



УДК 577.112.7:616

## **ЗМІНИ У РІВНІ ЕКСПРЕСІЇ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ Per1, Clock і BMal1 У ПЕЧІНЦІ, ЛЕГЕНІ, СІМ'ЯНИКУ, НИРЦІ ТА СЕРЦІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НАНОЧАСТОК СРІБЛА**

**Д. О. Мінченко<sup>1,2</sup>, І. В. Божко<sup>1</sup>, Т. О. Зінченко<sup>1,2</sup>, О. П. Яворовський<sup>2</sup>, О. Г. Мінченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна  
e-mail: [ominchenko@yahoo.com](mailto:ominchenko@yahoo.com)

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця,  
бульв. Шевченка, 13, Київ 01601, Україна

Перебіг більшості фізіологічних і біохімічних процесів в організмі має циркадіальний характер, а порушення механізмів їхньої регуляції є одною із причин виникнення багатьох патологічних процесів, у тому числі й утворення злоякісних пухлин. У даній роботі дослідили вплив наночастинок срібла на рівень експресії найбільш важливих генів, що регулюють перебіг в організмі циркадіальних процесів: Per1, Clock і BMal1, білкові продукти яких є компонентами циркадіального годинника. Одержані дані показали, що під впливом наночастинок срібла зростає рівень експресії Per1 у печінці та легені і пригнічується у сім'янику. Рівень експресії мРНК Clock також посилюється у печінці та легені під впливом наночастинок срібла, а пригнічується у нирці. У той же час, у сім'янику та серці пригнічення експресії мРНК Clock виявлено лише на більш пізніх термінах дії наночастинок срібла. Таким чином, при дії на організм наночастинок срібла порушується експресія генів Per1, Clock та BMal1 у різних органах щурів. Це може спричинювати розлади у функціонуванні сигнальних каскадів у клітинах і сприяти розвитку патологічних станів. Вплив наночастинок срібла на ключові механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії ряду циркадіальних генів може слугувати важливим чутливим показником дії на організм наночастинок срібла.

**Ключові слова:** Per1, Clock, BMal1, наночастки срібла, печінка, легеня, сім'яник, щур.

Поведінка більшості живих організмів, як і перебіг у них фізіологічних і біохімічних процесів, автономно коливаються з періодом, близьким до 24 год. Ці коливання пов'язані зі зміною дня та ночі й називаються циркадіальними ритмами, а генеруються вони у гіпоталамусі на молекулярному рівні так званім циркадіальним годинником, причому більшість основних фізіологічних і метаболічних процесів в організмі має циклічний характер [1–4]. Контролюються вони циркадіальними генами (Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock та BMal1), які кодують синтез важливих регуля-

торних і транскрипційних факторів та експресія й активність яких, у свою чергу, контролюються казеїнкіназою-1 $\epsilon$  [5–7]. Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1 $\epsilon$  фосфорилує циркадіальні фактори Per1, Per2 та Per3, що суттєво змінює функціонування генів, які контролюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, Mdm-2, c-myc і Gadd45 $\alpha$ ) та ряду онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин, що вона також бере участь у дестабілізації  $\beta$ -катенін-деградуючого комплексу, у функціонуванні TGF- $\beta$  сигнального каскаду, в інактивації білка *bid*, задіяного в регуляції апоптозу, через його розщеплення каспазою 8, фосфорилує білок p53.

Білкові продукти циркадіальних генів є ключовими факторами регуляції метаболізму як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах [4, 5, 8]. Порушення в регуляції експресії циркадіальних генів виявлені при ряді захворювань і можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [8, 9]. Циркадіальні гени щоденно змінюють циркадіальні ритми різноманітних фізіологічних та біохімічних процесів, як і поведінку організмів, що є наслідком ритмічних щоденних змін в експресії самих циркадіальних генів і що було чітко показано для генів Per1, Per2 та Cry2. 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 [3]. Циркадіальний характер експресії самих циркадіальних генів контролюється, головним чином, світловими променями як на рівні гіпоталамусу, так і на рівні різних окремих клітин організму [1, 3].

