

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ЕКСПРЕСІЮ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ ТА 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-4 У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ

Д. О. Мінченко^{1,2}

І. В. Божко¹

Т. О. Зінченко²

В. Г. Михальченко¹

О. П. Яворовський²

О. Г. Мінченко¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Перебіг фізіологічних та біохімічних процесів в організмі має циркадіальний характер, і порушення механізмів їх регуляції є однією з причин виникнення деяких патологічних процесів, у тому числі й утворення злоякісних пухлин. Найбільш важливими генами, що регулюють циркадіальні процеси в організмі як у нормі, так і при патологічних станах, є гени циркадіальних факторів *Per1*, *Per2*, *Clock* та *BMal1*, а також казеїнкіназа-1ε, що контролює експресію цих генів. Одержані нами дані показали, що під впливом наночастинок срібла відбувається порушення експресії генів казеїнкінази-1ε, *BMal1*, *Per1*, *Per2* і *Clock*, а також 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) у головному мозку щурів, причому експресія одних генів посилюється, а інших — знижується. Встановлено, що зміни в експресії циркадіальних генів та казеїнкінази-1ε виявляються уже через одну добу після введення тваринам наночастинок срібла, а через 3 та 14 діб здебільшого стають більш вираженими. Порушення експресії циркадіальних генів та казеїнкінази-1ε може спричинювати розлади функціонування сигнальних каскадів у клітинах головного мозку та порушувати регуляцію метаболічних процесів і на периферії. Результати цієї роботи свідчать про вплив наночастинок срібла на важливі ключові механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах головного мозку на рівні експресії циркадіальних генів.

Ключові слова: наночастинок срібла, експресія генів, казеїнкіназа-1ε, *Per1*, *Per2*, *Clock*, *BMal1*, PFKFB-4, головний мозок, щури.

Перебіг метаболічних та фізіологічних процесів в організмі, як і поведінка більшості живих істот, автономно коливається з періодом, близьким до 24 год, що пов'язано зі зміною дня і ночі. Ці коливання отримали назву циркадіальних ритмів. Генеруються вони в гіпоталамусі на молекулярному рівні так званім циркадіальним годинником, основним компонентом якого є циркадіальні гени [1–4]. До циркадіальних генів належать гени групи *Per* (період: *Per1*, *Per2* та *Per3*), *Clock*, *BMal1* і криптохроми (*Cry1* та *Cry2*), які кодують синтез важливих регуляторних факторів і експресія та активність яких, у свою чергу, контролюються казеїнкіназою-1ε [5–11].

Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1ε фосфорилує циркадіальні фактори *Per1*,

Per2, *Per3*, *BMal1* та криптохроми, а це зумовлює суттєві зміни у функціонуванні генів, які контролюють цикл поділу клітин (*Cyclin D1*, *Cyclin A*, *Mdm-2*, *c-myc* і *Gadd45a*) та ряду онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин [12–16]. Окрім того, казеїнкіназа-1ε контролює перебіг ряду інших процесів, зокрема бере участь у дестабілізації β-катенін-деградуючого комплексу, у функціонуванні TGF-β сигнального каскаду, в інактивації протеїну *bid*, задіяного в регуляції апоптозу, через його розщеплення каспазою 8, фосфорилує протеїн p53 [17–23].

Протеїнові продукти циркадіальних генів є ключовими факторами регуляції метаболізму як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах [5, 7]. Порушення в ре-

гуляції експресії циркадіальних генів виявлено при багатьох захворюваннях. Зокрема, вони можуть бути причетні до виникнення та прогресії різних злоякісних пухлин [24–31].

Ці гени щодня змінюють циркадіальні ритми різноманітних процесів в організмі, що є наслідком ритмічних щоденних змін в експресії самих циркадіальних генів, і це було чітко показано для генів *Per1*, *Per2* та *Cry2*. Більше того, існують різні типи циркадіальних ритмів, причому це явище було продемонстровано і на лімфоцитах крові людей, у яких виявлено різні хронотипи експресії циркадіальних генів [3]. Циркадіальний характер експресії самих циркадіальних генів контролюється головним чином світловими променями на рівні як гіпоталамуса, так і різних окремих клітин організму [1–3].

