УДК 577.112.7:616

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДАНІ ЩОДО ПОРУШЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ У ПЕЧІНЦІ ТА ЛЕГЕНЯХ ЯК ПОКАЗНИК ТОКСИЧНОЇ ДІЇ МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЕФІРУ НА ОРГАНІЗМ

Мінченко Д.О.[1,2], Яворовський О.П.[2], Завгородній І.В.[3], Паустовський Ю.О.[2], Тсучігара К.[4], Есумі Г.[4], Мінченко О.Г.[1,4]

[1]Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ,Україна
[2]Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна
[3]Харківський національний медичний університет, м. Харків,Україна
[4]Науково-дослідний інститут інноваційної онкології Східного госпіталю Національного онкологічного центру Японії, м. Кашива, Японія

Протікання фізіологічних та біохімічних процесів в організмі має циркадіальний характер і порушення механізмів їх регуляції є одною із причин виникнення багатьох патологічних процесів, в тому числі і утворення злоякісних пухлин. Найбільш важливими генами, що регулюють протікання циркадіальних процесів в нормі та при патологічних станах є гени груп Per, BMol та Clock, а також казеїнкіназа-1ε, що контролює їх функціональну активність. Одержані нами дані засвідчили, що під впливом метил-третбутилового ефіру (МТБЕ), екологічно небезпечної, токсичної сполуки, значно порушується експресія генів Per2, Clock та казеїнкінази-1ε в печінці та легенях щурів і що це може спричинювати розлади у функціонуванні сигнальних каскадів у клітинах та розвитку патологічних станів, в тому числі і виникнення злоякісних новоутворень. Результати даної роботи переконливо свідчать про виражену дію МТБЕ на важливі ключові механізми регуляції метаболічних процесів в клітинах на рівні експресії циркадіальних генів, зокрема генів Per2, Clock та казеїнкінази-1ε, що може слугувати важливим чутливим показником шкідливої дії на організм хімічних забруднювачів довкілля.

Ключові слова: печінка, легені, гени, експресія, метил-третбутиловий ефір

Вступ

Поведінка більшості живих організмів та протікання в них фізіологічних і біохімічних процесів автономно коливаються з періодом близьким до 24 годин. Ці коливання пов'язані зі зміною дня та ночі, називають їх циркадіальними ритмами і генеруються вони у гіпоталамусі на молекулярному рівні так званим циркадіальним годинником [1–4]. Циклічний характер має більшість основних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі і контролюються вони циркадіальними генами (Per1, Per2, Per3, Clock та BMal1), які кодують синтез важливих регуляторних та транскрипційних чинників і експресія та активність яких, своєю чергою, контролюються казеїнкіназою-1ε [5–11]. Ці регуляторні чинники є ключовими в регуляції метаболізму як в нормі, так і при різноманітних патологічних станах. Циркадіальні гени щоденно змінюють циркадіальні ритми різноманітних фізіологічних та біохімічних процесів, як і поведінку організмів. Більше того, виявлено існування різних типів циркадіальних ритмів, причому це явище було продемонстровано і на лімфоцитах крові людей, у яких виявлено різні хронотипи експресії циркадіальних генів [4]. Експресія самих циркадіальних генів також змінюється циркадіально і контролюється, головним чином, світловими променями як на рівні гіпоталамусу, так і на рівні різних окремих клітин організму, зокрема лімфоцитів крові [1, 3, 4, 12]. Останнім часом виявлена залежність експресії ряду циркадіальних генів від гіпоксії, що також значною мірою може сприяти прогресії більшості пухлин при порушеннях в функції цих генів [13].