Було встановлено, що регуляція метаболізму факторами циркадіального годинника включає в себе постійний взаємозв'язок між регулюючою системою і метаболічними шляхами [4, 6]. Крім того, для циркадіальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції: казеїнкіназа-1 $\epsilon$  зв'язується з Per2, а потім з Cry та комплексом Clock:BMal1, створюючи негативну регуляторну петлю [10, 13, 14].

Раніше нами було показано, що експресія казеїнкінази-1 $\epsilon$  та циркадіальних генів у ряді життєво важливих органів може бути чутливим маркером впливу на організм екологічно токсичних речовин, зокрема метил-третбутилового ефіру [15]. Дані літератури свідчать, що токсичними є також і наночастки срібла, які, поряд з іншими наноматеріалами, знаходять застосування і у медицині. Відомо, що токсичність наночасток срібла є більшою, порівняно з макроскопічними дисперсіями срібла, що, можливо, пов'язано з їхніми фізико-хімічними характеристиками, здатністю наночасток безперешкодно проникати через біологічні бар'єри організму [16–18]. Дослідження токсичності наночасток срібла показали, що під їх впливом зростає частота загибелі ембріонів. Деякі автори вважають, що наночастки 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 включає власне наночастки срібла (до 30%). При різних технологічних операціях концентрація аерозолю коливається, але 98% матричного пилу належить до респірабельної фракції, тобто існує реальна можливість надходження певної кількості наночасток 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 наночасток срібла розміром від 20 до 65 нм у різних концентраціях при витримуванні тварин у камері протягом

6 год (п'ять разів на тиждень упродовж 28 днів), але суттєвих змін у досліджених біохімічних показниках крові в цих експериментах не було виявлено [16].

Отже, 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 нового антропогенного чинника наночастинок срібла на живі організми на рівні експресії циркадіальних генів *Per1*, *Clock* та *BMal1*, що відіграють важливу регуляторну роль у багатьох метаболічних процесах в організмі. Для цього досліджували експресію цих генів у печінці, легені, міокарді, нирці та сім'янику щурів за дії на організм наночастинок срібла [11].

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Wistar, вагою 230–240 грамів. У дослідженні використовували наночастки срібла у 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 частки срібла мають переважно сферичну форму і розміри 28–30 нм. Наночастки срібла вводили тваринам інтратрахеально у 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.** Тотальну РНК виділяли із печінки, легені, серця, нирки та сім'яника щурів за допомогою реагента Trizol (Invitrogen, USA) згідно з протоколом виробника, як описано раніше [19]. РНК осаджували рівним об'ємом 2-пропанолу. Осад РНК промивали двічі 75% етанолом і розчиняли у воді, що не містить рибонуклеаз.

**Аналіз рівня експресії мРНК *Per1*, *Clock* та *BMal1*.** Рівень експресії мРНК *Per1*, *Clock* та *BMal1* досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК (кДНК), отриманих шляхом зворотної транскрипції матричних РНК, а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Тотальну РНК із різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу кДНК за допомогою оліго(dT) праймера та SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) згідно з протоколом виробника. Для ампліфікації кДНК *Per1*, *Clock* та *BMal1* використовували HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина), специфічні для цих генів щурів пари праймерів і „MasterCycler Personal” („Eppendorf”, Німеччина).

