції мРНК, а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно з протоколом виробника, використовуючи тотальну РНК із легень та печінки щурів як матрицю. Для ампліфікації кДНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK використовували HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина) та специфічні для цих генів щурів пари праймерів, отриманих від компанії Sigma, США. Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cycloer". Для ампліфікації кДНК протеїнази SNARK та циркадальних генів, а також бета-актину (як контрольного гена) використовували Absolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Великобританія).

Ампліфікацію кДНК протеїнази SNARK (SNF1 протеїнази, що активується AMP) проводили з використанням таких праймерів: прямого — 5'-AAGTCTCGGCAGCGTGAATC -3' та зворотного 5'-CAGGATGCTGTCTCACTCA -3', ну-

Рисунок 5

Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК циркадального гена BMAL1 у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК.
1 — контрольні тварини, 2 — дія МТБЕ.
Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження.

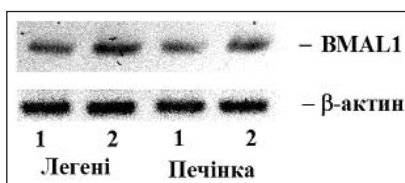
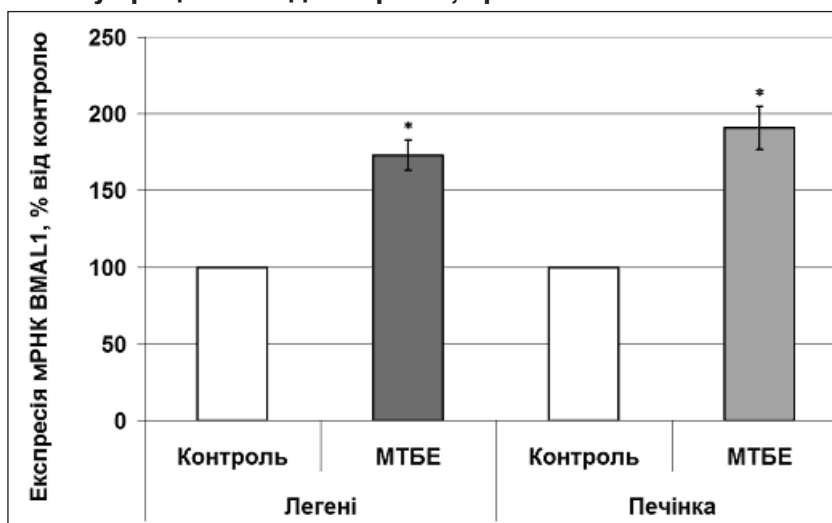


Рисунок 6

Кількісне визначення рівня експресії мРНК циркадального гена BMAL1 у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК BMAL1 нормалізували за бета-актином і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100%.



клеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 1544-1564 та 1737-1718 відповідно у мРНК SNARK щура (GenBank номер NM_001007617).

Для ампліфікації кДНК казеїнкінази-1εpsilon (CSNK1E) були використані прямий (5'— GACATCTACCTGGGTGCCAAC -3') та зворотний (5'— TGATCATCTGGTCCGCCAGC -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 64-84 та 340-321 у послідовності мРНК CSNK1E щура (GenBank номер NM_031617).

Ампліфікацію кДНК циркадіального фактора PER1 проводили з використанням таких праймерів: прямого — 5'-TCTCTTCTCAGAACTGGATG -3' та зворотного 5'— GGAAGCCTCTCATTAGACTGC -3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 3699-3718 та 3983-3963 відповідно у мРНК Per1 щура (GenBank номер NM_001034125).

Для ампліфікації кДНК BMAL1 були використані прямий (5'— TGACCCATGGAAGGTTAG -3') та зворотний (5'— AATCATCTGCTGCCCTGAG -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 753-772 та 1042-1061 у послідовності мРНК BMAL1 щура (GenBank номер NM_024362).

Для ампліфікації кДНК CLOCK були використані прямий (5'— TGCACAGTCA-GATGCTAGTG -3') та зворотний (5'— TGATCCACAAGATCA-GATGG -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264-283 та 455-436 у послідовності мРНК CLOCK щура (GenBank номер NM_021856).

Для контролю кількості РНК, взятої для аналізу, досліджували експресію мРНК АКТВ (бета-актину). Ампліфікацію кДНК бета-актину проводили з використанням таких праймерів: прямого — 5'— GGACTTCGAG-CAAGAGATGG -3' та зворотний — 5'— AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'. Прямий праймер починається з 704-го нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний — з 937-го нуклеотидного залишку (3'-позиція; GenBank номер X00351).

Ці саме пари праймерів були використані також і для ампліфікації у полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі. Експресія кожної смуги кДНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK порівнювалася з експресією мРНК бета-актину.

