

CIRCADIAN GENES AS SENSITIVE MARKERS OF BIOINSECURITY

Minchenko O.H., Yavorovsky O.P., Paustovsky Y.O.,
Minchenko D.O., Zavgorodny I.V.

ЦИРКАДІАЛЬНІ ГЕНИ ЯК ЧУТЛИВІ МАРКЕРИ БІОНЕБЕЗПЕКИ

Всі живі організми мають досить надійну багаторівневу систему регуляції їхньої життєдіяльності та захисту від негативних впливів зовнішніх факторів, що забезпечує їх виживання та збереження генотипу, а також певну адаптацію до змін оточуючого середовища. В останні роки детально вивчаються молекулярні основи вищих рівнів регуляції найважливіших метаболічних процесів у клітинах різних організмів, головним чином тих, що визначають циклічний характер перебігу основних процесів життєдіяльності та поведінку організмів. У більшості живих істот виробилась здатність до автономних коливань у поведінці та перебігу фізіологічних і біохімічних процесів з періодом, близьким до 24 годин синхронно з обертанням Землі навколо своєї осі, які називають циркадіальними ритмами, що генеруються у гіпоталамусі на молекулярному рівні циркадіальним годинником. Циркадіальний годинник — це група взаємопов'язаних генів, які кодують синтез важливих факторів регуляції транскрипції великої групи генів і які одержали назву циркадіальних (Per1, Per2,

Per3, Clock, BMal1, Cry тощо) [1-3]. Функціонування циркадіального годинника контролюється низкою протеїніназ та фосфатаз, активність яких, у свою чергу, залежить від багатьох факторів [2-4]. Більшість основних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі має циклічний характер і контролюється низкою циркадіальних генів, основними з яких є Clock, BMal1, Per1 та Per2, які кодують синтез важливих факторів регуляції транскрипції досить великої групи генів, що контролюють перебіг основних метаболічних процесів [5-11]. Ці фактори є ключовими регуляторами метаболізму як у нормі, так і при багатьох патологічних станах. Циркадіальні гени щоденно змінюють циркадіальні ритми різноманітних фізіологічних процесів, причому у різних організмів виявлено індивідуальні особливості експресії циркадіальних генів, що відповідають різним типам циркадіальних ритмів. Зокрема, на лімфоцитах крові виявлено існування різних хронотипів експресії циркадіальних генів у людей [4]. Крім того, встановлено, що циркадіальний ха-

**МІНЧЕНКО О.Г.,
ЯВОРОВСЬКИЙ О.П.,
ПАУСТОВСЬКИЙ Ю.О.,
МІНЧЕНКО Д.О.,
ЗАВГОРОДНИЙ І.В.**

Інститут біохімії
ім. О.В. Палладіна
Національної академії наук
України, м. Київ,
Національний медичний
університет
ім. О.О. Богомольця, м. Київ,
Харківський національний
медичний університет

УДК 577.112.7:616

Ключові слова:
протеїнінази, циркадіальні
гени, маркери
біонебезпеки.

ЦИРКАДИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ КАК ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ БИООПАСНОСТИ

Минченко А.Г., Яворовский А.П., Паустовский Ю.А., Минченко Д.А., Завгородний И.В.

Нарушения регуляции и течения циркадиальных процессов в организме есть одной из причин возникновения ряда патологических процессов, в том числе и злокачественных новообразований. Наиболее важными генами, регулируемыми протекание циркадиальных процессов в норме и при патологических состояниях, являются циркадиальные гены Per2, BMal1 Clock и ряд других. Данные экспериментальных исследований указывают на то, что экспрессия циркадиальных генов и генов некоторых протеинкиназ существенно изменяется в клетках различных органов животных под влиянием экологически опасных токсических соединений, в частности метил-третбутилового эфира. Изменения в экспрессии этих регуляторных генов могут приводить к нарушению сигнальных каскадов в клетках и развитию патологических состояний, в том числе и к возникновению злокачественных новообразований. В связи с этим исследования экспрессии циркадиальных генов и генов ряда протеинкиназ, контролирующих основные метаболитические процессы в организме, могут служить чувствительными показателями биоопасности, в том числе и вредного действия на организм химических веществ, загрязняющих окружающую среду.

Ключевые слова: протеинкиназы, циркадиальные гены, маркеры биоопасности.

