

УДК 577.112.7:616

**ВПЛИВ НАНОЧАСТОК СРІБЛА НА ЕКСПРЕСІЮ SNF1/AMP-АКТИВУЄМОЇ
ПРОТЕЇНКІАЗИ ТА КАЗЕЇНКІАЗИ-1ЕПСІЛОН У РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ**¹Мінченко Д.О., ¹Божко І.В., ^{1,2}Зінченко Т.О., ¹Кузнєцова А.Ю., ³Дуган О.М.,
²Яворовський О.П., ¹Мінченко О.Г.¹Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, Київ, Україна;²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ, Україна;³Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Надійшла до редакції 10.01.2010

Вивчали вплив наночастинок срібла на експресію SNF1/AMP-активуємої протеїнкіази (SNARK) та казеїнкіази-1ε-ієпсілон у різних органах щурів. Встановлено, що експресія мРНК SNARK та казеїнкіази-1ε-ієпсілон суттєво порушується у легенях, головному мозку, печінці, серці, сім'яниках та нирках щурів після одноразового інтратрахеального введення наночастинок срібла, але найбільш виражені зміни в експресії цих генів спостерігалися через 1 або 3 дні після введення цих наночастинок. Результати даної роботи свідчать про можливу дію наночастинок срібла на важливі механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії генів ключових протеїнкіаз, що може призводити до порушення сигнальних каскадів у клітинах та розвитку патологічних станів.

Ключові слова: протеїнкіаза SNARK, казеїнкіаза-1ε-ієпсілон, наночастки срібла, легені, печінка, мозок, щури.

ВСТУП

У кожній клітині організму є мережа регуляторних факторів, яка включає велике число протеїнкіаз, протеїнфосфатаз та транскрипційних факторів і яка контролює основні фізіологічні та метаболічні процеси в організмі, в тому числі і циклічність їх протікання [1 – 7]. Ці фактори є ключовими регуляторами метаболізму як в нормі, так і при різноманітних патологічних станах, причому виявлена ціла група факторів, що відповідальна за циркадальні ритми різноманітних процесів, які генеруються в гіпоталамусі на молекулярному рівні так званім циркадальним годинником і основним компонентом якого є циркадальні гени [8 – 13]. Порушення в регуляції експресії цих регуляторних факторів виявлені при ряді захворювань і можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [14 – 18]. До циркадальних генів відносяться гени *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, криптохроми *Cry1* та *Cry2*, які кодують синтез важливих регуляторних факторів і експресія та активність яких, в свою чергу, контролюються казеїнкіазою-1ε-ієпсілон [19 – 23].

Було встановлено, що казеїнкіаза-1ε-ієпсілон фосфорилує циркадальні фактори, а це приводить до істотних змін у функціонуванні генів, які контролюють цикл поділу клітин та пригнічують ріст пухлин, а також у багатьох інших процесах [1, 14, 21, 22].

Було встановлено, що регуляція метаболізму факторами циркадального годинника включає в себе

постійний взаємозв'язок між регулюючою системою і метаболічними шляхами [8, 10]. Більше того, для циркадальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції: казеїнкіаза-1ε-ієпсілон зв'язується з транскрипційним фактором *Per2*, а потім з *Cry1* та комплексом *Clock* : *Bmal1*, створюючи негативну регуляторну петлю, що надзвичайно важливо для точної і чіткої роботи циркадального годинника [23 – 25].

Протеїнкіаза SNF1, що активується AMP (SNARK) є представником AMPK кіназ, що відносяться до серин/треонінових протеїнкіаз [26]. Відомо, що активність протеїнкіази 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 [26 – 28]. Недавно було показано, що SNARK локалізується в ядрах клітин і має відношення до регуляції експресії генів на рівні геному [29]. Миші, нокаутні по протеїнкіази SNARK, характеризуються ожирінням, відповідними порушенням метаболізму і мають схильність до виникнення злоякісних пухлин подібно до тварин, нокаутних по циркадальним генам [11, 30].

