



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **54570** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЕФІРУ НА ОРГАНІЗМ ЛЮДИНИ

1

(21) u201008483

(22) 07.07.2010

(24) 10.11.2010

(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.

(72) ЯВОРОВСЬКИЙ ОЛЕКСАНДР ПЕТРОВИЧ,
МІНЧЕНКО ОЛЕКСАНДР ГРИГОРОВИЧ, ПАУС-
ТОВСЬКИЙ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МІНЧЕНКО
ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру на організм людини, що включає введення метил-третбутилового ефіру

2

внутрішньо лабораторним тваринам протягом тривалого періоду, який **відрізняється** тим, що після введення метил-третбутилового ефіру виділяють РНК із печінки, легень та серця лабораторних тварин, проводять аналіз експресії мРНК казеїнкінази-1ε та SNARK методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, та методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі і при виявленні змін експресії казеїнкінази-1ε та SNARK в життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді) дію метил-третбутилового ефіру на організм оцінюють як токсичну.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до гігієни і може бути використана для оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру шляхом визначення зміни експресії казеїнкінази-1ε та SNARK у життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді).

Проблема забруднення об'єктів довкілля метил-третбутиловим ефіром (МТБЕ) гостро стоїть в останні часи в багатьох країнах світу - США, країнах Європейського Союзу, а також в Україні. Це обумовлено тим, що в останні роки значно збільшилась кількість автомобільного транспорту, що використовує високооктановий етильований бензин з новою антидетонаційною добавкою - МТБЕ. Кількість МТБЕ в марках високооктанового бензину може досягати 10-15%. Також значно збільшилось число автозаправних станцій, де використовуються такі бензини. Крім того, частина МТБЕ не згоряє у двигунах автомобілів і може потрапляти в повітря у незміненому стані.

В Україні на сьогодні на більшості нафтопереробних заводів синтезують чи застосовують МТБЕ. Це втягує в процес виробництва значну кількість осіб, які зазнають дії даної хімічної речовини [1, 2]. МТБЕ також широко використовується у промисловості як мономер для синтезу поліетилену, поліпропілену, полівінілхлориду тощо. Таким чином, дії МТБЕ може піддаватись значна кількість працюючих: працівники автозаправних станцій, перевізники пального, водії автомобільного транспорту, ав-

томеханіки, працівники хімічних виробництв та інші категорії робітників, а також населення в цілому.

Більшість основних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі мають циклічний характер і контролюються рядом циркадальних генів (Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock та Bmal1), які кодують синтез важливих регуляторних та транскрипційних факторів [3-8]. Ці фактори є ключовими регуляторами метаболізму як в нормі, так і при різноманітних патологічних станах. Чіткий циркадальний ритм показаний для генів Per1, Per2 та Cry2 [6, 9]. Циркадальні гени щоденно змінюють циркадальні ритми різноманітних фізіологічних процесів. Порушення в регуляції експресії циркадальних генів виявлені при ряді захворювань і можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [10-13]. Експресія більшості циркадальних генів та функція кодуємих ними білкових факторів контролюється протеїнказами і, зокрема, казеїнказою-1ε, яка також приймає участь в регуляції і ряду інших, надзвичайно важливих, процесів [13]. Так, було встановлено, що казеїнказа-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. Ця протеїнказа приймає участь у дестабілізації β-катенін-деградуючого комплексу, у фун-

(19) **UA** (11) **54570** (13) **U**

кціонуванні TGF- β сигнального каскаду, в інактивації білка бід через його розщеплення каспазою 8, фосфорилує P53, білок, що пригнічує ріст пухлин, негативно регулює фосфо-Akt через PTEN. Крім того, для циркадіальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції. Більше того, виявлений сайт аутофосфорилування казеїнкінази-1 ϵ , відповідальний за інактивацію цього ензиму [14].

Протеїнкіназа SNARK (SNF1/AMP-активуєма протеїнкіназа) є представником AMPK кіназ, що відносяться до серин/треонінових протеїнкіназ. Відомо, що активність SNARK змінюється при різноманітних стресових станах клітин, але не у всіх типах клітин, суттєво залежить від рівня глюкози і глютаміну в клітинах, приймає участь в індукованій CD95 рухливості та інвазивності. Нокаутні по SNARK миші характеризуються ожирінням, відповідними порушенням метаболізму і мають схильність до виникнення злоякісних пухлин подібно до тварин, нокаутних по циркадіальним генам.

Проблема оцінки токсичної дії МТБЕ на організм ускладнюється тим, що на сьогодні не встановлені високочутливі молекулярно-генетичні біомаркери, які б давали змогу виявляти негативний вплив МТБЕ навіть при дії у низьких дозах. Все це не дає можливості визначати ступінь ризику впливу МТБЕ на здоров'я і життя людини, розробляти заходи, спрямовані на профілактику захворювань у населення.

Найбільш близьким аналогом - прототипом до способу, що заявляється, є спосіб визначення токсичної дії МТБЕ за зміною маси тіла та окремих органів, вмістом в печінці P450, рівнем гормонів у крові, тощо [15]. Але даний спосіб дає можливість визначати токсичну дію МТБЕ лише в дозах 400 мг/кг та вищих, але не є ефективним при низьких дозах МТБЕ.

Задачею корисної моделі є вдосконалення способу оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру, встановлення біомаркерів його негативної дії для розробки ефективних заходів, спрямованих на профілактику захворювань у населення.