рактер регуляції процесів життєдіяльності зумовлений відповідним коливанням експресії генів циркадіального годинника. Наведені вище дані переконливо свідчать про існування популяції людей з різним типом перебігу циркадіальних процесів. Більше того, роботами багатьох дослідників доведено, що при ряді захворювань мають місце порушення у регуляції експресії циркадіальних генів, які можуть бути причетними також і до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [6, 8, 12-20]. Останнім часом виявлено залежність експресії низки циркадіальних генів від гіпоксії, що також значною мірою може призводити до змін у функції цих генів та сприяти прогресії більшості пухлин [21]. Експресія більшості циркадіальних генів та функція білкових факторів, що кодуються ними, контролюється протеїніназами, зокрема казеїнкіназою-1ε, яка також бере участь у регуляції низки інших надзвичайно важливих процесів [22-33]. Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1ε зв'язується з Per1, Per2 та Per3 і фосфорилує їх, що істотним чином змінює функціонування генів, які контролюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, Mdm-2, c-myc і Gadd45α) та онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин [16, 22, 23, 25, 29, 34]. Ця протеїнкіназа бере участь у дестабілізації β-катенін-деградуючого комплексу [30], у функціонуванні TGF-β сигнального каскаду [27], в інактивації білка від через його розщеплення каспазою 8 [32], фосфорилує P53, білок, що пригнічує ріст пухлин [33], негативно регулює фосфо-Акт через PTEN [26]. Крім того, для циркадіальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку у механізмах регуляції, що надзвичайно важливо для точної і чіткої роботи циркадіального годинника [24, 35-38].

Нині встановлено, що сон і циркадіальні ритми мають сильний вплив на енергетичний обмін, а їх порушення є важливим компонентом механізмів поширення епідемії ожиріння та цукрового діабету [6, 39]. Більше того, ці епідемії є взаємно доповнюючими, суттєво впливаючи одна на

одну. Система циркадіального годинника відіграє фундаментальну роль в енергетичному обміні як на функціональному рівні, так і на молекулярному. Не дивлячись на те, що ці дослідження ще тільки починаються, вони є надзвичайно важливим концептуальним та експериментальним підґрунтям для розуміння молекулярних основ метаболічних захворювань [39].

Молекулярні механізми добової ритміки базуються на системі саморегуляторних транскрипційних, пост-транскрипційних та трансляційних і пост-трансляційних зворотних зв'язків, які складають основу циркадіального годинника і мають як позитивні, так і негативні елементи [2, 41]. Комплекси з двох позитивних елементів, які є транскрипційними факторами, активують транскрипцію генів негативних елементів. До позитивних елементів належать White Collar-1 і 2 (WC-1 і WC-2) у *Neurospora crassa*, dClock і Cycle у *Drosophila melanogaster* та Clock і BMal1 у ссавців [42]. Ці фактори транскрипції містять PAS (Per-Arnt-Sim) та базальний HLH (basic helix-loop-helix — спіраль-петля-спіраль) структурні домени. Формуючи гетеродимери (WC-1:WC-2, dClock:Cycle та Clock:BMal1), вони активують транскрипцію генів циркадіального годинника. Транскрипційний фактор Clock є дуже важливим компонентом молекулярного циркадіального годинника, який відіграє кардинальну роль в енергетичному балансі ссавців. Було показано, що гомозиготні нокаутні за геном Clock миші мають значно послаблений ритм денного харчування. Для них характерне ожиріння та метаболічний синдром: гіперлептінемія, гіперліпідемія, гіпоінсулінемія і гіперглікемія. Крім того, було встановлено, що у мутантних за геном Clock мишей знижується експресія мРНК деяких гіпоталамічних пептидів, які відповідають за енергетичний баланс [6].

Негативними елементами виступають Frq (від frequency) у *Neurospora*, Per (від period) і Tim (від timeless) у *Drosophila* і Cry (від cryptochrome) у ссавців. Негативні елементи супресують транскрипційну активність позитивних, пригнічуючи

синтез відповідних білкових продуктів. На відміну від позитивних елементів, негативні не мають загальної гомології у структурі доменів. Проте, незважаючи на варіабельність своєї будови, їм притаманні дві загальні властивості. По-перше, в їхній експресії спостерігається циркадіальна осциляція накопичення транскрипційних та білкових продуктів. Позитивні ж елементи демонструють відносно низькі флукутації чи взагалі відсутність ритму у своїй експресії. По-друге, деякі негативні елементи, зокрема Frq і Per, здатні фосфорилуватися залежно від періоду доби, що призводить до зміщення їхньої електрофоретичної рухливості. За фосфорилування негативних елементів відповідають кальцій/кальмодулінзалежна кіназа (CaMK), казеїн кіназа I (CKI) та казеїн кіназа II (CKII) у *Neurospora* та *Drosophila*, CKIε і CKIδ у ссавців Dbt (від double-time), що є гомологом CKIε та Shaggy, що є гомологом глюкозосинтазної кінази 3β (GSK3β) ссавців [43-48].

Крім наведеного механізму, існують додаткові зв'язки, які допомагають підтримувати осциляції в організмі. У ссавців білок BMal1 також виступає негативним регулятором власної експресії. Транскрипцію BMal1 підсилюють негативні елементи Per2 і Cry. Ядерні орфанні рецептори ретиноевої кислоти Rev-erbα і Rorα супресують експресію Clock і BMal1. Транскрипційні фактори Dec1 та Dec2, що містять bHLH домен, також регулюються циркадіальним годинником, інгібуючи транскрипцію, яка була індукована комплексом Clock:BMal1.