Раніше нами було показано, що експресія протеїнкіази SNARK, казеїнкіази-1ε-ієпсілон та циркадальних генів у ряді життєво важливих органів може бути чутливим маркером впливу на організм екологічно токсичних речовин, зокрема метил-третбутилового ефіру [31]. Дані літератури свідчать,

що токсичними є також і наночастки срібла які, поряд з іншими наноматеріалами, знаходять застосування і в медицині. Відомо, що токсичність наночастинок срібла є більшою, порівняно з макроскопічними дисперсіями срібла, що можливо пов'язано з їх фізико-хімічними характеристиками, здатністю наночастинок безперешкодно проникати через біологічні бар'єри організму [32 – 34].

Дослідження токсичності наночастинок срібла показали, що під їх впливом зростає частота загибелі ембріонів [35 – 36]. Деякі автори вважають, що наночастки срібла є довгостроковим джерелом іонів срібла, з чим пов'язують небезпеку їх шкідливого впливу на довкілля. Специфічним і потенційно менш небезпечним чинником є аерозоль матричного натрію хлориду, який включає власне наночастки срібла (до 30%). Його виробництво є актуальним у зв'язку з можливим використанням для очистки води [37]. Наночастки срібла, проникаючи в організм різними шляхами, в тому числі і через легені, накопичуються у життєво важливих органах, в тому числі і у головному мозку, хоча механізми подолання наночастками срібла повітряно-кров'яного бар'єру у легенях до цього часу ще не з'ясовані [38 – 39]. Встановлено, що наночастки срібла індукують експресію гена білка теплового шоку, апоптоз та оксидативний стрес, що вони можуть діяти як нейротоксини розвитку, а також порушувати розвиток ембріонів [40 – 42]. При різних технологічних операціях по виготовленню цих наночастинок срібла концентрація їх у повітрі коливається, але 98% матричного пилу належить до респірабельної фракції, із-за чого існує реальна можливість надходження певної кількості наночастинок срібла в організм інгаляційним шляхом. У зв'язку з цим, всебічне еколого-токсикологічне дослідження наночастинок срібла, як нового антропогенного чинника, є досить актуальним, в тому числі і для оцінки біонебезпеки операторів при одержанні наночастинок срібла методом електронно-променевої технології.

Метою даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу наночастинок срібла на організм на рівні експресії генів SNF1/AMP-активуємої протеїнкінази та казеїнкінази-Ієпсілон, що відіграють важливу регуляторну роль у багатьох метаболічних процесах в організмі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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 електроварування 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

в кількості 0,05 мг/кг маси тіла одноразово і досліджували експресію протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-Ієпсілон у різних органах щурів через 1, 3 або 14 днів.

Тотальні РНК виділяли із печінки, легень, нирок, головного мозку, сім'яників та серця щурів з допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, USA) згідно протоколу виробника, як описано раніше [43]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Експресію мРНК протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-Ієпсілон досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, використовуючи апарат „Stratagene Mx 3000P cycler”, SYBR Green Mix та специфічні пари праймерів. Для зворотної транскрипції як матрицю для синтезу кДНК використовували РНК із різних органів щурів, оліго(dT) праймер та SuperScript II зворотну транскриптазу (SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen, США) і реакцію проводили згідно протоколу виробника.

Для ампліфікації кДНК протеїнкінази SNARK використовували специфічні для цього гена щура праймери: прямий (5'– AAGTCTCGGC-AGCGTGAATC –3') та зворотний (5'– CAGGATG-CTGTCCTCACTCA –3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 1544 – 1564 та 1737 – 1718 у послідовності мРНК протеїнкінази SNARK щура (GenBank номер NM_001007617). Для ампліфікації кДНК казеїнкінази-Ієпсілон використовували такі праймери: прямий – 5'– GACATCTACC-TGGGTGCCAAC –3' та зворотний 5'– TGATCATC-TGGTCGGCCAGC –3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 64 – 84 та 340 – 321, відповідно, в мРНК казеїнкінази-Ієпсілон щура (GenBank номер NM_031617).