Було з'ясовано, що регуляція метаболізму факторами циркадіального годинника передбачає постійний взаємозв'язок між регулювальною системою і метаболічними шляхами [4, 6]. Так, для циркадіальних факторів у ссавців є характерним явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції: казеїнкіназа-1ε зв'язується з *Per2*, а потім з *Cry* та комплексом *Clock:BMal1*, створюючи негативну регуляторну петлю, що надзвичайно важливо для точної і чіткої роботи циркадіального годинника [9, 10, 32–34].

Раніше нами було встановлено, що експресія казеїнкінази-1ε та циркадіальних генів у життєво важливих органах може бути чутливим маркером впливу на організм екологічно токсичних речовин, зокрема метилтретбутилового ефіру [35]. Дані літератури свідчать, що токсичними є також і наночастинки срібла, які, поряд з іншими наноматеріалами, застосовують і в медицині. Відомо, що токсичність наночастинок срібла є більшою порівняно з макроскопічними дисперсіями срібла, що, можливо, пов'язано з їхніми фізико-хімічними характеристиками, здатністю наночастинок безперешкодно проникати через біологічні бар'єри організму [36–40].

Дослідження токсичності наночастинок срібла показали, що під їх впливом зростає частота загибелі ембріонів. Деякі автори вважають, що наночастинки срібла є довгостроковим джерелом іонів срібла, з чим пов'язують небезпеку їхнього шкідливого впливу на довкілля. Специфічним і потенційно менш небезпечним чинником є аерозоль матричного натрію хлориду, який містить власне наночастинки срібла (до 30%). Під час різних технологічних операцій концентрація аерозолу коливається, але 98%

матричного пилу належить до респірабельної фракції, тобто існує реальна можливість надходження певної кількості наночастинок срібла в організм інгаляційним шляхом, у зв'язку з чим всебічне еколого-токсикологічне дослідження цього нового антропогенного чинника є досить актуальним. В експериментах на щурах було досліджено інгаляційну токсичність наночастинок срібла розміром від 20 до 65 нм у різних концентраціях. Тварин витримували в камері протягом 6 год (п'ять разів на тиждень упродовж 28 днів), однак суттєвих змін у біохімічних показниках крові у цих дослідженнях не виявили [36].

Таким чином, наявні в літературі дані наукових досліджень переконливо свідчать про вищу біологічну активність наночастинок срібла порівняно з металевим сріблом і необхідність дослідження його антропогенного впливу на рівні експресії генів регуляторних факторів, що контролюють процеси метаболізму.

Метою даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу наночастинок срібла як нового антропогенного чинника на живі організми на рівні експресії циркадіальних генів *Per1*, *Per2*, *Clock*, *BMal1* та казеїнкінази-1ε, що відіграють важливу регуляторну роль у багатьох метаболічних процесах в організмі.

Матеріали і методи

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Wistar масою 230–240 г. У дослідженні використовували наночастинки срібла в матриці NaCl, одержані методом електронно-променевого випаровування у вакуумі в лабораторії № 84 Міжнародного центру електронно-променевих технологій Інституту електрозварювання ім. Є. О. Патона. Методом електронної мікроскопії встановили, що частинки срібла мають переважно сферичну форму і розміри 28–30 нм. Наночастинки срібла вводили тваринам інтратрахеально в кількості 0,05 мг/кг маси тіла одноразово і досліджували експресію протеїнкінази SNARK у різних органах щурів через 1, 3 або 14 днів.