Крім того, встановлено, що порушення в регуляції експресії циркадіальних генів мають місце при ряді захворювань і можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [12–22]. Експресія більшості циркадіальних генів та функція кодуємих ними білкових чинників контролюється протеїнкіназами і, зокрема, казеїнкіназою-1ε, але її функція не обмежується цим і вона приймає участь також в регуляції цілого ряду інших надзвичайно важливих процесів [23–34]. Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1ε зв'язується з регуляторними

чинниками групи Per (Per1, Per2 та Per3), фосфорилює їх, що значно змінює їх функціональну активність і експресію контролюємих ними генів, зокрема ряду важливих генів, що регулюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, Mdm-2, c-myc і Gadd45a) та онкогенів, а також генів, пригнічуючих ріст пухлин [16, 23, 24, 26, 30, 35]. Ця протеїнкіназа приймає участь у дестабілізації b-катенін-деградуючого комплексу [31], у функціонуванні TGF-b сигнального каскаду [28], в інактивації білка bid через його розщеплення каспазою 8 [33], фосфорилює P53, білок, що пригнічує ріст пухлин [34], негативно регулює фосфо-Akt через PTEN [27]. Крім того, для циркадіальних чинників у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції, що надзвичайно важливо для точної і чіткої робити циркадіального годинника [25, 36–37].

Метил-третбутиловий ефір є екологічно небезпечною хімічною сполукою, що використовується для виробництва неетильованих бензинів, яка здатна накопичуватися у ґрунті, що, своєю чергою, призводить до забруднення цією сполукою підземних джерел водопостачання і можливого отруєння людей [38]. Більше того, враховуючи інтенсивність використання бензинів з метил-третбутиловим ефіром та високу стабільність цієї хімічної сполуки, можна вважати її досить небезпечним глобальним забруднювачем довкілля [38].

Метою даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів токсичної дії екологічно небезпечної хімічної сполуки метил-третбутилового ефіру на живі організми. Для цього досліджували вплив метил-третбутилового ефіру на експресію в печінці та легенях щурів генів Per2, BMal1, Clock-A і -B та казеїнкінази-1ε, які є важливими регуляторами багатьох ключових метаболічних процесів в організмі, в тому числі циркадіальних ритмів, порушення яких призводить до розвитку різноманітних патологій і, зокрема, до виникнення злоякісних пухлин.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проводили на 8 щурах-самцях лінії Wistar, вагою 230 – 260 грамів. Метил-третбутиловий ефір (МТБЕ) вводили 4 щурам внутрішньошлунково в кількості 500 мг/кг маси тіла один раз на день, п'ять разів на тиждень протягом одного місяця. 4 щури були контрольними. Матеріал від 8 щурів використаний у всіх експериментах.

Виділення РНК. Тотальні РНК виділяли із печінки, легень та серця щурів з допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, США) згідно протоколу виробника як описано раніше [39]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75% етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз і використовували для проведення досліджень експресії генів.

Аналіз експресії мРНК Per2, BMal1, Clock-A і -B та казеїнкінази-1ε. Експресію мРНК Per2, BMal1, Clock (A і B варіанти) та казеїнкінази-1ε досліджували методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР), а також методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, що дозволяв більш точно оцінити кількісні зміни в експресії генів. Тотальну РНК із різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) з допомогою оліго(dT) праймера та SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) або Quanti Test Reverse Transcription Kit (Invitrogen) згідно протоколам виробника. Для ампліфікації кДНК Per2, BMal1, Clock (A і B варіанти) та казеїнкінази-1ε використовували HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина) або Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) 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, в мРНК Per2 щура (GenBank номер NM_031678). Для ампліфікації кДНК BMal1 були використані прямий (5'- TGACCCTCATGGAAGGTTAG -3') та зворотний (5'- AATCCATCTGCTGCCCTGAG -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 753 – 772 та 1042 – 1061 в послідовності мРНК BMal1 щура (GenBank номер NM_024362). Для ампліфікації кДНК Clock (варіант A) були використані прямий (5'- TGCACAGTCAGATGCTAGTG -3') та зворотний (5'- TGATCCACAAGATCAGATGG -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264 – 283 та 792 – 772 в послідовності мРНК Clock щура (GenBank номер NM_021856). Для ампліфікації кДНК Clock (варіант B) були використані прямий (5'- CAATAGACCCAAAGGAGCCA -3') та зворотний (5'-ACTCTGGCCTTGAATTCCAC -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 602 – 621 в послідовності мРНК Clock щура (GenBank номер