Для контролю кількості аналізованої РНК досліджували експресію мРНК β-актину. Експресію мРНК протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-Ієпсілон нормалізували по β-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100%. Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом в 2% агарозному гелі. 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 значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У зв'язку з тим, що активність більшості ключових транскрипційних факторів, що є важливими регуляторами основних метаболічних процесів, знаходиться під контролем протеїнкіназ, ми провели

дослідження експресії мРНК протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-1ε у різних життєво важливих органах щурів в нормі та за умов впливу на тварин наночасток срібла методами кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Як видно із даних, представлених на рис. 1, експресія мРНК протеїнкінази SNARK істотно посилюється у легенях, головному мозку та печінці уже через один день після одноразового інтратрахеального введення щурам наночасток срібла. Встановлено також, що ефект наночасток срібла на експресію мРНК протеїнкінази SNARK у легенях щурів залишається майже на такому ж рівні і через 3 та 14 днів, а у головному мозку та печінці є суттєво більшим на 3-й та 14-й день дії наночасток срібла. Так, найбільш виражені зміни в експресії мРНК даної протеїнкінази виявлені через 3 дні після введення щурам наночасток срібла у печінці (у 2,4 рази), а у легенях – через один день (у 2,1 рази). В той же час, у головному мозку через один день після введення тваринам наночасток срібла рівень експресії мРНК протеїнкінази SNARK посилюється в 1,7 рази, а на 3-й та 14-й день дії наночасток срібла – у 2,2 та 2,0 рази, відповідно.

На рис. 2 представлені дані дослідження експресії мРНК протеїнкінази SNARK у сім'яниках, нирках та серці щурів через 1, 3 та 14 днів після введення ним наночасток срібла. Максимальні зміни в експресії мРНК даної протеїнкінази виявлені через три дні після введення щурам наночасток срібла у всіх цих органах, знижуючись на 14-й день у сім'яниках та серці. Отримані результати свідчать про органічні особливості змін в експресії мРНК протеїнкінази SNARK під впливом наночасток срібла, а також їх залежність від часу дії після одноразового інтратрахеального їх введення. В той же час, в нирках

через один день після введення тваринам наночасток срібла рівень експресії мРНК протеїнкінази SNARK істотно не змінювався, а на третій та 14-й день дії наночасток срібла посилювався майже у 1,5 рази. Встановлено, що у міокарді спостерігалось відносно невелике збільшення (в 1,4 рази) експресії мРНК даного ензиму лише через три дні після введення в організм щурів наночасток срібла, а через 1 та 14 днів істотних змін не було виявлено.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що експресія гена протеїнкінази SNARK суттєво змінюється в клітинах ряду надзвичайно важливих органів щурів під впливом наночасток срібла та виявлено органічні особливості змін експресії мРНК протеїнкінази SNARK.

Результати досліджень впливу наночасток срібла на експресію мРНК казеїнкінази-1ε представлено на рис. 3. Встановлено, що під впливом наночасток срібла порушується експресія гена казеїнкінази-1ε у легенях, печінці та міокарді щурів уже через добу після введення тваринам наночасток срібла. Найбільш виражене збільшення рівня експресії мРНК казеїнкінази-1ε виявлено у легенях (у 2,5 рази) та міокарді (в 2,2 рази), у той час як у печінці – лише в 1,7 рази.

Стимулюючий ефект наночасток срібла на експресію мРНК казеїнкінази-1ε виявлявся також і через три та 14 днів після введення тваринам наночасток срібла, але у легенях та міокарді він був менш вираженим у порівнянні з першим днем дії наночасток срібла, тоді як у печінці експресія мРНК казеїнкінази-1ε продовжувала збільшуватися, досягаючи максимальних значень через три дні після введення щурам наночасток срібла.