Виділення РНК. Тотальні РНК виділяли з головного мозку щурів за допомогою реагента Тризол (Trizol; Invitrogen, США) згідно з протоколом виробника, як описано раніше [41]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75%-м етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Аналіз експресії мРНК Per1, Per2, Clock, BMal1, PFKFB-4, GAPDH та казеїнкінази-1ε. Для дослідження експресії мРНК циркадіальних генів Per1, Per2, Clock, BMal1, казеїнкінази-1ε, фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК (кДНК), отриманих зворотною транскрипцією матричних РНК, а також метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Тотальну РНК з головного мозку щурів використовували як матрицю для синтезу кДНК за допомогою олиго(dT)-праймера та SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) згідно з протоколом виробника. Для ампліфікації кДНК Per1, Clock та BMal1 застосовували HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина), специфічні для цих генів щурів пари праймерів та MasterCycler Personal (Eppendorf, Німеччина).

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 number NM_031617).

Ампліфікацію кДНК Per1 здійснювали, використовуючи праймери: прямий — 5'-TCTCTTCTCAGAACTGGATG-3' та зворотний 5'-GGAAGCCTCTCATTAGACTGC-3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 3699-3718 та 3983-3963, відповідно, в мРНК Per1 щура (GenBank number NM_001034125).

Для ампліфікації кДНК Per2 застосовували праймери: прямий — 5'-STGGGAA-GATCCTGTACATC-3' та зворотний 5'-GCTGGTAGCGAATCTCATTC-3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 700-719 та 960-941, відповідно, в мРНК Per2 щура (GenBank number NM_031678).

Ампліфікацію кДНК Clock проводили з такою парою праймерів: прямий (5'-TGCACAGTCAGATGCTAGTG-3') та зворотний (5'-TGATCCACAAGATCAGATGG-3'). Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264-283 та 792-772 у послідовності мРНК Clock щура (GenBank number NM_021856).

Для ампліфікації кДНК BMal1 було використано прямий (5'-TGACCCTCATGGAAGGTTAG-3') та зворотний (5'-AATC-

CATCTGCTGCCCTGAG-3') праймери, нуклеотидні залишки яких відповідають залишкам нуклеотидів 753-772 та 1042-1061 у послідовності мРНК BMal1 щура (GenBank number NM_024362).

Ампліфікацію кДНК PFKFB-4 проводили з такою парою праймерів: прямий (5'-GCAGTGGAAAGGTCTCAACG-3') та зворотний (5'-GATTCTCAGCAGCAGGTCAG-3'). Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 991-1010 та 1618-1637 у послідовності мРНК PFKFB-4 щура (GenBank number NM_019333).

Для ампліфікації кДНК GAPDH використовували прямий (5'-ATCTTCCAGGAGCGAGATCC-3') та зворотний (5'-TCATGGATGACCTTGCCAG-3') праймери, нуклеотидні залишки яких відповідають залишкам нуклеотидів 291-310 та 562-543 у послідовності мРНК GAPDH щура (GenBank number X02231).

Ці пари праймерів було використано також для ампліфікації Per1, Per2, Clock, BMal1, PFKFB-4 та GAPDH під час дослідження їх експресії методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Для контролю кількості аналізованої РНК досліджували експресію мРНК β-актину. Експресію кожної смуги мРНК Per1, Per2, Clock, BMal1, PFKFB-4 та GAPDH порівнювали з експресією мРНК β-актину.

Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом у 2%-му агарозному гелі, забарвлюючи кДНК бромистим етидієм. Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на Stratagene Mx 3000P cycler, використовуючи SYBRGreen Mix (США). Аналіз результатів кількісної полімеразної ланцюгової реакції виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми Differential expression calculator, а статистичну обробку результатів у програмі Excel. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Дослідження впливу наночастинок срібла на експресію циркадіальних генів було проведено методами полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих зворотною транскрипцією мРНК, у головному мозку щурів за дії на організм наночастинок срібла протягом 1, 3 та 14 днів. Результати проведених досліджень (рис. 1, 2) вказують на те, що під впливом наночастинок срібла порушується експресія генів Per1 та Per2 у головному мозку щурів уже через одну добу після вве-

