



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54573 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

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

1

2

(21) u201008486

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

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до гігієни і може бути використана для оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру шляхом визначення організму людини 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, автомеханіки, 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 циркадіальних генів (Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock та BMal), 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 циркадіальний ритм показаний для генів Per1, Per2 та Cry2 [6, 9]. Циркадіальні гени щоденно змінюють циркадіальні ритми різноманітних фізіологічних процесів. Порушення в регуляції експресії циркадіальних генів виявлені при ряді захворювань і можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [10-13]. Експресія більшості циркадіальних генів та функція кодуємих ними білкових факторів контролюється протеїніназами і, зокрема, казеїніназою-1ε, яка також приймає участь в регуляції і ряду інших, надзвичайно важливих, процесів [13]. Так, було встановлено, що казеїніназа-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.

Крім того, для циркадіальних факторів ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції. Більше того, виявлено сайт аутофосфо-

(13) U  
(11) 54573  
(19) UA

рилювання казеїнкінази-1 $\epsilon$ , відповідальний за інактивацію цього ензиму [14].

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 Р450, рівнем гормонів у крові, тощо [15]. Але даний спосіб дає можливість визначати токсичну дію МТБЕ лише в дозах 400мг/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 циркадального гена Clock 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, що включає введення метил-третбутилового ефіру внутрішньо лабораторним тваринам протягом тривалого періоду згідно корисної моделі виділяють РНК із печінки, легень та серця лабораторних тварин та проводять аналіз експресії мРНК Clock методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, та методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі і при виявленні змін експресії циркадального гена Clock в життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді) судять про токсичну дію метил-третбутилового ефіру на організм.

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 Clock 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(сГГ) праймера та Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) згідно протоколу виробника. Для ампліфікації кДНК Clock використовують HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина) та специфічні для цих генів щурів пари праймерів. Для ампліфікації кДНК

Clock використовують такі праймери: прямий (5'-TGCACAGTCAGATGCTAGTG -3') та зворотний (5'-TGATCCACAAGATCAGATGG -3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264 - 283 та 455 - 436 в послідовності мРНК Clock щура (GenBank номер NM021856). Ці пари праймерів використовують для ампліфікації Clock як в ЗТ-ПЛР, так і в ПЛР в реальному часі. Для контролю кількості аналізованої РНК досліджують експресію мРНК  $\beta$ -актину. Експресія кожної смуги кДНК Clock порівнюється з експресією мРНК  $\beta$ -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 циркадального гена Clock в життєво важливих органах (печінці, легенях та міокарді) виявлялися при дії на лабораторних тварин МТБЕ уже в дозі 0,5мг/кг.

Таким чином, запропонований спосіб оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру шляхом визначення зміни експресії циркадального гена Clock в життєво важливих органах (печінці, легенях, міокарді) є чутливим, інформативним та зручним у виконанні. Зміни експресії циркадального гена Clock 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 дозволяє 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 *Per1* 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 CM., 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.