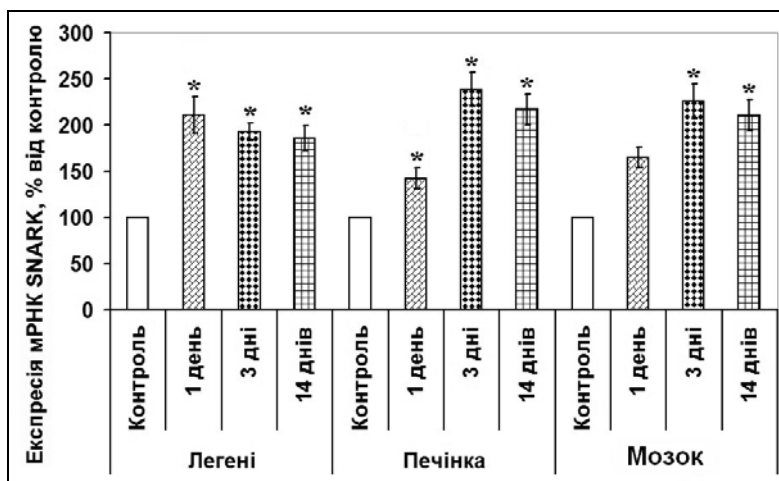


Рис. 1. Вплив наночасток срібла протягом 1, 3 та 14 днів на експресію мРНК SNF1/AMP-активованої протеїнкінази (SNARK) у легенях, печінці та головному мозку щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію мРНК протеїнкінази SNARK нормалізували по β-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. $n = 4$; * - $P < 0,05$.

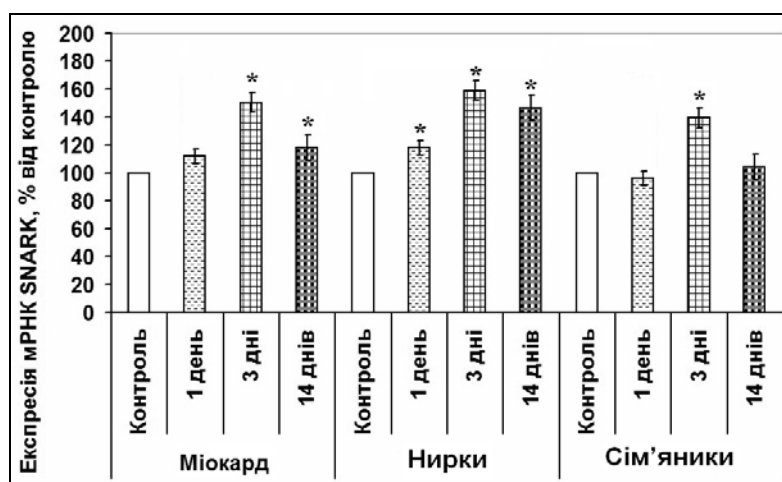


Рис. 2. Вплив наночастинок срібла протягом 1, 3 та 14 днів на експресію мРНК SNF1/AMP-активуємої протеїнкінази (SNARK) у міокарді, нирках та сім'яниках щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію мРНК протеїнкінази SNARK нормалізували по β -актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. $n = 4$; * - $P < 0,05$.