дення тваринам наночастинок срібла. Більш виражене посилення експресії було виявлено в головному мозку для мРНК циркадіального гена *Per1* (на 83%), водночас експресія мРНК *Per2* посилювалася лише на 37%. Через три дні після введення тваринам наночастинок срібла експресія мРНК *Per1* у головному мозку істотно знижувалася, але потім знову підвищувалася на 14-й день на 59% порівняно з контрольними щурами (рис. 2). Водночас експресія мРНК циркадіального гена *Per2* у головному мозку продовжувала зростати і на 3-й (на 78%), і на 14-й день (на 175%), якщо порівнювати з контрольними щурами.

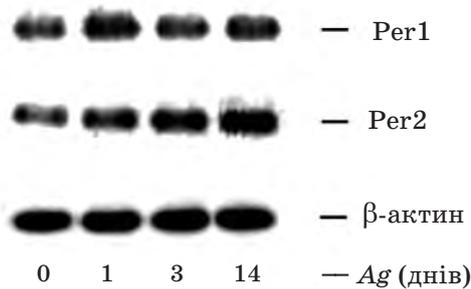


Рис. 1. Вплив наночастинок срібла (Ag; 20 мг/кг маси тіла) на експресію мРНК *Per1* та *Per2* у головному мозку щурів, за даними полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, отриманих методом зворотної транскрипції.

Дослідження проводили через 1, 3 та 14 днів після введення наночастинок срібла (Ag); 0 — контрольні тварини. Експресію мРНК β -актину досліджували як контроль кількості аналізованої РНК

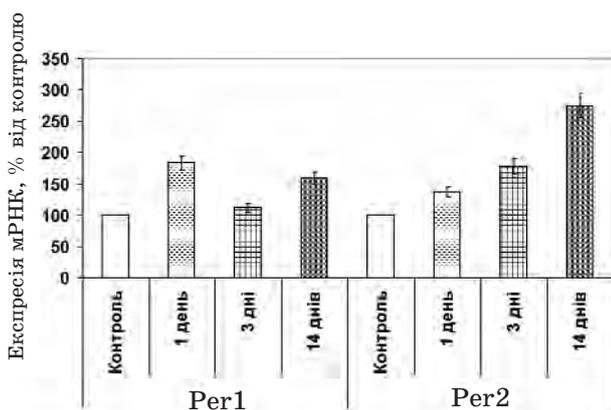


Рис. 2. Експресія мРНК *Per1* та *Per2* методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у головному мозку щурів через 1, 3 та 14 днів після введення наночастинок срібла (Ag).

Експресію мРНК *Per1* та *Per2* нормалізували за β -актином і виражали в процентах від контролю (100%)

Як впливає з даних, наведених на рис. 3 й 4, експресія мРНК *BMal1* та *Clock* у головному мозку також суттєво змінювалась уже через один день після введення тваринам наночастинок срібла: експресія мРНК *BMal1* посилювалася на 81%, а *Clock* — знижувалася майже вдвічі. Показано також, що на 3-й день після введення щурам наночастинок срібла експресія мРНК *BMal1* не змінювалася порівняно з першим днем, але на 14-й зростала утричі порівняно з контрольними тваринами. Водночас експресія мРНК циркадіального гена *Clock* у головному мозку залишалася зниженою практично на рівні першого дня дії наночастинок срібла (рис. 4).

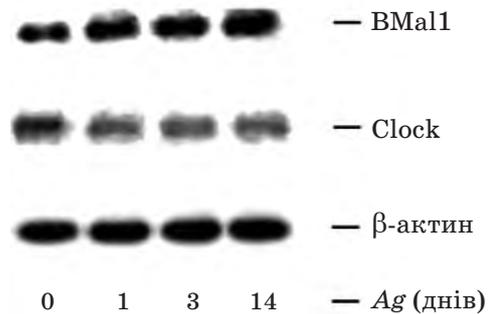


Рис. 3. Вплив наночастинок срібла (Ag; 20 мг/кг маси тіла) на експресію мРНК *BMal1* та *Clock* у головному мозку щурів за даними полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих методом зворотної транскрипції.