NM_021856) та 1490 – 1481 в послідовності мРНК Clock-B миші (GenBank номер NM_007715), відповідно. Для ампліфікації кДНК казеїнкінази-1ε використовували такі праймери: прямий – 5'-GACATCTACCTGGGTGCCAAC -3' та зворотний 5'-TGATCATCTGGTCGGCCAGC-3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 64 – 84 та 340 – 321, відповідно, в мРНК казеїнкінази-1ε щура (GenBank номер NM_031617). Ці пари праймерів були використані для ампліфікації Per2, BMal1, Clock та казеїнкінази-1ε як для ЗТ-ПЛР, так і для ПЛР в реальному часі. Для контролю кількості аналізуємої РНК досліджували експресією мРНК b-актину. Експресія кожної смуги кДНК Per2, BMal1, Clock та казеїнкінази-1ε порівнювалася з експресією мРНК β-актину.

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

Результати дослідження та їх обговорення

Добові ритми протікання фізіологічних та біохімічних процесів в живих істотах є надзвичайно важливою умовою їх існування і їх порушення є одною із причин виникнення цілого ряду патологічних процесів. В зв'язку з тим, що найважливішими регуляторами циркадіальних процесів в організмі в нормі та при патологічних станах є продукти циркадіальних генів, ми досліджували експресію мРНК Per2, BMal1, Clock та казеїнкінази-1ε в печінці та легенях щурів в нормі та за умов тривалої (протягом одного місяця) дії на тварин метил-третбутилового ефіру (МТБЕ) методами зворотної транскрипції мРНК та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Як видно із даних, приведених на рис. 1, базальний рівень експресії мРНК Per2 значно різниться в різних органах щурів і є значно вищим у легенях порівняно з печінкою. Встановлено також, що експресія гену Per2 значно посилюється в клітинах цих надзвичайно важливих органів щурів під впливом метилтретбутилового ефіру (МТБЕ), що може бути причиною порушення сигнальних каскадів в клітинах та розвитку патологічних станів. Аналіз рівня

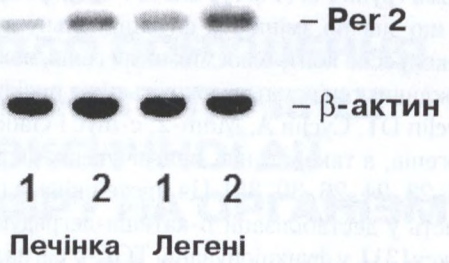

Рис. 1. *Вплив метил-третбутилового ефіру (МТБЕ; 500 мг/кг маси тіла один раз на день, п'ять разів на тиждень протягом одного місяця) на експресію мРНК Per2 у печінці та легенях щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). 1 – контрольні тварини, 2 – вплив МТБЕ. Експресія мРНК β-актину досліджувалася як контроль кількості аналізованої РНК.*

мРНК Per2 методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі чітко продемонстрував суттєве посилення експресії Per2 як у печінці (в 2,5 раза), так і в легенях (в 3,5 раза) при тривалій дії МТБЕ на тварин (рис. 2). Таким чином, МТБЕ значно порушує експресію гену Per2 як у легенях, так і в печінці щурів, причому вираженість дії цієї хімічної сполуки була подібною в різних органах тварин.