Для ампліфікації кДНК *Per1* використовували такі праймери: прямий – 5'–ТСТС-ТТСТСАГААСТGGATG–3' та зворотний 5'–GGAAGCCTCTCATTAGACTGC–3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 3699–3718 та 3983–3963, відповідно, в мРНК *Per1* щура (GenBank номер NM\_001034125). Для ампліфікації кДНК *Clock* було використано прямий (5'–TGACACAGTCAGATGCTAGTG–3') та зворотний (5'–TGATCCACAAGATCAGATGG –3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264–283 та 792–772 у послідовності мРНК *Clock* щура (GenBank номер NM\_021856). Для ампліфікації кДНК *BMal1* були використані прямий (5'–TGACCCTCATGGAAGGTTAG–3') та зворотний (5'–AATCCATCTGCTGCCCTGAG–3') праймери, нуклеотидні залишки яких відповідають залишкам нуклеотидів 753–772 та 1042–1061 у послідовності мРНК

VMa1 шкура (GenBank номер NM\_024362). Ці пари праймерів було використано також для ампліфікації генів *Per1*, *Clock* і *VMa1* при дослідженні їх експресії методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Для контролю кількості аналізованої РНК досліджували експресією мРНК  $\beta$ -актину. Рівень експресії кожної смуги кДНК казеїнкінази-1 $\epsilon$  та *Per2* порівнювали з рівнем з експресії мРНК  $\beta$ -актину.

Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом у 2% гелі агарози, забарвлюючи кДНК етидію бромідом. Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на „Stratagene Mx 3000P cyclet”, використовуючи „SYBRGreen Mix”, США. Аналіз результатів кількісної полімеразної ланцюгової реакції виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми „Differential expression calculator”, а статистичну обробку результатів – в Excel програмі. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

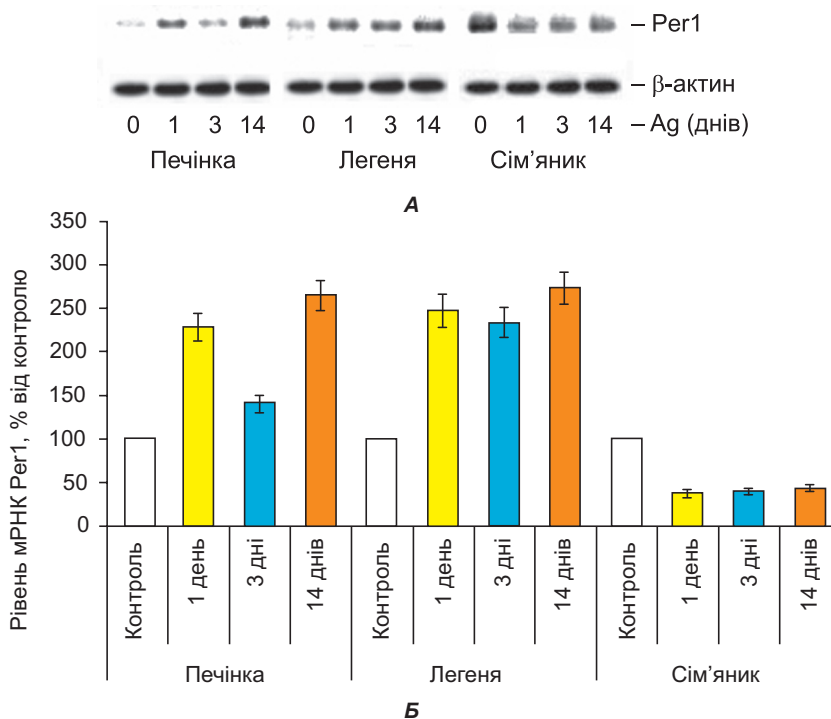
Вплив наночасток срібла на експресію циркадіальних генів вивчали за допомогою методів полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих зворотною транскрипцією мРНК. Останню з тканин печінки, легені, серця, нирки та сім'яника за дії на організм щурів наночасток срібла протягом 1, 3 та 14 днів. Результати досліджень представлено на рис. 1, А та 1, Б. Вони вказують, що експресія гена *Per1* у печінці, легені та сім'янику щурів порушується вже через одну добу після введення тваринам наночасток срібла. Найбільш виражене підвищення рівня експресії мРНК циркадіального гена *Per1* під впливом наночасток срібла виявлено у легенях (у 2,5 разу). У печінці рівень експресії мРНК цього циркадіального гена також суттєво зростає (у 2,3 разу) вже через один день після введення тваринам наночасток срібла, у той час як у сім'янику, навпаки, він знижувався майже у три рази (рис. 1, Б). На третій день дії наночасток срібла рівень експресії мРНК *Per1* у легені та сім'янику залишався майже таким же, як і після першого дня, а у печінці – суттєво знижувався. Дослідження характеру зміни експресії мРНК циркадіального гена *Per1* на 14-й день після введення тваринам наночасток срібла показало, що у печінці та легені ефект цих наночасток був значно більшим порівняно з 1-м та 3-м днями, а у сім'янику залишався зниженим, як і у попередні дні.