Зміни рівня експресії мРНК циркадіальних факторів SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK у легенях та печінці за дії МТБЕ порівнювали з відповідними значеннями у контрольних тварин, які було

прийнято за 100%. Аналіз результатів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator", а статистичний аналіз — у програмі Microsoft Excel.

Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом у 2% агарозному гелі, забарвлюючи кДНК за допомогою 5x Sight DNA Stain (EUROMEDEA). Гелі аналізували у системі Quantity One BioRad System (США).

Результати дослідження та їх обговорення. У зв'язку з тим, що порушення системи регуляції циркадіальних процесів в організмі є однією з причин виникнення низки патологічних процесів (у тому числі і злоякісних новоутворень), ми досліджували експресію мРНК ключових циркадіальних генів та протеїнкінази SNARK у легенях та печінці щурів у нормі та за тривалої дії на тварин низької концентрації МТБЕ методами полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. Результати дослідження експресії мРНК протеїнкінази SNARK представлені на рис. 1 та 2. Встановлено, що рівень експресії мРНК протеїнкінази SNARK майже вдвічі збільшується у легенях та печінці щурів під впливом МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Ці дані узгоджуються з отриманими нами раніше даними про підви-

Рисунок 7

Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК циркадіального гена CLOCK у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 — контрольні тварини, 2 — дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження.

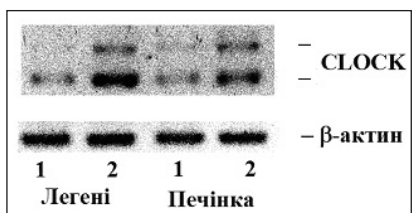
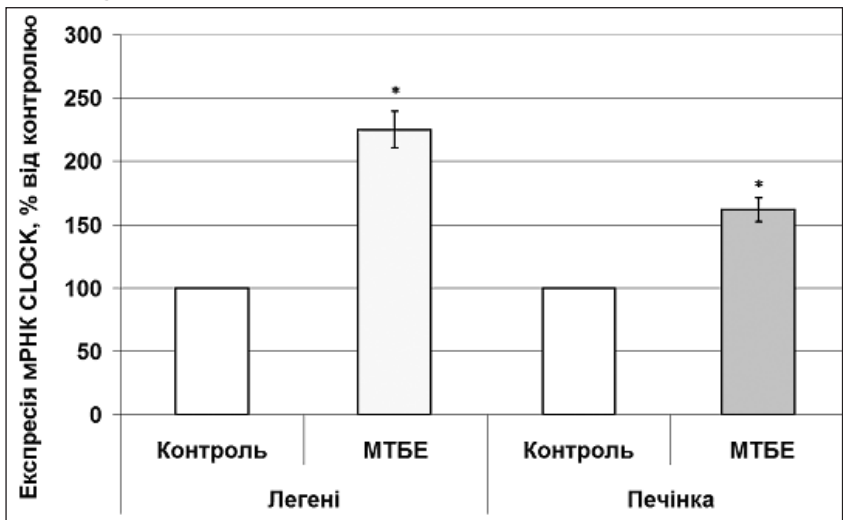


Рисунок 8

Кількісне визначення рівня експресії мРНК циркадіального гена CLOCK у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК CLOCK нормалізували за бета-актином і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100%.



щення рівня експресії цієї протеїнази під впливом тривалої дії лише малих доз метилтретбутилового ефіру за умов його внутрішньошлункового введення щурам [23].

Як видно з даних, наведених на рис. 3 та 4, рівень експресії іншої протеїнази, казеїнази-1ε, також суттєво збільшувався за дії на організм щурів МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони: у легенях — на 64 %, а у печінці — на 57%. Рівень експресії циркадіального транскрипційного фактора BMAL1 за дії на організм щурів МТБЕ збільшувався у легенях на 73%, а у печінці — на 91% (рис. 5 та 6). Дослідження експресії іншого циркадіального транскрипційного фактора CLOCK показало, що у контрольних щурів та у тварин, що піддавалися дії МТБЕ, виявляються дві ізоформи цього транскрипційного фактора, рівень експресії обох ізоформ збільшується під впливом цієї токсичної хімічної сполуки (рис. 7 та 8). Водночас під впливом тривалої дії МТБЕ на рівні ГДК для повітря робочої зони рівень експресії мРНК CLOCK посилюється у легенях значно більшою мірою, порівняно з печінкою: у легенях — на 225%, а у печінці — лише на 62% (рис. 8). Підвищення рівня експресії мРНК CLOCK було виявлено нами і раніше за умов тривалої дії

малих доз МТБЕ у разі його внутрішньошлункового введення щурам, але ефект був значно меншим [23]. Водночас за умов внутрішньошлункового введення щурам малих доз МТБЕ збільшення рівня експресії мРНК казеїнази-1ε було виявлено лише у печінці, а мРНК циркадіального транскрипційного фактора BMAL1 — лише у легенях [23].