Дослідження проводили через 1, 3 та 14 днів після введення тваринам наночастинок срібла (Ag); 0 — контрольні тварини. Експресію мРНК β -актину досліджували як контроль кількості аналізованої РНК

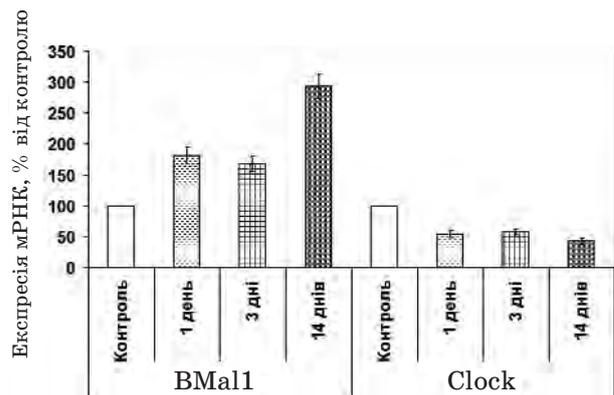


Рис. 4. Аналіз впливу наночастинок срібла на експресію мРНК *BMal1* та *Clock* у головному мозку щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Дослідження проводили через 1, 3 та 14 днів після введення наночастинок срібла (Ag); 0 — контрольні тварини. Експресію мРНК *BMal1* та *Clock* нормалізували за β -актином і виражали в процентах від контролю (100%)

Під час дослідження впливу наночастинок срібла на експресію казеїнкінази-1ε було показано, що через один день після введення їх щурам спостерігаються суттєві зміни в експресії цього гена в головному мозку, однак на 3-й день було виявлено зниження експресії казеїнкінази-1ε з наступним підвищенням на 14-й день (рис. 5, 6). Характер змін в експресії мРНК казеїнкінази-1ε дуже подібний до змін в експресії мРНК циркадіального гена *Per1*.

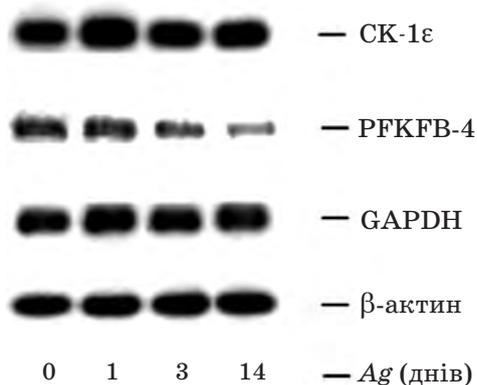


Рис. 5. Вплив наночастинок срібла (Ag; 20 мг/кг маси тіла) на експресію мРНК казеїнкінази-1ε (СК-1ε), 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 (PFKFB-4) та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) у головному мозку щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих методом зворотної транскрипції.

Дослідження проводили через 1, 3 та 14 днів після введення наночастинок срібла (Ag); 0 — контрольні тварини. Експресію мРНК β-актину досліджували як контроль кількості аналізованої РНК

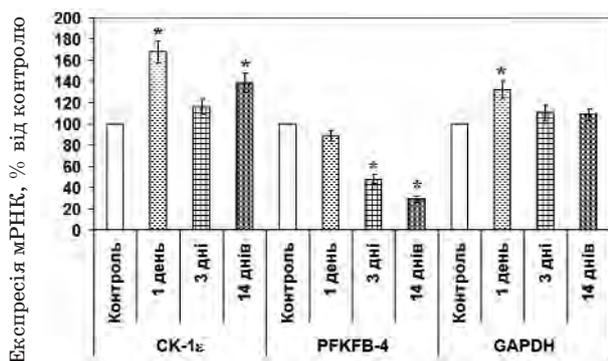


Рис. 6. Аналіз впливу наночастинок срібла на експресію мРНК казеїнкінази-1ε (СК-1ε), PFKFB-4 та GAPDH у головному мозку щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Дослідження проводили через 1, 3 та 14 днів після введення наночастинок срібла (Ag);