Як видно із даних, представлених на рис. 2, А та 2, Б, рівень експресії мРНК *Clock* також суттєво змінювався уже через один день після введення тваринам наночасток срібла, посилюючись у печінці та легені на 42 та 50%, відповідно, і знижуючись майже вдвічі у нирці. В той же час у сім'янику істотних змін у рівні експресії мРНК *Clock* не виявлено ні через один, ні через три дні після введення щурам наночасток срібла. Поряд із тим, на 14-й день дії цих наночасток спостерігалось суттєве пригнічення експресії даного гена як у сім'янику, так і у нирці та серці (рис. 2, Б та 4). Із даних, представлених на рис. 2, Б, також видно, що рівень експресії мРНК *Clock* у печінці та легені ще більше посилюється на 3-й день після введення тваринам наночасток срібла, порівняно з першим днем, але потім, на 14-й день, істотно не змінюється у легені і суттєво знижується у печінці.

Оскільки стимулювальний ефект наночасток срібла на експресію мРНК *Per1* та *Clock* був найбільш вираженим у легені в усі досліджувані періоди дії наночасток срібла, ми дослідили характер рівня експресії мРНК *VMa1* лише у легені щурів через 1, 3 та 14 днів після введення наночасток срібла. Із представлених на рис. 4 і 5 даних видно, що рівень експресії мРНК *VMa1* у легені також посилюється

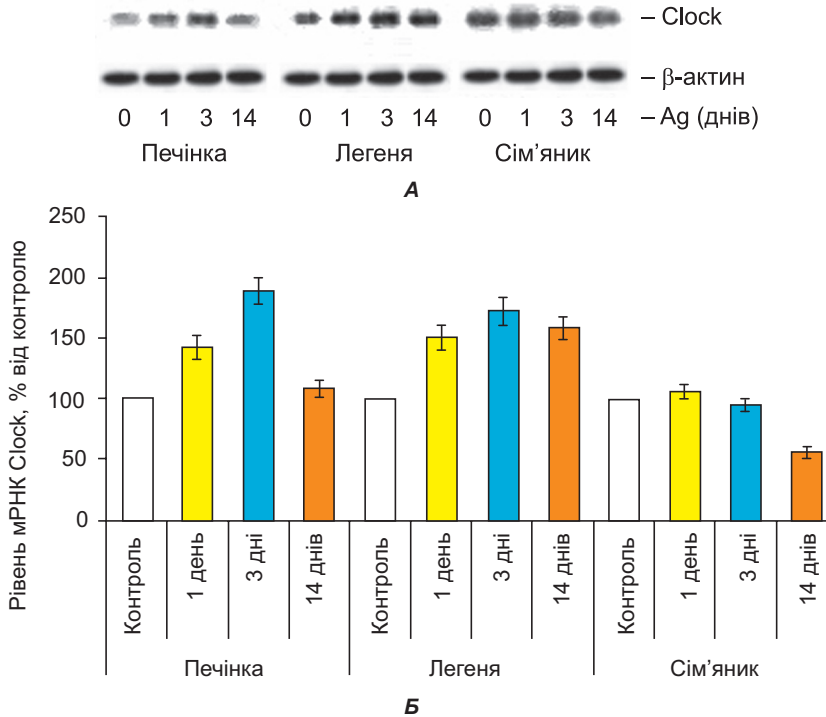
(на 39 і 36% через 1 та 3 дні після введення тваринам наночастинок срібла), на 14-й день виявлено різке зростання (майже у чотири рази) рівня експресії даної мРНК.