На рис. 3 наведені результати досліджень по впливу МТБЕ (500 мг/кг маси тіла протягом одного місяця) на експресію мРНК BMal1, іншого цир-

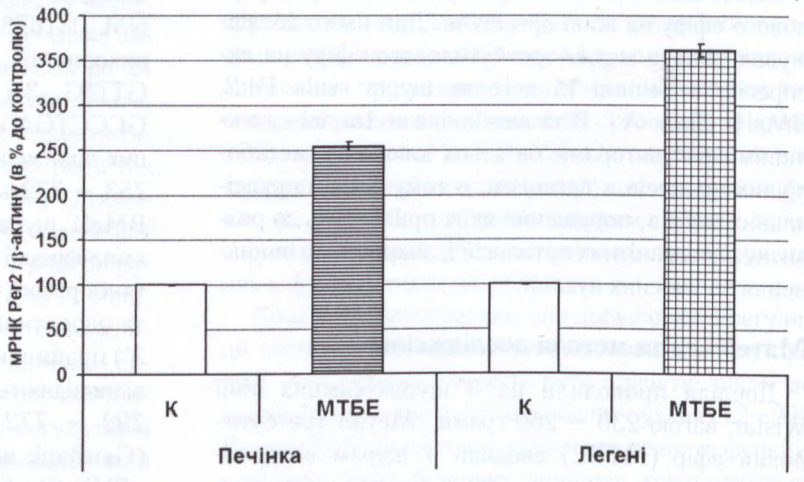

Рис. 2. *Аналіз впливу МТБЕ на експресію мРНК Per2 у печінці та легенях щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. К – контрольні тварини. Експресію мРНК Per2 нормалізували по β-актину і виражали в процентах від контролю (100 %).*

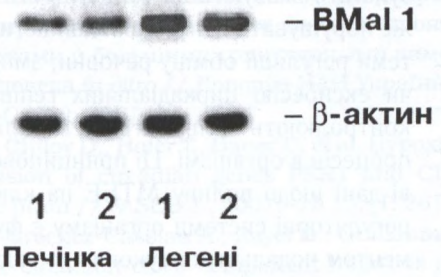

Рис. 3. *Аналіз впливу МТБЕ на експресію мРНК BMal1 у печінці та легенях щурів. 1 – контрольні тварини, 2 – вплив МТБЕ. Експресія мРНК β-актину досліджувалась як контроль кількості аналізованої РНК.*

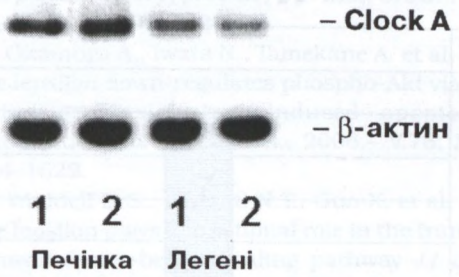

Рис. 4. *Вплив МТБЕ на експресію мРНК Clock (варіант А) у печінці та легенях щурів. 1 – контрольні тварини, 2 – вплив МТБЕ. Експресія мРНК b-актину досліджувалась як контроль кількості аналізованої РНК.*

кадіального чинника, надзвичайно важливого в регуляції метаболічних процесів в організмі. Було встановлено, що у контрольних тварин рівень експресії мРНК BMal1 різниться в різних органах щурів, причому в легенях виявлено більший рівень цього транскрипту порівняно з печінкою. Таким чином, базальний рівень експресії мРНК як Per2, так і BMal1 є вищим в клітинах легень. Методом ЗТ-ПЛР встановлено, що МТБЕ в дозі 500 мг/кг маси тіла значно не змінює експресію мРНК BMal1 як у печінці, так і в легенях щурів.