У ссавців обидва позитивні елементи Clock і BMal1 виступають транскрипційними факторами, що містять PAS та bHLH структурні домени. Clock

і *BMal1* формують гетеродимер, який зв'язується з E-боксом-енхансерним елементом (полідровність CACGTG) генів *per1* і *cry*, активуючи при цьому їхню транскрипцію [26].

Мутації у гені *clock* призводять до надзвичайно довгого циркадіанного періоду у постійній темряві (DD). Мутантний білок *Clock*, подібно до нормального, здатний формувати з *BMal1* гетеродимери, що зв'язуються з ДНК, але не можуть активувати транскрипцію. У стані такого дефіциту у супрахіазматичних ядрах (СХЯ) гомозиготних *clk* мутантних мишей суттєво вкорочуються періоди коливання рівня мРНК *Per1*, *Per2*, *Per3* і *Cry1*. *BMal1* — нокаутні миші у постійній темряві (DD) також стають аритміками. Всі ці дані підтверджують, що *Clock* і *BMal1* виступають важливими компонентами циркадіального годинника, який функціонує за рахунок їхньої транскрипційної активності. E-бокс локалізований у промоторній ділянці всіх генів *Per*, а *Clock:BMal1* гетеродимер активує їхню транскрипцію *in vitro*. Більше того, різке зниження рівня мРНК *Per* та *Cry* у *Clock*-мутантів і *BMal1*-нокаутних мишей свідчить, що гетеродимер *Clock:BMal1* активує транскрипцію негативних елементів *Per* і *Cry in vivo*.

Останні дослідження показали, що нейрони СХЯ гомозиготних *Clock*-мутантних мишей (*clk/clk*) мають ритмічну електричну активність, циркадіальний період якої становить близько 28 год. Цікаво, що циркадіальні осциляції можуть генеруватися без транскрипційної активності *Clock* у нейронах СХЯ. За однією з гіпотез, інший транскрипційний фактор компенсує втрачену функцію *Clock*. Таким фактором може виступати *NPAS2* (представник родини *Clock* білків), який, як

було показано, здатний формувати гетеродимер з *BMal1* і активувати транскрипцію шляхом взаємодії з E-боксом, подібно до *Clock*. Оскільки *NPAS2* не експресується у СХЯ, то можливо інший представник *Clock* родини експресується і утворює комплекси з *BMal1*.

Чіткі циркадіальні ритми *BMal1* спостерігаються у СХЯ, хоча амплітуда осциляцій значно нижча від амплітуди негативних елементів *Per* і *Cry*. *BMal1* і *Clock* фосфорилуються *in vivo*, а *CKIε* і *MAP* кінрази-ε фосфорилують *BMal1 in vitro* [5, 49].

Ссавці мають білки *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* і *Cry2*, які проявляють стійкі циркадіальні осциляції рівня мРНК і білка, пік яких припадає на середину світлового періоду доби. Вони здатні інгібувати транскрипцію власних генів, впливаючи через *Clock:BMal1* гетеродимер, і є негативними елементами у системі зворотних зв'язків циркадіального годинника.

Двічі нокаутні миші *cry1^{-/-}*, *cry2^{-/-}* втрачають циркадіальну ритмічність у постійній темряві, а рівень мРНК *Per1* та *Per2* у цих мутантних мишей залишається досить високим [50]. Ці результати вказують на те, що *Cry1* і *Cry2* є невід'ємними компонентами циркадіального годинника. Миші, нокаутовані лише за одним геном (*cry1^{-/-}* чи *cry2^{-/-}*), виявляють циркадіальні ритми з різними періодами (*cry1^{-/-}* миші мають період 22,5 год, *cry2^{-/-}* — 24,5 год). *Cry1* і *Cry2*, ймовірно, виконують різні ролі і компенсують один одного. Відомо, що *Cry1* та *Cry2* пригнічують транскрипційну активність *Clock:BMal1* гетеродимеру, проте молекулярний механізм інгібування залишається ще нез'ясованим.

Необхідним компонентом циркадіального годинника є *Per2*. Хоча він виступає негативним елементом циркадіальної системи зворотних зв'язків, дія *Per2* не спрямована на пригнічення експресії комплексу *Clock:BMal1*, оскільки рівень мРНК *per1* та *cry1* знижується у *per2* мутантів. Однією із запропонованих функцій *Per2* є стабілізація білків *Cry*. Показано, що формування комплексу *Per2:Cry* захищає білки від убіквітинзалежного протеолізу [51]. Крім того, рівень білка *Per2* у *cry1^{-/-}*, *cry2^{-/-}* у двічі но-

каутованих мишей значно нижчий, ніж у нормальних, а кількість мРНК залишається на досить високому рівні. Іншою можливою функцією *Per2* є пригнічення транскрипційної активності гену *BMal1*.