Результати проведеної роботи переконливо свідчать про виражену дію наночастинок срібла на характер експресії різних циркадіальних генів у таких життєво важливих органах, як печінка, легеня, сім'яник, нирка та серце. Цей ефект був тканино-специфічними, що може бути одним із факторів порушення сигнальних каскадів у клітинах цих органів та розвитку патологічних станів. Такі результати вказують на те, що наночастки срібла, впливаючи на центральні ланцюги системи регуляції обміну речовин, можуть порушувати метаболізм у клітинах організму. Це може відбуватися, зокрема, шляхом впливу наночастинок срібла на експресію ряду циркадіальних генів, які контролюють перебіг важливих метаболічних процесів в організмі. Раніше було встановлено, що під впливом метил-третбутилового ефіру у різних органах щурів також спостерігаються різнонаправлені зміни в експресії



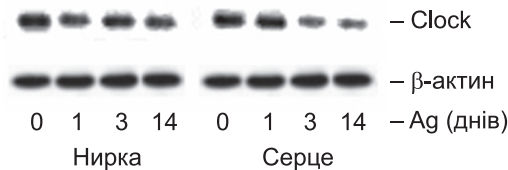
**Рис. 1.** Вплив наночастинок срібла на експресію мРНК Per1 у печінці, легені та сім'янику щурів за даними: **А** – полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, отриманих зворотною транскрипцією РНК, де 0 – контрольні тварини, а 1, 3 та 14 – дні після введення щурам наночастинок срібла; **Б** – методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), де 1, 3 та 14 – також дні після введення тваринам наночастинок срібла. Експресію мРНК Per1 нормалізували за експресією мРНК  $\beta$ -актину і виражали у процентах від контролю (100%); \* –  $P < 0,05$

**Fig. 1.** Effect of silver nanoparticles on the expression of Per1 mRNA in the rat liver, lung and testis measured using: **A** – polymerase chain reaction of complementary DNA received by reverse transcription of RNA, where 0 – control animals and 1, 3 or 14 – days after treatment of rats with silver nanoparticles. **B** – quantitative polymerase chain reaction (real time), where 1, 3 and 14 – days after treatment. Expression of Per1 mRNA was normalized using  $\beta$ -actin mRNA expression and expressed as % of control (100%); \* –  $P < 0,05$



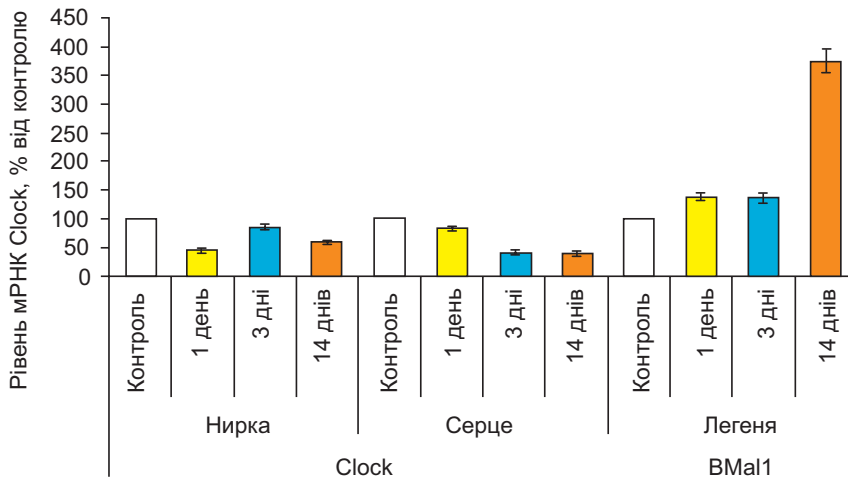
**Рис. 2.** Вплив наночастинок срібла на експресію мРНК Clock у печінці, легені та сім'янику щурів за даними: **А** – полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, отриманих зворотною транскрипцією РНК, де 0 – контрольні тварини, а 1, 3 та 14 – дні після введення щурам наночастинок срібла; **Б** – методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), де 1, 3 та 14 – також дні після введення тваринам наночастинок срібла. Експресію мРНК Clock нормалізували за експресією мРНК β-актину і виражали у процентах від контролю (100%); \* –  $P < 0,05$