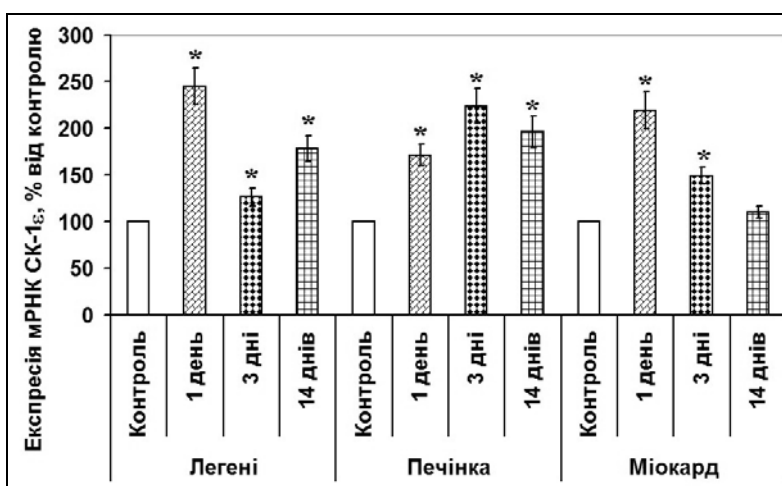


Рис. 3. Вплив наночастинок срібла протягом 1, 3 та 14 днів на експресію мРНК казеїнкінази (CK-1ε) у легенях, печінці та головному мозку щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію мРНК протеїнкінази SNARK нормалізували по β -актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. $n = 4$; * - $P < 0,05$.

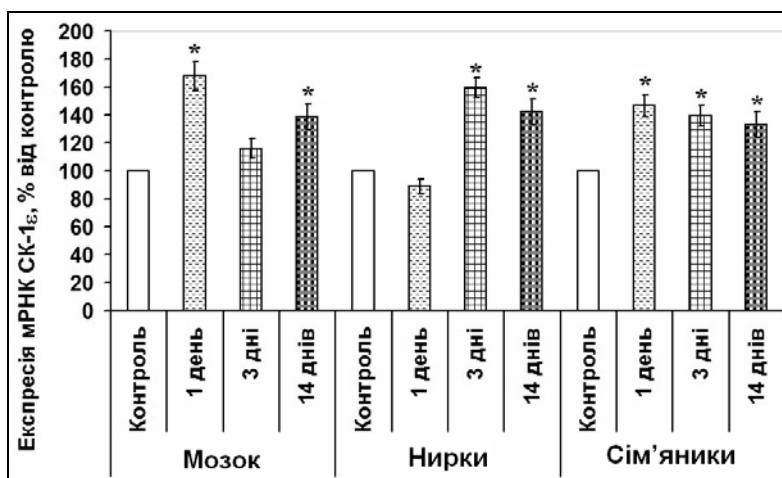


Рис. 4. Вплив наночастинок срібла протягом 1, 3 та 14 днів на експресію мРНК казеїнкінази (CK-1ε) у міокарді, нирках та сім'яниках щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експресію мРНК протеїнкінази SNARK нормалізували по β -актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. $n = 4$; * - $P < 0,05$.

При дослідженні експресії гена казеїнкінази-1ε у сім'яниках було виявлено її істотне збільшення в цьому життєво важливому органі вже через один день після введення шурам наночастинок срібла, причому рівень експресії цієї протеїнкінази залишався підвищеним майже на цьому ж рівні і через 3 та 14 днів (рис. 4), хоча посилення експресії гена казеїнкінази-1ε у сім'яниках під впливом наночастинок срібла було майже втричі меншим порівняно з легенями. Дослідження рівня експресії мРНК казеїнкінази-1ε у нирках показало, що під впливом наночастинок срібла також відбувається збільшення експресії гена казеїнкінази-1ε, але лише через 3 та 14 днів, а через один день після їх введення шурам істотних змін в експресії даної протеїнкінази не було виявлено (рис. 4). У той же час, у головному мозку максимальні зміни в рівні експресії мРНК казеїнкінази-1ε були виявлені через один день після одноразового введення шурам наночастинок срібла.

Результати даної роботи переконливо свідчать про виражену дію наночастинок срібла після їх одноразового інтратрахеального введення, на експресію генів ключових регуляторних протеїнкіназ – протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-1ε у таких життєво важливих органах як легені, головний мозок, печінка, серце, нирки та сім'яники, що може призводити до порушення сигнальних каскадів у клітинах різних органів та розвитку патологічних станів. Отримані результати вказують на те, що наночастки срібла можуть порушувати метаболізм у клітинах організму, впливаючи на центральні ланцюги системи регуляції обміну речовин шляхом змін в експресії генів протеїнкіназ, які контролюють протікання основних метаболічних процесів в організмі.