Іншим надзвичайно важливим геном регуляції циркадіальних процесів є Clock. Ми досліджували експресію двох варіантів його мРНК. Як видно із даних, наведених на рис. 4 та 5, базальний рівень експресії обох варіантів (А та В) мРНК Clock був значно більшим у клітинах печінки порівняно з легенями і змінювався під впливом МТБЕ в значно меншій мірі порівняно з мРНК Per2. Стимулювальна дія МТБЕ на експресію обох варіантів мРНК Clock виявлялася у печінці. Водночас, у клітинах легень при тривалій дії МТБЕ спостерігалося незначне пригнічення рівня експресії варіанту А і деяке посилення рівня експресії варіанту В мРНК Clock. Дані про вплив МТБЕ на експресію сплайс-варіантів мРНК Clock у клітинах легень вказують на те, що ця хімічна сполука може впливати на експресію генів змінюючи альтернативний сплайсинг пре-мРНК: посилюючи експресію одних сплайс-варіантів та пригнічуючи експресію інших. Можливо, що ця дія МТБЕ пов'язана з його впливом на певні протеїнкінази, що контролюють альтернативний сплайсинг пре-мРНК.

Виражені зміни були виявлені в клітинах печінки та легень щурів під впливом тривалої дії МТБЕ при дослідженні рівня експресії мРНК казеїнкінази-1ε. Як видно із даних, наведених на рис. 6, базальний рівень експресії мРНК казеїнкінази-1ε був значно більшим у клітинах печінки порівняно з легенями і значно посилювався під впливом МТБЕ в обох органах. Стимулювальна дія МТБЕ на Так, експресія мРНК казеїнкінази-1ε при тривалій дії МТБЕ збільшувалася у печінці майже в три рази, а в клітинах легень – в 3,5 раза (рис. 7). Оскільки казеїн-

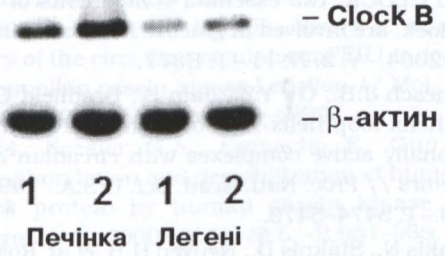

Рис. 5. *Вплив МТБЕ на експресію мРНК Clock (варіант В) у печінці та легенях щурів. 1 – контрольні тварини, 2 – вплив МТБЕ. Експресія мРНК β-актину досліджувалась як контроль кількості аналізованої РНК.*

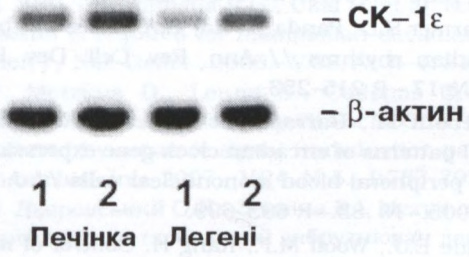

Рис. 6. *Вплив МТБЕ на експресію мРНК казеїнкінази-1ε у печінці та легенях щурів. 1 – контрольні тварини, 2 – вплив МТБЕ. Експресія мРНК β-актину досліджувалась як контроль кількості аналізованої РНК.*

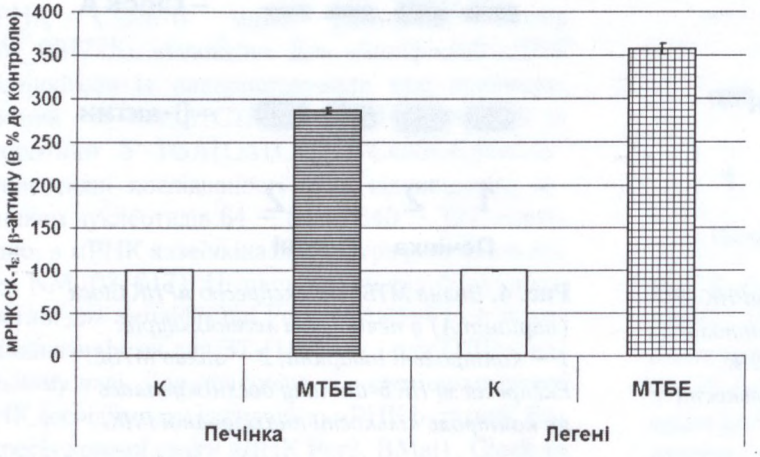

Рис. 7. *Аналіз впливу МТБЕ на експресію мРНК казеїнкінази-1ε у печінці та легенях щурів методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. К — контрольні тварини. Експресію мРНК казеїнкінази-1ε нормалізували по β-актину і виражали в процентах від контролю (100 %).*