Встановлено, що трансгенні миші з мутантним геном *per1* (*Per1^{Brdm}* та *Per1^{Idc}*) мають різні фенотипи. *Per1^{Idc}* миші у темряві поступово втрачають циркадіальну ритмічність, тоді як генотипи *Per1^{Brdm}* не втрачають. В обох випадках у мутантів зберігаються нормальні осциляції мРНК *Per1*, *Cry1* та *BMal1* у СХЯ. Трансгенні миші за генами *per1* і *per2* відразу втрачають свою поведінкову ритмічність у темряві. Зважаючи на це можна зробити припущення, що *Per1* відіграє важливу, проте не основну роль у механізмі функціонування циркадіального годинника. Миші з модифікованим геном *per3* зберігають циркадіальну ритмічність, а двічі нокаутні миші (за *Per2* та *Per3*) мають фенотип, схожий на *Per2* трансгенних мишей. Тому можна припустити, що *Per3* відіграє лише додаткову роль у механізмі циркадіального годинника.

Яким чином *Per* і *Cry* функціонують у системі транскрипційних зворотних зв'язків, дотепер повністю ще не з'ясовано. Імуноферментний аналіз показав, що *Clock*, *BMal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2* та *CKIε* здатні утворювати комплекси, проте невідомо, в яких саме комплексах знаходяться *Per1*, *Per2*, *Cry1* та *Cry2*. Було показано, що виключення гену *cry2* у мутантних за геном *per2* мишей відновлює природну ритміку, тобто миші, трансгенні за двома генами *per2* і *cry2*, зберігають природну ритміку, а за генами *per2* та *cry1* — її втрачають [52].

CKIε контролює фосфорилування і деградацію білків *Per* [5, 49]. Мутації у гені *dbt* (гомолог *CKIε*) призводять до різноманітних порушень у циркадіальній поведінці дрозофіли, що вказує на важливість даної кінрази у функціонуванні циркадіального годинника. У ссавців *CKIε* також включається у механізми генерації і синхронізації циркадіальних ритмів. Тау мутанти золотого хом'ячка, які проявляють вкорочений циркадіанний період, мають точкову мутацію у гені *ck1ε*. Ця зміна

CIRCADIAN GENES AS SENSITIVE MARKERS OF BIOINSECURITY

Minchenko O.H., Yavorovsky O.P., Paustovsky Y.O., Minchenko D.O., Zavgorodny I.V.

Disturbance the regulation of circadian processes leads to developing of different pathology and cancers in particular. The Per2, BMal1, Clock and some other genes are important regulators which control the circadian processes in normal and pathological conditions. There is data that toxic and ecologically dangerous chemical compounds such as methyl-tretbutyl ether significantly changes the expression of Per2, BMal1, Clock genes as well as some protein kinase genes responsible for the regulation of key metabolic processes. Disturbance of these genes expression can destroy the cellular signal pathways and leads to developing of different pathological processes and cancers in particular. Thus, investigation the expression of circadian genes as well as some protein kinase genes responsible for the regulation of main metabolic processes can be sensitive markers of bioinsecurity and toxic action of ecologically dangerous chemical compounds in particular.

призводить до помітного зниження фосфорилування негативних регуляторів, що проявляється підвищенням їхньої стабільності. Більше того, мутація у СКІε-фосфорилуючому сайті Per2 людини призводить до зменшення періоду у циклі "сон-бадьорість" (синдром FASPS) [57]. У культурі тканин СКІε зв'язує та фосфорилує всі три білки Per, що приводить до залежного від фосфорилування переміщення Per1 та Per3, але не Per2 в ядро. Встановлено також, що СКІε та СКІδ причетні до убіквітинуювання білків Per [29]. Повідомлялося, що СКІε здатна фосфорилувати білки BMal1 і Cry, проте фізіологічне значення даних реакцій залишається ще нез'ясованим. Різниця у ролях СКІε та СКІδ у механізмі циркадальних осциляцій нині не цілком зрозуміла, але припускають, що СКІδ може частково компенсувати функцію СКІε.

У роботі циркадального годинника бере участь і низка фосфатаз, які дефосфорилують попередньо фосфорильовані кіназами білки. Однак, на відміну від кіназ, наші знання про роль фосфатаз у підтриманні роботи циркадального годинника залишаються незначними. Відомо, що серин/треонінові фосфатази PP1 (протеїн фосфатаза 1) та PP2A (протеїн фосфатаза 2A), а також їхні інгібітори впливають на добові ритми у дінофлагеллят та Neurospora. У дрозофіли функція PP2A пов'язана зі стабілізацією білка Clock. Руйнування інтерферуючими РНК widerborst та twins транскриптів (вони кодуєть регуляторну субодиницю PP2A) призводить до підвищення деградації Per шляхом Dbt фосфорилування [53]. Вперше продемонстровано, що PP1 відіграє ключову роль у стабілізації mPer2 шляхом дефосфорилування [54].