**Fig. 2.** Effect of silver nanoparticles on the expression of Clock mRNA in the rat liver, lung and testis measured using: **A** – polymerase chain reaction of complementary DNA received by reverse transcription of RNA, where 0 – control animals and 1, 3 or 14 – days after treatment of rats with silver nanoparticles. **B** – quantitative polymerase chain reaction (real time), where 1, 3 and 14 – days after treatment. Expression of Clock mRNA was normalized using β-actin mRNA expression and expressed as % of control (100%); \* –  $P < 0,05$



**Рис. 3.** Вплив наночастинок срібла на експресію мРНК Clock у нирці та серці щурів, яку досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, отриманих зворотною транскрипцією РНК: 0 – контрольні тварини, 1, 3 та 14 – дні після введення щурам наночастинок срібла. Для контролю кількості РНК, взятої для проведення досліджень, у нирках та серці досліджували експресію мРНК β-актину

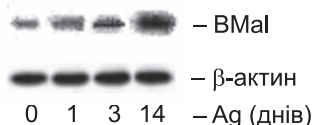
**Fig. 3.** Effect of silver nanoparticles on the expression of Clock mRNA in the rat kidney and heart measured by polymerase chain reaction of complementary DNA received by RNA reverse transcription: 0 – control animals, 1, 3 and 14 – days after treatment of rats with silver nanoparticles. Expression of β-actin mRNA was studied for quantity control of tested RNA in the rat kidney and heart



**Рис. 4.** Зміни в експресії мРНК Clock та BMal1 через 1, 3 та 14 днів після введення щурам наночастинок срібла за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію мРНК Clock і BMal1 нормалізували за експресією мРНК β-актину і виражали у процентах від контролю (100%); \* – P < 0,05

**Fig. 4.** Changes in the expression of Clock and BMal1 mRNA after treatment of rats with silver nanoparticles measured by quantitative polymerase chain reaction. Effect of silver nanoparticles was studied in 1, 3 and 14 days after treatment. Expression of Clock and BMal1 mRNA was normalized using β-actin mRNA expression and expressed as % from control (100%); \* – P < 0,05

**Рис. 5.** Вплив наночастинок срібла на експресію мРНК BMal1 у легенях щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих зворотною транскрипцією РНК: 0 – контрольні тварини, 1, 3 та 14 – дні після введення тваринам наночастинок срібла. Експресія мРНК β-актину досліджувалась як контроль кількості РНК, взятої для проведення досліджень



**Fig. 5.** Effect of silver nanoparticles on the expression of BMal1 mRNA in the rat lung measured by polymerase chain reaction of cDNA received by RNA reverse transcription: 0 – control animals, 1, 3 and 14 – days after treatment of rats with silver nanoparticles. Expression of β-actin mRNA was studied for quantity control of tested RNA

деяких циркадіальних генів [20]. Стосовно органоспецифічності змін в експресії деяких циркадіальних генів, їх різнонаправленості, можна припустити, що це обумовлено або різним рівнем чутливості органів до їх дії, або особливостями накопичення наночастинок у різних органах, але для вирішення даного припущення потрібні подальші детальні дослідження. Відомо, що наночастишки золота акумулюються переважно у певних органах щурів [21].

Ми припускаємо, що найбільш вірогідний механізм дії наночастинок срібла на внутрішньоклітинні процеси відбувається на рівні стресу ендоплазматичного ретикулуму, відомого як UPR (unfolding protein response), що супроводжується порушенням процесів фолдингу білків в ендоплазматичному ретикулумі й активацією внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, головним чином, через мембранний сигнальний білок – залежний від інозитулу ензим-1альфа (IRE-1альфа), який має

кіназну й ендорибонуклеазну активності та контролює експресію сотень генів [22, 23]. Він активується при ішемії, а також при дії хімічних чинників (зокрема, таких, як дитіотрейтол і тунікаміцин), але ще майже нічого не відомо щодо специфічності реакції даного сигнального каскаду на той чи інший чинник [22, 24].