кіназа-1ε контролює експресію та функціональну активність Per2 та багатьох інших циркадіальних чинників [24, 29, 30], то посилення її експресії під впливом МТБЕ може порушувати роботу циркадіального годинника і регуляцію основних процесів в організмі.

Таким чином, результати даної роботи переконливо свідчать про виражену дію МТБЕ на експресію ряду циркадіальних генів, які кодують синтез ключових чинників регуляції, в таких життєво важливих органах як легені та печінка. Отримані результати вказують на те, що МТБЕ може порушувати центральні ланцюги системи регуляції обміну речовин, змінюючи експресію циркадіальних генів, які контролюють більшість метаболічних процесів в організмі. Ці принципово нові дані щодо впливу МТБЕ на ключові регуляторні системи організму є фундаментом подальших наукових досліджень молекулярних механізмів токсичної та канцерогенної дії цієї хімічної сполуки і ряду інших екологічно небезпечних сполук та пошуку шляхів нейтралізації їх негативних впливів на організм людини. Проведені нами дослідження розкривають молекулярні основи дії на організм екологічно небезпечних сполук на рівні регуляції обмінних процесів і будуть сприяти розробці принципово нових молекулярних підходів до їх діагностики, профілактики та лікування.

Висновки

1. Тривала дія МТБЕ на організм призводить до виражених порушень в експресії генів Per2 та казеїнкінази-1ε в таких життєво важливих органах як легені та печінка.
2. Експресія генів Per2, казеїнкінази-1ε та Clock в клітинах організму може бути важливим чутливим показником шкідливої дії хімічних забруднювачів довкілля.

Література

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

2. Dunlap J.C. Molecular bases for circadian clocks // Cell, 1999.– V. 96, № 2.– P. 271–290.

3. Harmer S.L., Panda S., Kay S.A. Molecular bases of circadian rhythms // Ann. Rev. Cell. Dev. Biol., 2001.– № 17.– P. 215–253.

4. Teboul M., Barrat-Petit M.-A., Li X.M. et al. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells // J. Mol. Med., 2005.– № .83.– P. 693–699.

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

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

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

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

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

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

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

12. Гамалея Н.Ф., Шишко Е.Д. Дифференциальная циркадиальная реакция на свет, проявляемая Т клетками и большими гранулярными лимфоцитами человека *in vitro* // Доповіді НАН України, 2007.– № 9.– С. 131–136.

13. Chilov D., Hofer T., Bauer C. et al. Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain // FASEB J., 2001.– № 15.– P. 2613–2622.

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

15. You S., Wood P.A., Xiong Y. et al. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression // Breast Cancer Res. Treat., 2005.– V.91, № 1.– P. 47–60.

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

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

18. Lee C.C. The circadian clock and tumor suppression by Mammalian period genes. Methods Enzymol., 2005.– V.393.– P. 852–861.

19. Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo* // Cell, 2002.– V. 111, № 1.– P. 41–50.

20. Yeh K.T., Yang M.Y., Liu T.C. et al. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma. J. Pathol., 2005.– V.206, № 1-. P. 111–120.

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

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

23. 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.– V.20, № 13.– P. 4888–4899.

24. Keesler G.A., Camacho F., Guo Y. et al. Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. Neuroreport, 2000.– V.11, № 5.– P. 951–955.

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

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

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

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

29. Eide E.J., Vielhaber E.L., Hinz W.A., Virshup D.M. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon // J. Biol. Chem., 2002.– V. 277, № 19.– P. 17248–17254.