Автори, використавши багато різноманітних підходів та моделей, довели, що саме PP1, а не PP2A є ключовою для стабільності Per2 у мишей. Мутантна фосфатаза D95N (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін у 95 положенні) взаємодіє з Per2, проте мутація призводить до зменшення рівня Per2. D95N фосфатаза вкорочує період напівжиття Per2 до 3-х годин, тоді як у контролі (наявність PP1 дикого типу) він удвічі довший. Таким чином, баланс активностей між кіназами та фосфатазами визначає стабільність регуляторних елементів циркадального годинника.

Важливими регуляторними елементами молекулярного годинника, які утворюють додаткові петлі у системі зворотних зв'язків, виступають ядерні орфанові рецептори ретиноєвої кислоти Rer-erbα і Rorα, транскрипційні фактори Dec1, Dec2, E4bp4 та, можливо, Tim білок [55]. Rev-erbα і Rorα, активуючи транскрипцію Clock та BMal1, індукують одну з головних петель у механізмі циркадальних осциляцій. Фактори Rev-erbα і Rorα конкурують між собою за зв'язування з послідовностями RORE (від retinoic acid-related orphan receptor response elements), які знаходяться у промоторі гена BMal1. Було показано, що представники Ror (α, β і γ) та Rev-erb (α і β) мають здатність регулювати транскрипцію BMal1, впливаючи через RORE ділянки [56]. Ror активують транскрипцію BMal1, тоді як Rev-erb репресують транскрипційні процеси. Відповідно, добові осциляції BMal1 позитивно і негативно регулюються ядерними рецепторами ретиноєвої кислоти.

Ключовим моментом у функціонуванні циркадального годинника є його здатність адекватно реагувати на світ-

лові подразники. Таким світлочутливим геном є e4bp4, що кодує транскрипційний фактор bZIP. Модель світлової регуляції базується на двох положеннях. По-перше, рівень експресії e4bp4 у клітинах шишкоподібного тіла залежить від тривалості світлової експозиції. По-друге, E4bp4, формуючи димери, зв'язується з E4bp4-зв'язуючими ділянками промотору per2 і репресує його транскрипцію. Синтез Per2 розпочинається лише за 4 години після початку освітлення. За цей час відбувається фосфорилування E4bp4 за допомогою СКІε і його деградація [29]. Крім того, промотор гена e4bp4, крім світлочутливих послідовностей, містить ще RORE — елемент, що робить його транскрипцію чутливою до наявності Ror та Rev-erb білків [57].

Білок Timeless (Tim) ссавців був ідентифікований завдяки своїй подібності в амінокислотній послідовності до білка Tim у дрозофіли. Літературні дані досить суперечливі щодо ритмічної експресії tim, взаємодії Tim білка з іншими білками молекулярного годинника та його ролі у регуляції циркадальної експресії генів. Існують певні труднощі у вивченні функціонального значення Tim in vivo, оскільки Tim-нокаутовані миші гинуть протягом ембріонального періоду. Така рання і важлива роль білка Tim свідчить про те, що він задіяний у процесах, більш критичних для життя, ніж механізм молекулярного годинника. Циркадальний годинник функціонує на значно пізнішому етапі індивідуального розвитку і не є життєво важливим [58]. Для встановлення ролі Tim білка у механізмі генерації добових осциляцій у ссавців необхідні додаткові дослідження.

У результаті експериментів з трансплантації супрагіазматичних ядер гіпоталамуса було доведено, що вони є центральним пейсмейкером добових ритмів у ссавців. Подальші дослідження показали, що циркадіальний годинник автономний і здатний до самопідтримки не лише у СХЯ, але й в інших периферичних тканинах і навіть ізольованих клітинах, що викликає підвищений інтерес до циркадіальних механізмів, які існують у незалежних периферичних осциляторах та до ієрархії у циркадіальній системі ссавців.

Більшість головних компонентів молекулярного годинника зберігає свою ритмічність у СХЯ та у периферичних тканинах. Деякі елементи змінюють свої ритмічні властивості залежно від тканини. Наприклад, рівень мРНК Clock циклічно змінюється у периферичних тканинах, а у СХЯ Clock експресується конститутивно. Більше того, представники *Ror* родини (α , β і γ) у різних тканинах мають вражаюче різну експресію зі змінними добовими піками [56, 59]. Зокрема, *Rora* проявляє стійкі циркадіальні ритми у СХЯ, проте лише незначні осциляції спостерігаються у периферичних тканинах [56]. *Rory*, що не експресується у СХЯ, має ритмічну експресію на периферії і бере участь у периферичному годинниковому механізмі [56]. Миші, в яких відсутній функціональний *Rora* білок, мають нормальні ритми у периферичних тканинах, у тому числі у *BMal1* мРНК ритмах. Тканинно-специфічна регуляція *BMal1* є досить важливою, і *BMal1* — дефіцитні (*BMal1*^{-/-}) миші проявляють велике різноманіття фенотипів: втрата добових ритмів, зменшення ваги тіла, безпліддя і навіть вкорочення тривалості життя [60].