Нові дані щодо впливу наночасток срібла на організм на рівні експресії генів ключових регуляторних факторів є початком подальших наукових досліджень молекулярних механізмів токсичної дії наночасток срібла та ряду інших екологічно небезпечних сполук, а також пошуку шляхів нейтралізації їхніх негативних впливів на організм. Проведені нами дослідження розкривають деякі молекулярні основи дії на організм нанотехнологічних матеріалів, їхню можливу екологічну небезпеку на рівні регуляції метаболічних процесів і будуть сприяти розробці принципово нових молекулярних підходів до їхнього виявлення та профілактики.

1. *Gonze D., Goldbeter A.* Circadian rhythms and molecular noise. **Chaos**, 2006; 16(2): 026110 (1–11).
2. *Tsinkalovsky O., Smaaland R., Rosenlund B.* et al. Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells. **J. of Biological Rhythms**, 2007; 22(2): 140–150.
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. of Molecular Medicine**, 2005; 83(9): 693–699.
4. *Kovac J., Husse J., Oster H.* A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. **Molecules and Cells**, 2009; 28(2): 75–80.
5. *Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A.* et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science**, 2005; 308(5724): 1043–1045.
6. *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 Biology**, 2004; 2(11): E377.
7. *Lee H., Chen R., Lee Y.* et al. Essential roles of CK1delta and CK1epsilon in the mammalian circadian clock. **Proceeding National Academy of Sciences U.S.A.**, 2009; 106(50): 21359–21364.
8. *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 Research**, 2009; 69(24): 9315–9322.
9. *Taniguchi H., Fernandez A.F., Setien F.* et al. Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies. **Cancer Research**, 2009; 69(21): 8447–8454.
10. *Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H.* et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. **Nature Genetics**, 2006; 38(3): 312–319.
11. *Chen R., Schirmer A., Lee Y.* et al. Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism. **Molecular Cell**, 2009; 36(3): 417–430.
12. *Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H.* et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. **Nature Genetics**, 2006; 38(3): 312–319.
13. *Pfeffer M., Muller C.M., Mordel J.* et al. The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components. **J. of Neurosciences**, 2009; 29(19): 6114–6123.
14. *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. **The Journal of Biological Chemistry**, 2009; 284(37): 25149–25159.
15. *Мінченко О.Г., Яворовський О.П., Паустовський Ю.О.* та ін. Циркадіальні гени як чутливі маркери біонебезпеки. **Здоров'я та довкілля**, 2009; №1(48): 10–17.
16. *Ji J.H., Jung J.H., Kim S.S.* et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicology**, 2007; 19(10): 857–871.



17. *Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S.* Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. **Toxicological Sciences**, 2009; 107(2): 404–415.
18. *Lubick N.* Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? **Environment Science Technology**, 2008; 42(23): 8617.
19. *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 Letters**, 2004; 576(1): 14–20.
20. *Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Завгородній І.В.* та ін. Експериментальні дані щодо порушення експресії циркадіальних генів у печінці та легенях як показник токсичної дії метил-третбутилового ефіру на організм. **Укр. журнал з проблем медицини праці**, 2008; № 3(15): 20–26.
21. *Дибкова С.М., Романько М.Є., Грузина Т.Г.* та ін. Визначення ушкоджень ДНК наночастками металів, перспективних для біотехнології. **Біотехнологія**, 2009; 2(3): 80–85.
22. *Hollien J., Lin J.H., Li H.* et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. **Journal of Cellular Biology**, 2009; 186(3): 323–231.
23. *Aragon T., van Anken E., Pincus D.* et al. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. **Nature**, 2009; 457: 736–740.
24. *Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A.* et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. **Nature**, 2009; 457: 687–693.