30. Akashi M., Tsuchiya Y., 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.– V.22, № 6.– P. 1693–1703.

31. 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.– V.99, № 3.– P. 1182–1187.

32. 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-. V.276, № 42.– P. 39037–39045.

33. 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.– V.8, № 3.– P. 601–611.

34. 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.– V.15, № 14.– P. 1727–1736.

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

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

37. 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.– V.24, № 5.– P.783–792.

38. 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, 2006.– С.75–80.

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

Минченко Д.А.[1,2], Яворовский А.П.[2], Завгородний И.В.[3], Паустовський Ю.А.[4], Тсучигара К.[4], Есуми Г.[4], Минченко А.Г.[1,4]

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О НАРУШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ЦИРКАДИАЛЬНЫХ ГЕНОВ В ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛ- ТРЕТБУТИЛОВОГО ЭФИРА НА ОРГАНИЗМ

[1] Институт биохимии им. О.В. Палладина Национальной академии наук Украины,г. Киев, Украина
[2]Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольця, г. Киев, Украина
[3]Харьковский национальный медицинский университет,г. Харьков, Украина
[4]Научно-исследовательский институт инновационной онкологии Восточного госпиталя Национального онкологического центра Японии, г. Кашива, Япония

Протекание физиологических и биохимических процессов в организме имеет циркадиальный характер и нарушения механизмов их регуляции есть одной из причин возникновения многих патологических процессов, в том числе и образования злокачественных опухолей. Наиболее важными генами, которые регулируют протекание циркадиальных процессов в норме и при патологических состояниях, являются гены групп Per, BMal и Clock, а также казеинкиназа-1ε, которая контролирует их функциональную активность. Полученные нами данные показали, что под влиянием метил-третбутилового эфира (МТБЭ), экологически опасного токсического химического соединения значительно нарушается экспрессия генов Per2, Clock и казеинкиназы-1ε в печени и легких крыс и, что может привести к нарушению функционирования сигнальных каскадов в клетках и развитию патологических состояний, в том числе и возникновению злокачественных новообразований. Результаты данной работы убедительно свидетельствуют о выраженном действии МТБЭ на важные ключевые механизмы регуляции метаболических процессов в клетках на уровне экспрессии циркадиальных генов, в частности Per2, Clock и казеинкиназы-1ε, что может быть важным чувствительным показателем вредного действия на организм химических веществ, загрязняющих окружающую среду.

Ключевые слова: печень, гены, экспрессия, метил-третбутиловый эфир

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

EXPERIMENTAL DATA ON DISORDERS OF EXPRESSION OF CIRCADIAN GENES IN LIVER AND LUNGS AS A MARKER OF METHYL-TRETBUTYL ETHER TOXIC EFFECT ON THE BODY

The development of physiological and biochemical processes in the body is of a circadian character and disorders in their regulation can result in occurrence of different pathological processes, formation of malignant tumours, in particular. The Per2, BMal1, Clock and caseinkinase-1ε are important regulators, which control these processes in normal and pathological conditions. We have shown that methyl-tretbutyl ether (MTBE), a toxic and ecologically dangerous chemical compound, can change significantly the expression of Per2, Clock and caseinkinase-1ε genes in rat liver and lungs. The disorders of such gene expression can destroy the cellular signal pathways and lead to development of pathological processes. The results of our investigation clearly demonstrate that MTBE cause a significant effect on important regulatory mechanisms, which control cell metabolism via circadian gene expression, Per2, Clock and caseinkinase-1ε, in particular. The expression of circadian genes can be used as a possible sensitive test for detection of the toxic effect of ecologically dangerous chemical compounds on the body.

Key words: liver, genes, expression, methyl-tretbuthyl ether

Надійшла: 13.05.2008

Контактна особа: Мінченко Д.О., Інститут біохімії ім.О.В. Палладіна Національної академії наук України,м. Київ