Специфічний внесок кожного компонента у транскрипційні осциляції молекулярного годинника залежить від типу тканини. Існує незначний вплив дефіциту Clock білка на амплітуду осциляцій *Rev-erb* α у СХЯ, тоді як амплітуда *Rev-erb* α транскриптів помітно зменшується у печінці. З іншого боку, мРНК *Per1* у печінці Clock-дефіцитних мишей зберігає стійку ритмічність з рівнем, що цілком відповідає нормі. Рівень

Per1 у Clock-дефіцитних СХЯ значно нижчий у своєму абсолютному значенні, порівняно з нормою.

Молекулярна модель циркадіального годинника передбачає, що центральна його ланка генерується двома позитивними транскрипційними факторами: Clock і *BMal1*. Після транскрипції і трансляції Clock та *BMal1* формують гетеродимер і повертаються в ядро, де, зв'язуючись з E-боксами *per* і *cry* промоторів, регулюють їх транскрипцію. *Per* і *Cry* білки утворюють комплекс з *CKI* ϵ і переміщуються в ядро для того, щоб перешкодити комплексу Clock:*BMal1* далі взаємодіяти з їхніми промоторами. Це блокує транскрипцію регульованих генів. Ступінь фосфорильовання білків *Per* і *Cry* кінназою 1 ϵ позначається на їхній стабільності. Clock:*BMal1* гетеродимер активує транскрипцію *rev-erb* і *rog* генів, продукти яких, взаємодіючи з RORE елементами у *Bmal1* промоторі, скеровують відповідно його транскрипцію. Ще одна петля утворюється деякими Clock-контрольованими генами (DBP), яка також контролюється позитивними елементами Clock і *BMal1* та негативними *Per* і *Cry*. Крім того, існують дві додаткові негативні петлі, які тісно переплітаються з основними. Перша з них генерується транскрипцією генів *dec1* та *dec2*. Петля позитивно контролюється Clock:*BMal1* гетеродимером, а негативно — власними продуктами. Білок *Dec1*, взаємодіючи з E-боксом, пригнічує транскрипцію генів *per* та *cry*. Другу додаткову петлю формує ген *e4bp4*, фосфорильовані продукти якого, утворюючи димери, інгібують експресію генів *per* та *cry*. Сам *e4bp4* регулюється білками *Rev-erb* та *Ror*.

Характерною особливістю циркадіального годинника є його здатність реагувати на чинники зовнішнього середовища. Механізми сприйняття світла молекулярним годинником можуть суттєво відрізнятися у різних видів організмів. У дрозоді фоторецепторною молекулою циркадіального годинника виступає білок *Cry*. Одним із компонентів циркадіального годинника ссавців, який відповідає на світловий вплив, виявився білок *BMal1*.

Пік його накопичення припадає на середину ночі. Він досить швидко деградує під дією світлової стимуляції. Ще одним елементом, що реагує на світло, є ген *e4bp4*, який у своєму промоторі, крім послідовності RORE, містить ділянку LRE (light response element). Досі не встановлено, який саме регуляторний білок зв'язується з LRE і викликає транскрипцію. Можливо, існує транскрипційний фактор, який не задіяний у системі зворотних зв'язків молекулярного годинника, а лише запускає механізм, впливаючи на одну з його ланок.

Відомо, що багато генів мають циркадіальну ритмічність, проте лише невелика кількість генів може безпосередньо регулюватися гетеродимером Clock:*BMal1* [56]. Можливо, Clock:*BMal1* регулює експресію низки транскрипційних факторів, які у свою чергу впливають на транскрипцію інших генів.

На даний час відомо, що при деяких захворюваннях спостерігаються порушення у регуляції експресії низки циркадіальних генів, які можуть бути причиною виникнення та прогресії різного роду злоякісних пухлин [6, 8, 12, 17-20, 62]. Було показано, що порушення циркадіальних ритмів у мишей значно прискорювало ріст пухлин (як Glasgow остеосаркоми, так і панкреатичної аденокарциноми) та смертність тварин, до того ж циркадіальний годинник пухлиноносія може відігравати важливу роль у прогресії пухлин [61, 62].