---

## DISTURBANCE OF THE EXPRESSION OF CIRCADIAN GENES *Per1*, *Clock* AND *BMal1* IN RAT LIVER, LUNG, TESTIS, KIDNEY AND HEART UNDER SILVER NANOPARTICLES ACTION ON ORGANISM

**D. O. Minchenko<sup>1,2</sup>, I. V. Bozhko<sup>1</sup>, T. O. Zinchenko<sup>1,2</sup>, O. P. Yavorovsky<sup>2</sup>, O. H. Minchenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine*

<sup>2</sup>*O.O. Bohomoletz National Medical University, 13, Shevchenko Blvd., Kyiv 01601, Ukraine*

Most of physiological and biochemical processes in living organisms have circadian character. Disturbance of the regulation of circadian processes leads to developing different pathological processes and cancer, in particular. In this work, we have studied the effect of silver nanoparticles on the expression of very important regulatory genes which control the circadian processes: *Per1*, *Clock* and *BMal1*. We have shown that the level of *Per1* expression significantly increased in the liver and lung but decreased in the testes. The level of *Clock* mRNA expression also increased in liver and lung but decreased in kidney. The *Clock* mRNA expression in testis and heart was observed at late period of silver nanoparticles action. Thus, the expression of *Per1*, *Clock* and *BMal1* mRNA significantly changed in tissue specific manner in rats treated with silver nanoparticles. Disturbance of these genes expression can destroy cellular signal pathways and leads to developing pathological processes. The results of our investigation clearly demonstrated that silver nanoparticles have significant effect on the regulatory mechanisms which control cell metabolism via circadian gene expression. Expression of circadian genes can be a sensitive test for the detection of silver nanoparticles action on the organisms.

**Key words:** *Per1*, *Clock*, *BMal1*, silver nanoparticles, liver, lung, testes, rats.

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЦИРКАДИАЛЬНЫХ ГЕНОВ PER1, CLOCK И BMAL1 В ПЕЧЕНИ, ЛЕГКОМ, СЕМЕННИКЕ, ПОЧКЕ И СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Д. А. Минченко<sup>1,2</sup>, И. В. Божко<sup>1</sup>, Т. А. Зинченко<sup>1,2</sup>, А. П. Яворовский<sup>2</sup>, А. Г. Минченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины  
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца,  
бульв. Шевченко, 13, Киев 01601, Украина

Протекание большинства физиологических и биохимических процессов в организме имеет циркадиальный характер, а нарушение механизмов их регуляции является одной из причин возникновения некоторых патологических процессов, в том числе и образования злокачественных опухолей. В данной работе исследовали влияние наночастиц серебра на экспрессию наиболее важных генов, регулирующих протекание в организме циркадиальных процессов: Per1, Clock и Bmal1, белковые продукты которых являются компонентами циркадиальных часов. Полученные данные показали, что под влиянием наночастиц серебра увеличивается уровень экспрессии Per1 в печени и легком и снижается в семеннике. Уровень экспрессии мРНК Clock также увеличивается в печени и легких под влиянием наночастиц серебра, но угнетается в почке. В то же время в семеннике и сердце угнетение экспрессии мРНК Clock было выявлено лишь на более поздних сроках действия этих наночастиц. Таким образом, при действии на организм наночастиц серебра изменяется экспрессия генов Per1, Clock и Bmal1 в разных органах крыс, что может приводить к нарушениям функционирования сигнальных каскадов в клетках и содействовать развитию патологических состояний. Приведенные результаты свидетельствуют о влиянии наночастиц серебра на ключевые механизмы регуляции метаболических процессов в клетках на уровне экспрессии ряда циркадиальных генов, которые могут служить важными чувствительными показателями действия на организм наночастиц серебра.

**Ключевые слова:** Per1, Clock, Bmal1, наночастицы серебра, печень, легкое, семенник, крыса.

Одержано: 03.03.2010