0 — контрольні тварини. Експресію мРНК СК-1ε, PFKFB-4 та GAPDH нормалізували за β-актином і виражали в процентах від контролю (100%)

Результати даної роботи переконливо свідчать про виражену дію наночастинок срібла на експресію різних циркадіальних генів у головному мозку, але різні гени змінюються по-різному, що може бути одним із чинників порушення сигнальних каскадів у клітинах цих органів та контрольованих ними метаболічних процесів. З огляду на це ми дослідили експресію залежних від гіпоксії генів PFKFB-4 — одного із ключових ензимів регуляції гліколізу, та GAPDH. З'ясовано, що експресія мРНК PFKFB-4 у головному мозку щурів також знижувалась під впливом наночастинок срібла, проте лише через 3 дні (вдвічі) та 14 днів (у три рази) після їх введення тваринам, тимчасом як експресія мРНК GAPDH, навпаки, посилювалась (на 32%), але лише через один день після введення цих наночастинок (рис. 5, 6). Отримані результати вказують на те, що наночастинок срібла, впливаючи на центральні ланцюги системи регуляції обміну речовин, можуть порушувати метаболізм у клітинах організму. Це може відбуватися через вплив наночастинок срібла на експресію низки циркадіальних генів, які контролюють перебіг важливих метаболічних процесів в організмі.

Принципово нові дані щодо впливу наночастинок срібла на організм на рівні експресії генів ключових регуляторних факторів слугуватимуть фундаментом для подальших наукових досліджень молекулярних механізмів можливої токсичної дії наночастинок срібла та інших екологічно небезпечних сполук, а також для пошуку шляхів нейтралізації їх негативного впливу на організм. Проведені нами дослідження розкривають молекулярні основи дії на організм нанотехнологічних матеріалів, їх можливу екологічну небезпеку на рівні регуляції метаболічних процесів, що сприятиме розробленню принципово нових молекулярних підходів до їх виявлення та профілактики.

Таким чином, нами встановлено, що експресія мРНК *Per1*, *Per2*, *BMal1* та казеїнкінази-1ε суттєво посилюється у головному мозку щурів у разі дії на організм наночастинок срібла, причому їх вплив є максимальним уже через добу після введення для *Per1* та казеїнкінази-1ε, а для *Per2* і *BMal1* посилюється з часом, досягаючи максимальних значень через 14 днів після введення.

Виявлено зниження експресії мРНК *Clock* у головному мозку щурів через 1, 3 та 14 днів після введення тваринам наночастинок срібла, але максимальний ефект спо-

стерігався через 14 днів. Експресія мРНК PFKFB-4 у головному мозку щурів також знижувалась, однак лише через 3 та 14 днів після введення тваринам наночастинок срібла, тимчасом як експресія мРНК GAPDH, навпаки, посилювалась, проте тільки через один день після введення цих наночастинок.

