



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60911 (13) U
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

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 У ЩУРІВ

1

(21) u201100872

(22) 26.01.2011

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) ЯВОРОВСЬКИЙ ОЛЕКСАНДР ПЕТРОВИЧ,
ПАУСТОВСЬКИЙ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МІН-
ЧЕНКО ОЛЕКСАНДР ГРИГОРОВИЧ, МІНЧЕНКО
ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ

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

(57) Спосіб оцінки токсичної дії метил-
третбутилового ефіру у щурів, що включає визна-
чення зміни маси тіла та окремих органів, який

2

відрізняється тим, що виділяють РНК із печінки та легень лабораторних тварин, проводять аналіз експресії PFKFB-4 методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції, синтезують і клонують кДНК PFKFB-4 в pCRII-TOPRO векторі та аналізують за допомогою агарозного гель-електрофорезу і при виявленні альтернативних сплайс-варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) в життєво важливих органах (печінці та легенях) судять про токсичну дію метил-третбутилового ефіру на організм.

Корисна модель належить до медицини, а саме до гігієни і може бути використана для оцінки токсичної дії метил-третбутилового ефіру шляхом визначення виникнення альтернативних сплайс-варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) в життєво важливих органах (печінці та легенях).

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

паливного, 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 циркадальних 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 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 кодованих 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 Gadd45α) та онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин.

Крім того, для циркадальних факторів ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах

(19) UA (11) 60911 (13) U

регуляції. Більше того, виявлено сайт аутофосфорилювання казеїнкінази-1ε, 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 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 виявленні виникнення альтернативних сплайс-варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) в життєво важливих органах (печінці та легенях), 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 вирішується тим, що у відомому способі, який включає визначення зміни маси тіла та окремих органів тощо, згідно з корисною моделлю, виділяють РНК із печінки та легень лабораторних тварин та проводять аналіз експресії PFKFB-4 методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції, а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції, синтезують і клонують кДНК PFKFB-4 в pCRII-ТОРО векторі та аналізують за допомогою агарозного гелю-електрофорезу і при виявленні альтернативних сплайс-варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) в життєво важливих органах (печінці та легенях) судять про токсичну дію метил-третбутилового ефіру на організм.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Тотальні РНК виділяють із печінки та легень щурів за допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, USA) згідно з протоколом 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 PFKFB-4 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 з протоколом виробника. Для ампліфікації кДНК PFKFB-4 використовують та "MasterCycler Personal" (Eppendorf, Німеччина) та специфічні для цих генів щурів пари праймерів Sigma (USA) чи Metabion (Germany). Для ампліфікації кДНК PFKFB-4 використовують такі праймери: прямі

5'-GGGATGGCGTCCCCACGGGAAC-3' (M1),

5'-TATCTGTGTGGATCCTGAGG-3' (M2) чи

5'-AGCGTGGAAGGTCCTCAACG-3' (M3) та зворотні

5'-CAAGGCACACTGCTTCCTG-5' (M5),

5'-GTCAAGGAAGTAGGCCAG-3' (M6) чи

5'-GATTCTCAGCAGCAGGTCAG-3' (M7) праймери.

Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 32-53, 366-385, 991-1010 (прямі праймери) та 358-340, 1246-1229 чи 1637-1618 (GenBank номер NM_019333).

Для аналізу експресії альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 EU404101 використовували прямий праймер 5'-CAGTTCATCAGTGACCAGAAC-3' (M8) та зворотний праймер 5'-ACCAGGTCTTCATAGGACGG-3' (M9). Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 893-913 та 1 143-1102 кДНК PFKFB-4 щурів (GenBank accession number NM_019333).

Ці пари праймерів використовують для ампліфікації PFKFB-4 як в полімеразній ланцюговій реакції, так і в кількісній полімеразній ланцюговій реакції в реальному часі. Для контролю кількості аналізованої РНК досліджують експресію мРНК β-актину. Експресія кожної смуги кДНК PFKFB-4 порівнюється 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 способу: висока інформативність, висока чутливість - утворення альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 в життєво важливих органах (печінці та легенях) 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 виникнення альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 в життєво важливих органах (печінці та легенях) є чутливим, інформативним та зручним у виконанні. Виникнення альтернативних splice варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) в життєво важливих органах (печінці та легенях) 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.

Джерела інформації:

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 стан здоров'я робітників, зайнятим виготовленням метил-третбутилового ефіру на Лисичанському НГЗ //Довкілля та здоров'я.-2007.- № 1 (40).- С. 34-38.
3. Eide E.J., Woolf M.F., Kang K, Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E.L., Giovanni A., Virshup D.M. Control of mammalian circadian rhythm by CKlepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // Мої. Cell. Bid.-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., Ilogeneseh J.B., Fitzgerald G.A. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis // PLoS Biol.-2004.-2 N11.-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 // 1. 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. Deregleate expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. Carcinogenesis.-2005.-26, N 7. - P. 1241-1246.
11. Winter S.L., Bosnoyan-Collins L., Pinnaduwa 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 B., Eide E., Rivers A., Gao Z.H., Virshup D.M. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase 1 epsilon // Мої. Cell. Biol.-2000.-20, N 13. - P. 4888-4899.
14. Gietzen K.F., Virshup D.M. Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase 1 epsilon // J. Biol. Chem.-1999.-274, N 45. - P. 32063-32070.
15. de Peyster A., MacLean K.J., Stephens B.A., Ahem 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.