Крім того, було встановлено, що експресія циркадіальних генів та генів низки протеїнінази може бути чутливим маркером негативних впливів екологічно небезпечних токсичних хімічних сполук, зокрема метил-третбутилового ефіру [63-65]. Метил-третбутиловий ефір є екологічно небезпечною хімічною сполукою, що використовується для виробництва неетильованих бензинів, яка здатна накопичуватися у ґрунті, що, у свою чергу, призводить до забруднення цієї сполукою підземних джерел водопостачання і можливого отруєння людей [37]. Більше того, враховуючи інтенсивність використання бензинів з метил-третбутиловим ефіром та високу стабільність цієї хімічної

сполуки, можна вважати її досить небезпечним глобальним забруднювачем довкілля [37].

Було проведено детальне вивчення можливих молекулярних механізмів впливу цієї екологічно небезпечної хімічної сполуки на лабораторних тварин. Для цього досліджували дію метил-третбутилового ефіру на експресію казеїнкінази-1 ϵ , SNARK, PFKFB, Per2, BMal1 та Clock у різних органах лабораторних тварин (печінці, легенях та серцевому м'язі). Виявлені суттєві зміни в експресії генів Per2 та BMal1 у різних органах щурів під впливом метил-третбутилового ефіру, але чітко виявлялася залежність ефекту цієї токсичної сполуки від її дози і проявлялися по-різному у різних органах тварин. Істотно порушувалася експресія також казеїнкінази-1 ϵ та SNARK кінази у різних життєво важливих органах щурів за тривалої дії метил-третбутилового ефіру, але і у даному випадку чітко виявлялася залежність ефекту цієї токсичної сполуки від її дози, причому вираженість і направленість змін в експресії генів цих протеїнкіназ мала органоспецифічний характер.

Надзвичайно цікаві результати були отримані при дослідженні впливу метил-третбутилового ефіру на експресію 6-фосфоглюкозо-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази у різних органах тварин. Виявлено дозозалежні зміни в експресії PFKFB-4, що свідчило про чутливість її до токсичної дії екологічно небезпечної сполуки — метил-третбутилового ефіру. Крім того, було виявлено декілька нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4, які мають делеції або вставки різної довжини у фруктозо-2,6-бісфосфатазній частині молекули зі зміною довжини та рамки читування С-кінцевої ділянки, але каталітичні домени для 6-фосфоглюкозо-2-кінази у них є ідентичними. Було встановлено, що експресія обох альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 має органну специфічність і суттєво змінюється під впливом метил-третбутилового ефіру, екологічно небезпечної сполуки. Результати дослідження вказують на можливу роль сплайс-ізоформ PFKFB-4 у тканиноспецифічній регуляції гліколізу

та чутливості процесів регуляції альтернативного сплайсингу до дії токсичних хімічних сполук, зокрема метил-третбутилового ефіру.

Таким чином, результати цих досліджень переконливо свідчать про виражену дію метил-третбутилового ефіру на експресію циркадіальних генів, надзвичайно важливих факторів регуляції транскрипції у таких життєво важливих органах, як печінка, легені та серце. Отримані результати вказують, що МТБЕ може порушувати метаболізм у клітинах організму, впливаючи на центральні ланцюги системи регуляції обміну речовин, змінюючи експресію циркадіальних генів, які контролюють більшість метаболічних процесів в організмі. Ці принципово нові дані щодо впливу метил-третбутилового ефіру є своєрідним фундаментом подальших наукових досліджень молекулярних механізмів токсичної та канцерогенної дії цієї хімічної сполуки, низки інших екологічно небезпечних сполук та пошуку шляхів нейтралізації їхніх негативних впливів на організм. Вони розкривають молекулярні основи дії на організм екологічно небезпечних сполук на рівні регуляції метаболічних процесів і сприятимуть розробці принципово нових молекулярних підходів до їх діагностики, профілактики та лікування.

Висновки

Тривала дія метил-третбутилового ефіру на організм призводить до змін в експресії циркадіальних генів Per2, BMal1 та Clock, а також генів протеїнкіназ (казеїнкінази-1 ϵ , SNARK та PFKFB) у таких життєво важливих органах, як печінка, легені та серце. Порушення в експресії циркадіальних генів та генів протеїнкіназ, які контролюють перебіг більшості метаболічних процесів в організмі, можуть бути причиною виникнення різних патологічних станів і сприяти виникненню зл�кисних новоутворень.