Експресія циркадіальних генів Per1, Per2, Bmal1, Clock та казеїнкінази-1ε може бути чутливим показником впливу на організм наноматеріалів, зокрема наночастинок срібла.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Gonze D., Goldbeter A.* Circadian rhythms and molecular noise // *Chaos*. — 2006. — V. 16, N 2. — P. 1–11.
2. *Harmer S. L., Panda S., Kay S. A.* Molecular bases of circadian rhythms // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 2001. — V. 17. — P. 215–253.
3. *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. — V. 83, N 9. — P. 693–699.
4. *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, N 2. — P. 140–150.
5. *Kovac J., Husse J., Oster H.* A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock // *Mol. Cell*. — 2009. — V. 28, N 2. — P. 75–80.
6. *Turek F. W., Joshu C., Kohsaka A. et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice // *Science*. — 2005. — V. 308, N 5724. — P. 1043–1045.
7. *Rudic 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, N 11. — P. E377.
8. *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. — V. 386, PT 3. — P. 575–581.
9. *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, N 5. — P. 783–792.
10. *Pfeffer M., Muller C. M., Mordel J. et al.* The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components // *J. Neurosci.* — 2009. — V. 29, N 19. — P. 6114–6123.
11. *Ando H., Ushijima K., Kumazaki M. et al.* Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* — 2010. — V. 65, N 1. — P. 9–13.
12. *Lee H., Chen R., Lee Y. et al.* Essential roles of CKIdelta and CKIepsilon in the mammalian circadian clock // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — V. 106, N 50. — P. 21359–21364.
13. *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, N 29. — P. 26863–26872.
14. *Eide E. J., Vielhaber E. L., Hinz W. A., Virshup D. M.* The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon // *Ibid.* — 2002. — V. 277, N 19. — P. 17248–17254.
15. *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, N 6. — P. 1693–1703.
16. *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.
17. *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. USA*. — 2002. — V. 99, N 3. — P. 1182–1187.
18. *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, N 3. — P. 601–611.
19. *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 kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs // *Oncogene*. — 1997. — V. 15, N 14. — P. 1727–1736.
20. *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. — V. 78, N 14. — P. 1624–1629.

21. Zhao B., Li L., Tumaneng K. et al. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP) // *Genes Dev.* — 2010. — V. 24, N 1. — P. 72–85.
22. 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, N 13. — P. 4888–4899.
23. Eide E. J., Woolf M. F., Kang H. et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // *Ibid.* — 2005. — V. 25, N 7. — P. 2795–2807.
24. 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, N 1. — P. 47–60.
25. 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, N 7. — P. 1241–1246.
26. 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, N 10. — P. 797–800.
27. Lee C. C. The circadian clock and tumor suppression by Mammalian period genes // *Meth. Enzymol.* — 2005. — V. 393. — P. 852–861.
28. Zhu Y., Stevens R. G., Hoffman A. E. et al. Testing the circadian gene hypothesis in prostate cancer: a population-based case-control study // *Cancer Res.* — 2009. — V. 69, N 24. — P. 9315–9322.
29. 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, N 1. — P. 111–120.
30. Taniguchi H., Fernandez A. F., Setien F. et al. Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies // *Cancer Res.* — 2009. — V. 69, N 21. — P. 8447–8454.
31. Woon P. Y., Kaisaki P. J., Braganca J. et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, N 36. — P. 14412–14417.
32. Chen R., Schirmer A., Lee Y. et al. Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism // *Mol. Cell.* — 2009. — V. 36, N 3. — P. 417–430.
33. Sato T. K., Yamada R. G., Ukai H. et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function // *Nat. Genet.* — 2006. — V. 38, N 3. — P. 312–319.
34. Sasaki M., Yoshitane H., Du N. H. et al. Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription // *J. Biol. Chem.* — 2009. — V. 284, N 37. — P. 25149–25159.
35. Мінченко О. Г., Яворовський О. П., Паутовський Ю. О. та ін. Циркадіальні гени як чутливі маркери біонебезпеки // *Здоров'я та довкілля.* — 2009. — Т. 48, № 1. — С. 10–17.
36. Ji J. H., Jung J. H., Kim S. S. et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats // *Inhalat. Toxicol.* — 2007. — V. 19, N 10. — P. 857–871.
37. Griffitt R. J., Hyndman K., Denslow N. D. et al. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles // *Toxicol. Sciences.* — 2009. — V. 107, N 2. — P. 404–415.
38. Chen D., Xi T., Bai J. Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study // *Biomed. Mater.* — 2007. — V. 2, N 3. — P. S126–S128.
39. Lubick N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? // *Environ. Sci. Technol.* — 2008. — V. 42, N 23. — P. 8617.
40. Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J. The present and future of nanotechnology in human health care // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* — 2007. — V. 3, N 1. — P. 20–31.
41. 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, N 1. — P. 14–20.