При дослідженні експресії циркадіального фактора PER1 було також виявлено значне збільшення рівня мРНК у легенях та печінці щурів за дії низьких концентрацій МТБЕ, але у легенях ефект цієї токсичної хімічної сполуки був значно більшим (рис. 9 та 10). Так, під впливом тривалої дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони рівень експресії мРНК PER1 збільшився у легенях на 246%, а у печінці — лише на 85%, порівняно з контрольними тваринами.

Більш виражені зміни у рівнях експресії циркадіальних факторів PER1 та CLOCK у легенях, порівняно з печінкою, можуть бути зумовленими тим, що саме через легені МТБЕ надходить до організму, а також особливостями епітеліальних клітин легень і альвеоцитів та різними шляхами метаболізму МТБЕ у цих тканинах. Наведені вище дані переконливо свідчать про залежність змін у рівнях ек-

спресії протеїнази SNARK та основних циркадіальних факторів від величини доз МТБЕ та від способу його надходження до організму.

Таким чином, результати даної роботи вказують на виражену дію МТБЕ на рівні ГДК на експресію генів надзвичайно важливих протеїназ та циркадіальних факторів, відповідальних за регуляцію основних метаболічних процесів у клітинах організму у таких життєво важливих органах, як легені та печінка. Отримані результати вказують на те, що дія МТБЕ на організм може бути опосередкованою, принаймні частково, порушенням функції біологічного годинника шляхом змін в експресії циркадіальних факторів, які контролюють більшість фізіологічних та метаболічних процесів в організмі. Отримані результати вказують на необхідність проведення подальших наукових досліджень з метою з'ясування детальних молекулярних механізмів токсичної та канцерогенної дій МТБЕ і пошуку шляхів профілактики його негативного впливу на організм, а також перегляду ГДК цієї речовини у повітрі робочої зони. На нашу думку, одним з механізмів дії низьких концентрацій МТБЕ на організм можуть бути порушення функціонування системи біологічного годинника та сигнальних каскадів у клітинах.

Рисунок 9

Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК циркадіального гена PER1 у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 — контрольні тварини, 2 — дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження.

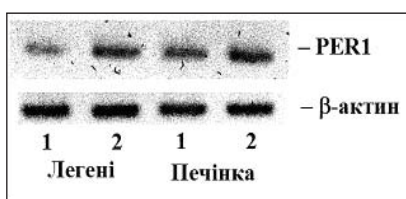
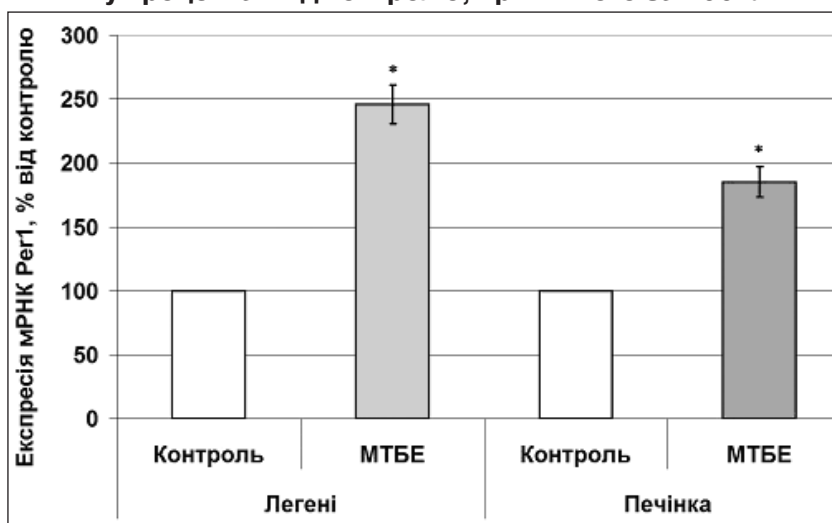


Рисунок 10

Кількісне визначення рівня експресії мРНК циркадіального гена PER1 у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК PER1 нормалізували за бета-актином і виражали в процентах від контролю, прийнятого за 100%.



Висновки

1. Тривала дія метил-третбутилового ефіру на організм на рівні ГДК у повітрі робочої зони призводить до збільшення рівня експресії мРНК протеїнкінази SNARK у таких життєво важливих органах, як легені та печінка.