Технічний результат, який одержують в результаті вирішення задачі, полягає у встановленні зміни експресії казеїнкінази-1 ϵ та SNARK у життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді), як біомаркера токсичної дії МТБЕ, прогнозуванні патологічних змін в організмі, а також у своєчасній розробці цільових програм, спрямованих на попередження негативної дії МТБЕ на організм людини.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який включає введення метил-третбутилового ефіру внутрішньо лабораторним тваринам протягом тривалого періоду згідно корисної моделі після введення метил-третбутилового ефіру виділяють РНК із печінки, легень та серця лабораторних тварин, проводять аналіз експресії мРНК казеїнкінази-1 ϵ та SNARK методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, та методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі і при виявленні змін експресії казеїнкінази-1 ϵ та SNARK в життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді) дію ме-

тил-третбутилового ефіру на організм оцінюють як токсичну.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Тотальні РНК виділяють із печінки, легень та серця щурів з допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, USA) згідно протоколу виробника. Осаджують РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивають двічі 75% етанолом і розчиняють у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Експресію мРНК казеїнкінази-1 ϵ та SNARK досліджують методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. РНК із різних органів щурів використовують як матрицю для синтезу кДНК з допомогою оліго(dT) праймера та SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) згідно протоколу виробника. Для ампліфікації кДНК казеїнкінази-1 ϵ та SNARK використовують HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина) та специфічні для цих генів щурів пари праймерів. Для ампліфікації кДНК казеїнкінази-1 ϵ використовують 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-1 ϵ щура (GenBank номер NM_031617). Для ампліфікації кДНК SNARK були використані прямий (5'-AAGTCTCGGCAGCGTGAATC-3') та зворотний (5'-CAGGATGCTGTCTCACTCA-3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 1544-1564 та 1737-1718 в послідовності мРНК SNARK щура (GenBank номер NM_001007617). Ці пари праймерів були використані для ампліфікації казеїнкінази-1 ϵ та SNARK як в 3Т-ПЛР, так і в ПЛР в реальному часі. Для контролю кількості аналізованої РНК досліджували експресію мРНК β -актину. Експресія кожної смуги кДНК казеїнкінази-1 ϵ та SNARK порівнювалася з експресією мРНК β -актину.

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

Переваги цього метода: висока інформативність, висока чутливість - вірогідні зміни експресії казеїнкінази-1 ϵ та SNARK в життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді) виявлялися при дії на лабораторних тварин МТБЕ уже в дозі 0,5 мг/кг.

Таким чином, запропонований спосіб оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру шляхом визначення зміни експресії казеїнкінази-1 ϵ та SNARK в життєво важливих органах (печінці, легенях, міокарді) є чутливим, інформативним та зручним у виконанні. Зміни експресії казеїнкінази-1 ϵ та SNARK можна вважати біомаркером токсичної дії МТБЕ на організм.

Спосіб був апробований у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України та на кафедрі гігієни праці і професійних хвороб Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, що до-

звояє рекомендувати його для широкого впровадження.

Використана література:

1. Яворовський О.П., Паустовський Ю.О., Веремей М.І. та ін. Гігієнічна характеристика умов праці та стану здоров'я у виробництві метил-третбутилового ефіру // Український журнал з проблем медицини праці. - 2005. - №3-4. - с. 29-34.

2. Яворовський О.П., Паустовський Ю.О., Дроботенко В.А. та ін. Гігієнічна оцінка умов праці та стану здоров'я робітників, зайнятих виготовленням метил-третбутилового ефіру на Лисичанському НПЗ // Довкілля та здоров'я. - 2007. - №1 (40). - с. 34-38.

3. Eide E.J., Woolf M.F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E.X., Giovanni A., Virshup D.M. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // Mol. Cell. Biol. - 2005. - 25, N 7. - P. 2795-2807.

4. Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A., Lin E., Ivanova G., McDearmon E., Laposky A., Losee-Olson S., Easton A., Jensen D.R., Eckel R.H., Takahashi J.S., Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice // Science. - 2005. - 308, N 5724. - P. 1043-1045.

5. 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.

6. Rudic R.D., McNamara P., Curtis A.M., Boston R.C., Panda S., Hogenesch J.B., Fitzgerald G.A. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis // PLoS Biol. - 2004. - 2, N 11. - P. E377.

7. 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. - 95, N 10. - P. 5474-5479.

8. Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism // Science. - 1998. - 280, N 5369. - P. 1564-1569.

9. Tsinkalovsky O., Smaaland R., Rosenlund B., Sothorn R.B., Hirt A., Steine S., Badiie A., Abrahamsen J.F., Eiken H.G., Laerum O.D. Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells // J. Biol. Rhythms. - 2007. - 22, N 2. - P. 140-150.

10. Chen S.T., Choo K.B., Hou M.F., Yeh K.T., Kuo S.J., Chang J.G. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. Carcinogenesis. - 2005. - 26, N 7. - P. 1241-1246.

11. Winter S.L., Bosnyan-Collins L., Pinnaduwage D., Andrusis I.L. Expression of the circadian clock genes Perl and Per2 in sporadic and familial breast tumors // Neoplasia. - 2007. - 9, N 10. - P. 797-800.

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

13. Vielhaber E., Eide E., Rivers A., Gao Z.H., Virshup D.M. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon // Mol. Cell. Biol. - 2000. - 20, N 13. - P. 4888-4899.

14. Gietzen K.F., Virshup D.M. Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon // J. Biol. Chem. - 1999. - 274, N 45. - P. 32063-32070.

15. de Peyster A., MacLean K.J., Stephens B.A., Ahern L.D., Westover C.M., Rozenshteyn D. Subchronic Studies in Sprague-Dawley Rats to Investigate Mechanisms of MTBE-Induced Leydig Cell Cancer // Toxicological Sciences. - 2003. - Vol. 72. - P. 31-42.