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА
НА ЭКСПРЕССИЮ ЦИРКАДИАЛЬНЫХ
ГЕНОВ И 6-ФОСФОФРУКТО-2-КИНАЗЫ/
ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ-4
В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС**

*Д. А. Минченко^{1,2}
И. В. Божко¹
Т. А. Зинченко^{1,2}
В. Г. Михальченко¹
А. П. Яворовский²
А. Г. Минченко¹*

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Национальный медицинский университет
им. А. А. Богомольца, Киев

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Протекание физиологических и биохимических процессов в организме имеет циркадиальный характер, а нарушение механизмов их регуляции — одна из причин возникновения некоторых патологических процессов, в том числе и образования злокачественных опухолей. Наиболее важными генами, которые регулируют протекание циркадиальных процессов в организме как в норме, так и при патологических состояниях, являются гены циркадиальных факторов Per1, Per2, Clock и BMal1, а также казеинкиназа-1ε, контролирующая экспрессию этих циркадиальных генов. Полученные нами данные показали, что под влиянием наночастиц серебра происходят нарушения экспрессии генов казеинкиназы-1ε, BMal1, Per1, Per2 и Clock, а также 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-4 (PFKFB-4) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) в головном мозге крыс, причем экспрессия одних генов усиливается, а других — снижается. Установлено, что изменения в экспрессии циркадиальных генов и казеинкиназы-1ε выявляются уже через один день после введения животным наночастиц серебра, а через 3 и 14 дней в большинстве случаев становятся более выраженными. Нарушения экспрессии циркадиальных генов и казеинкиназы-1ε могут инициировать расстройства в функционировании сигнальных каскадов в клетках головного мозга и нарушать регуляцию метаболических процессов и на периферии. Результаты этой работы свидетельствуют о влиянии наночастиц серебра на важные ключевые механизмы регуляции метаболических процессов в клетках головного мозга на уровне экспрессии циркадиальных генов.

Ключевые слова: наночастицы серебра, экспрессия генов, казеинкиназа-1ε, Per1, Per2, Clock, BMal1, PFKFB-4, головной мозг, крысы.

**EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES
ON THE EXPRESSION OF CIRCADIAN
GENES AND 6- PHOSPHOFRUCTO-2-
KINASE/ FRUCTOSE-2,6-BISPHOS-
PHATASE-4 IN RAT BRAIN**

*D. O. Minchenko^{1,2}
I. V. Bozhko¹
T. O. Zinchenko^{1,2}
V. G. Mykhalchenko¹
O. P. Yavorovsky²
O. G. Minchenko¹*

¹Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National O.O. Bogomoletz Medical University,
Kyiv

E-mail: ominchenko@yahoo.com

Physiological and biochemical processes in organisms are circadian. Disturbance of regulation of circadian processes leads to developing of different pathology and cancer in particular. The genes of circadian factors Per1, Per2, Clock and BMal1 as well as casein kinase-1ε are important regulators which control these processes in normal and pathological conditions. We have shown that the expression of casein kinase-1ε, BMal1, Per1, Per2 and Clock as well as 6-phosphofruco-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase-4 (PFKFB-4) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes significantly destroyed in the brain of rats treated with silver nanoparticles: expression of some genes increased, but other — decreased. It was shown that changes in the expression of circadian genes and casein kinase-1ε were observed in a day after treatment of rats with silver nanoparticles but in 3 and 14 days these changes were more expressed. Disturbance of casein kinase-1ε and circadian genes expression could destroy the cellular signal pathways in brain and lead to developing of pathological processes. Results of this investigation demonstrated that silver nanoparticles had significant effect on important regulatory mechanisms controlling metabolic processes in brain cells via circadian gene expression. Expression of circadian genes could be possible a sensitive test for detection of silver nanoparticles action on the organisms.

Key words: silver nanoparticles, gene expression, casein kinase-1ε, Per1, Per2, Clock, BMal1, PFKFB-4, brain, rats.