2. Рівень експресії генів ключових циркадальних факторів суттєво збільшується у легенях та печінці за дії на організм метил-третбутилового ефіру на рівні ГДК у повітрі робочої зони, що може порушувати регуляцію основних метаболічних процесів в організмі і сприяти виникненню патологічних станів.

3. Експресія генів SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK може слугувати важливим чутливим показником шкідливої дії хімічних забруднювачів довкілля у досить низьких концентраціях.

4. Гранично допустима концентрація метил-третбутилового ефіру у повітрі робочої зони (1 мг/м³) не забезпечує безпечних умов праці осіб, що контактують з цією речовиною, і потребує перегляду у бік зменшення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Harmer S.L., Panda S., Kay S.A. Molecular bases of circadian rhythms // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 2001. — № 17. — P. 215-253.

2. Crumbley C., Burris T.P. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB // *PLoS ONE.* — 2011. — 6, № 3. — P. E17290.

3. Liu A.C., Tran H.G. Redundant function of REV-ERB α and beta and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms // *PLoS Genet.* — 2008. — 4, № 2. — P. e1000023.

4. Huang W., Ramsey K.M., Marcheiva B., Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism // *J. Clin. Invest.* — 2011. — № 121 (6): 2133-2141.

5. Bray M.S., Young M.E. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease // *Obes. Rev.* — 2009. — № 10, Suppl. 2: 6-13.

6. Kovac J., Husse J., Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock // *Mol. Cells.* — 2009. — № 28(2): 75-80.

7. Bechtold D.A., Gibbs J.E., Loudon A.S. Circadian dysfunction in disease // *Trends Pharmacol.*

Sci. — 2010. — 31, № 5. — P. 191-198.

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

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

10. Miyazaki K., Nagase T., Mesaki 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.

11. 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.

12. 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.

13. Lefebvre D.L., Rosen C.F. Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — 1724, № 1-2. — P. 71-85.

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

15. Tsuchihara K., Ogura T. et al. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci // *Cancer Sci.* — 2008. — 99, № 4. — P. 677-682.

16. McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review // *Crit. Rev. Toxicol.* — 2007. — 37, № 4. — 287-312.

17. Mehlman M.A. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil-refining and petrochemical industry — Part XXII: Health hazards from exposure to gasoline containing methyl tertiary butyl ether: study of New Jersey residents // *Toxicol. Ind. Health.* — 1996. — 12, № 5. — P. 613-627.

18. Яворовський О.П., Зенкіна В.І. Метил-третбутиловий ефір як глобальний забрудню-

вач довкілля. Токсикологічні та екологічні аспекти ризику впливу в Україні // *Довкілля та здоров'я.* — 2006. — № 4 (35). — С.75-80.

19. McGregor D. Methyl tertiary-butyl ether: studies for potential human health hazards // *Crit. Rev. Toxicol.* — 2006. — 36, № 4. — P. 319-358.

20. Moreels D., Lodewijks P., Zegers H. et al. Effect of short-term exposure to methyl-tert-butyl ether and tert-butyl alcohol on the hatch rate and development of the African catfish, *Clarias gariepinus* // *Environ. Toxicol. Chem.* — 2006. — 25, № 2. — P. 514-519.

21. Clary J.J. Methyl tert butyl ether systemic toxicity // *Risk Anal.* — 1997. — 17, № 6. — P. 661-672.

22. Imbriani M., Ghittori S., Pezzagno G. Partition coefficients of methyl tert-butyl ether (MTBE) // *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* — 1997. — 19, № 3. — P. 63-65.

23. Мінченко О.Г., Мінченко Д.О., Яворовський О.П. та ін. Експресія казеїнкінази-1 та SNARK у печінці, легенях та міокарді як показник впливу метил-третбутилового ефіру на організм лабораторних тварин // *Наук. вісник Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця.* — 2008. — № 21 (2). — С. 21-27.

24. Мінченко Д.О., Яворовський О.П. та ін. Експериментальні дані щодо порушення експресії циркадальних генів у печінці та легенях як показник токсичної дії метил-третбутилового ефіру на організм // *Укр. ж. з проблем медицини праці.* — 2008. — № 3 (15). — С. 20-26.

25. Мінченко О.Г., Яворовський О.П. та ін. Циркадальні гени як чутливі маркери біонебезпеки // *Довкілля та здоров'я.* — 2009. — № 1 (48). — С. 10-17.

26. Minchenko D.O., Mykhalchenko V.G. et al. Unique alternative splice variants of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 mRNA // *Ukr. Biokhim. Zh.* et al. 2008. — 80, № 4. — P. 66-73.

27. Minchenko O.H., Opentanova I.L. et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1 α activation // *FEBS Lett.* — 2004. — 576, № 1. — P. 14-20.

Надійшла до редакції 04.04.2012.