Ці принципово нові дані щодо впливу наночастинок срібла на організм на рівні експресії генів ключових регуляторних ферментів є фундаментом подальших наукових досліджень молекулярних механізмів токсичної дії наночастинок срібла та ряду інших екологічно небезпечних сполук, а також пошуку шляхів нейтралізації їх негативних впливів на організм. Проведені нами дослідження розкривають деякі сторони молекулярних основ дії на організм нанотехнологічних матеріалів, їх можливу екологічну небезпеку на рівні регуляції метаболічних процесів і будуть сприяти розробці принципово нових молекулярних підходів до їх виявлення та профілактики.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що під впливом наночастинок срібла суттєво змінюється експресія генів протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-1ε у таких життєво важливих органах, як легені, головний мозок, серце, сім'яники, печінка та нирки уже через 1 – 3 дні після одноразового інтратрахеального їх введення шурам, а

через 14 днів зберігаються підвищеними майже на тому ж рівні у більшості органів.

Експресія протеїнкінази SNARK та казеїнкінази-1ε може слугувати важливим чутливим показником впливу на організм наночастинок срібла наноматеріалів та їх екологічної небезпеки.

Література

1. Lee H., Chen R., Lee Y., Yoo S., Lee C. Essential roles of CK1delta and CK1epsilon in the mammalian circadian clock // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – Vol. 106, N 50. – P. 21359-21364.
2. Gonze D., Goldbeter A. Circadian rhythms and molecular noise // Chaos. – 2006. – 16, N 2. – P. 026110 (1 – 11).
3. Walton K.M., Fisher K., Rubitski D., Marconi M., Meng Q.J., Sládek M., Adams J., Bass M., Chandrasekaran R., Butler T., Griffior M., Rajamohan F., Serpa M., Chen Y., Claffey M., Hastings M., Loudon A., Maywood E., Ohren J., Doran A., Wager T.T. Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – Vol. 330, N 2. – P. 430-439.
4. Meng Q.J., Maywood E.S., Bechtold D.A., Lu W.Q., Li J., Gibbs J.E., Dupré S.M., Chesham J.E., Rajamohan F., Knafels J., Sneed B., Zawadzke L.E., Ohren J.F., Walton K.M., Wager T.T., Hastings M.H., Loudon A.S. Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – Aug 9. [Epub ahead of print]
5. 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. – Vol. 22, N 2. – P. 140-150.
6. Agostino P.V., Harrington M.E., Ralph M.R., Golombek D.A. Casein kinase-1-epsilon (CK1epsilon) and circadian photic responses in hamsters // Chronobiol. Int. – 2009. – Vol. 26, N 1. – P. 126-133.
7. Virshup D.M., Eide E.J., Forger D.B., Gallego M., Harnish E.V. Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. – 2007. – Vol. 72. – P. 413 – 420.
8. Kovac J., Husse J., Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock // Mol. Cells. – 2009. – Vol. 28, N 2. – P. 75 – 80.
9. Laposky A.D., Bass J., Kohsaka A., Turek F.W. Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism // FEBS Lett. – 2008. – Vol. 582(1). – P. 142 – 151.
10. 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. – Vol. 2, N 11. – P. E377.
11. 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. – Vol. 308, N 5724. – P. 1043-1045.
12. Eide E.J., Woolf M.F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E.L., Giovanni A., Virshup D.M. Control of

- mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25, N 7. – P. 2795–2807.
13. *Etchegaray J.P., Yu E.A., Indic P., Dallmann R., Weaver D.R.* Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, N 4. – P. e10303.
14. *Foldynová-Trantírková S., Sekyrová P., Tmejová K., Brumovská E., Bernatik O., Blankenfeldt W., Krejci P., Kozubik A., Dolezal T., Trantírek L., Bryja V.* Breast cancer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12, N 3. – P. R30.
15. *You S., Wood P.A., Xiong Y., Kobayashi M., Du-Quiton J., Hrushesky W.J.* Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2005. – Vol. 91, N 1. – P. 47–60.
16. *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. – Vol. 26, N 7. – P. 1241–1246.
17. *Taniguchi H., Fernandez A.F., Setien F., Roper S., Ballestar E., Villanueva A., Yamamoto H., Imai K., Shinomura Y., Esteller M.* Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 21. – P. 8447–8454.
18. *Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C.* The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo // *Cell.* – 2002. – Vol. 111, N 1. – P. 41–50.
19. *Motzkus D., Loumi S., Cadenas C., Vinson C., Forssmann W.G., Maronde E.* Activation of human period-1 by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways // *Chronobiol. Int.* – 2007. – Vol. 24, N 5. – P. 783–792.
20. *Pfeffer M., Muller C.M., Mordel J., Meissl H., Ansari N., Deller T., Korf H.W., von Gall C.* The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, N 19. – P. 6114–6123.
21. *Okamura A., Iwata N., Tamekane A., Yakushijin K., Nishikawa S., Hamaguchi M., Fukui C., Yamamoto K., Matsui T.* Casein kinase Iepsilon down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78, N 14. – P. 1624–1629.
22. *Zhao B., Li L., Tumaneng K., Wang C.Y., Guan K.L.* A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP) // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24, N 1. – P. 72–85.
23. *Chen R., Schirmer A., Lee Y., Lee H., Kumar V., Yoo S.H., Takahashi J.S., Lee C.* Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism // *Mol. Cell.* 2009. – Vol. 36, N 3. 417–430.
24. *Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H., Baggs J.E., Miraglia L.J., Kobayashi T.J., Welsh D.K., Kay S.A., Ueda H.R., Hogenesch J.B.* Feedback repression is required for mammalian circadian clock function // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38, N 3. – P. 312–319.
25. *Sasaki M., Yoshitane H., Du N.H., Okano T., Fukada Y.* 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. – Vol. 284, N 37. – P. 25149–25159.
26. *Legembre P., Schickel R., Barnhart B.C., Peter M.E.* Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 45. – P. 46742–46747.
27. *Lefebvre D.L., Rosen C.F.* Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1724, N 1–2. – P. 71–85.
28. *Rune A., Osler M.E., Fritz T., Zierath J.R.* Regulation of skeletal muscle sucrose, non-fermenting 1/AMP-activated protein kinase-related kinase (SNARK) by metabolic stress and diabetes // *Diabetologia.* – 2009. – Vol. 52, N 10. – P. 2182–2189.
29. *Kuga W., Tsuchihara K., Ogura T., Kanehara S., Saito M., Suzuki A., Esumi H.* Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 377, N 4. – P. 1062–1066.
30. *Tsuchihara K., Ogura T., Fujioka R., Fujii S., Kuga W., Saito M., Ochiya T., Ochiai A., Esumi H.* Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci // *Cancer Sci.* – 2008. – Vol. 99, N 4. – P. 677–682.
31. *Мінченко О.Г., Яворовський О.П., Паустовський Ю.О., Мінченко Д.О., Завгородній І.В.* Циркадіальні гени як чутливі маркери біонебезпеки // *Здоров'я та довкілля.* – 2009. – №1 (48). – С. 10–17.
32. *Lubick N.* Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 42, N 23. – P. 8617.
33. *Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J.* The present and future of nanotechnology in human health care // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2007. – Vol. 3, N 1. – P. 20–31.
34. *Ji J.H., Jung J.H., Kim S.S., Yoon J.U., Park J.D., Choi B.S., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S., Shin J.H., Sung J.H., Song K.S., Yu I.J.* Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats // *Inhalation Toxicology.* – 2007. – Vol. 19, N 10. – P. 857–871.
35. *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. – Vol. 107, N 2. – P. 404–415.
36. *Chen D., Xi T., Bai J.* Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study // *Biomed. Mater.* – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. S126–S128.
37. *Benn T.M., Westerhoff P.* Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics // *Environmental Science & Technology.* – 2008. – Vol. 42, N 11. – P. 4133–4139.
38. *Tang J., Xiong L., Wang S., Wang J., Liu L., Li J., Yuan F., Xi T.* Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 9, N 8. – P. 4924–4932.
39. *Shimada A., Kawamura N., Okajima M., Kaewamatawong T., Inoue H., Morita T.* Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse // *Toxicol. Pathol.* – 2006. – Vol. 34, N 7. – P. 949–957.
40. *Ahamed M., Posgai R., Gorey T.J., Nielsen M., Hussain S.M., Rowe J.J.* Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster* //

- Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2010. – Vol. 242, N 3. – P. 263 – 269.
41. Ringwood A.H., McCarthy M., Bates T.C., Carroll D.L. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos // *Mar Environ Res.* – 2009. – Nov 12. [Epub ahead of print]
42. Powers C.M., Wrench N., Ryde I.T., Smith A.M., Seidler F.J., Slotkin T.A. Silver impairs neurodevelopment: studies in PC12 cells // *Environ Health Perspect.* – 2010. – Vol. 118, N 1. – P. 73 – 79.
43. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O., Ogura T., Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 576, N 1. – P. 14 – 20.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ЭКСПРЕССИЮ SNF1/AMP-АКТИВИРУЕМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ И КАЗЕИНКИНАЗЫ-1ЭПСИЛОН В РАЗНЫХ ОРГАНАХ КРЫС

Минченко Д.А., Божко И.В., Зинченко Т.А., Кузнецова А.Ю., Дуган О.М., Яворовский А.П., Минченко А.Г.

Изучали влияние наночастиц серебра на экспрессию SNF1/AMP-активируемой протеинкиназы (SNARK) и казеинкиназы-1эпсилон в разных органах крыс. Установлено, что экспрессия мРНК протеинкиназы SNARK и казеинкиназы-1эпсилон существенно нарушается в легких, головном мозге, печени, сердце и почках крыс после однократного внутритрахеального введения наночастиц серебра. Наиболее выраженные изменения в экспрессии этих генов наблюдались через 1 или 3 дня после введения этих наночастиц. Результаты данной работы свидетельствуют о возможном влиянии наночастиц серебра на важные механизмы регуляции метаболических процессов в клетках на уровне экспрессии генов ключевых протеинкиназ, что может приводить к нарушению сигнальных каскадов в клетках и развитию патологических состояний.

Ключевые слова: протеинкиназа SNARK, казеинкиназа-1эпсилон, наночастицы серебра, легкие, печень, мозг, крысы.

EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON THE EXPRESSION OF SNF1/AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE AND CASEIN KINASE-1EPSILON IN DIFFERENT RAT ORGANS

Minchenko D.O., Bozhko I.V., Zinchenko T.O., Kuznetsova A.Y., Duhan O.M., Yavorovsky O.P., Minchenko O.H.

Effect of silver nanoparticles on the expression of SNF1/AMP-activated protein kinase and casein kinase-1epsilon in different rat organs was studied. We have shown that the expression of protein kinase SNARK and casein kinase-1epsilon mRNA significantly disturbance in rat lung, brain, liver, heart and kidney after single intratracheally treatment with silver nanoparticles. Maximal affect of silver nanoparticles on the expression of these genes was observed in 1 or 3 days after treatment of rats. Results of this investigation demonstrated that silver nanoparticles can affect some important regulatory mechanisms which control cell metabolism via protein kinase gene expression. Disturbance of this gene expression can destroy the cellular signal pathways and leads to developing of pathological processes.

Key words: protein kinase SNARK, casein kinase-1epsilon, silver nanoparticles, lung, liver, brain, rats.