У зв'язку з цим дослідження експресії циркадіальних генів та генів протеїнкіназ, що контролюють основні метаболічні процеси в організмі, можуть бути чутливими маркерами біонебезпеки, у тому числі і показником шкідливої дії на організм хімічних забруднювачів довкілля.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gonze D., Goldbeter A. Circadian rhythms and molecular noise // *Chaos*. — 2006. — Vol. 16, № 2. — P. 026110 (1-11).
2. Dunlap J.C. Molecular bases for circadian clocks // *Cell*. — 1999. — 96, № 2. — P. 271-290.
3. Harmer S.L., Panda S., Kay S.A. Molecular bases of circadian rhythms // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 17.
4. Teboul M., Barrat-Petit M.A., Li X.M., Claustrat B., Formen- to J.L., Delaunay F., Levi F., Milano G. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells // *J. Mol. Med.* — 2005. — Vol. 83, № 9. — P. 693-699.
5. Eide E.J., Woolf M.F., Kang H. Control of mammalian circadian rhythm by CKI-epsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // *Mol. Cell. Biol.* — 2005. — Vol. 25, № 7. — P. 2795-2807.
6. 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, № 5724. — P. 1043-1045.
7. 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. — Vol. 386, PT 3. — P. 575-581.
8. 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. — Vol. 2, № 11. — P. E377.
9. Hogenesch J.B., Gu Y.Z., Jain S., Bradfield C.A. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally ac-

tive complexes with circadian and hypoxia factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1998. — Vol. 95, № 10. — P. 5474-5479.

10. Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism // *Science*. — 1998. — 280, Vol. 5369. — P. 1564-1569.

11. Tsinkalovsky O., Smaaland R., Rosenlund B., Sothorn R.B., Hirt A., Steine S., Badiie A., Abrahamsen J.F., Eiken H.G., Lamerum O.D. Circadian variations in clock gene expression of human bone marrow CD34+ cells // *J. Biol. Rhythms*. — 2007. — 22, № 2. — P. 140-150.

12. Grechez-Cassiau A., Rayet B., Guillaumond F., Teboul M., Delaunay F. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21waf1/cip1 expression and hepatocyte proliferation // *J. Biol. Chem.* — 2008. — 283, № 8. — P. 4535-4542.

13. You S., Wood P.A., Xiong Y., Kobayashi M., Du-Quinton J., Hrushesky W.J. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2005. — 91, № 1. — P. 47-60.

14. Chen S.T., Choo K.B., Hou M.F., Yeh K.T., Kuo S.J., Chang J.G. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers // *Carcinogenesis*. — 2005. — 26, № 7. — P. 1241-1246.

15. Winter S.L., Bosnoyan-Collins L., Pinnaduwege D., Andrusis I.L. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors // *Neoplasia*. — 2007. — 9, № 10. — P. 797-800.

16. Lee C.C. The circadian clock and tumor suppression by mammalian period genes. *Methods Enzymol.* — 2005. — 393. — P. 852-861.

17. 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. — 111, № 1. — P. 41-50.

18. Yeh K.T., Yang M.Y., Liu T.C., Chen J.C., Chan W.L., Lin S.F., Chang J.G. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma. *J. Pathol.* — 2005. — 206, № 1. — P. 111-120.

19. Shih H.C., Choo K.B., Chang T.J., Yang M.Y. et al. Disturbance of circadian gene expres-

sion in endometrial cancer: detection by real-time quantitative RT-PCR // *Oncol. Rep.* — 2005. — 14, № 6. — P. 1533-1538.

20. Gery S., Gombart A.F., Yi W.S., Koeffler C., Hofmann W.K., Koeffler H.P. Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukaemia // *Blood*. — 2005. — 106, № 8. — P. 2827-2836.

21. Chilov D., Hofer T., Bauer C., Wenger R.H., Gassmann M. Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain // *FASEB J.* — 2001. — 15, № 14. — P. 2613-622.

22. Vielhaber E., Eide E., Rivers A., Gao Z.H., Virshup D.M. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon // *Mol. Cell. Biol.* — 2000. — 20, № 13. — P. 4888-4899.

23. Keesler G.A., Camacho F., Guo Y., Virshup D., Mondadori C., Yao Z. Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport*. — 2000. — 11, № 5. — P. 951-955.

24. Gietzen K.F., Virshup D.M. Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon // *J. Biol. Chem.* — 1999. — 274, № 45. — P. 32063-32070.

25. 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. — 280, № 29. — P. 26863-26872.

26. Okamura A., Iwata N., Tamakane A., Yakushijin K., Nishikawa S., Hamaguchi M., Fukui C., Yamamoto K., Matsui T. Casein kinase 1 epsilon down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells // *Life Sci.* — 2006. — 78, № 14. — P. 1624-1629.

27. Waddell D.S., Liberati N.T., Guo X., Leal J.F., Carnero A. Casein kinase I epsilon plays a functional role in the transforming growth factor-beta signaling pathway // *J. Biol. Chem.* — 2004. — 279, № 28. — P. 29236-29246.

28. 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 // *J. Biol. Chem.* — 2002. — 277, № 19. — P. 17248-17254.

29. Akashi M., Tsuchiya Y,

Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase 1 epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells // *Mol. Cell. Biol.* — 2002. — 22, № 6. — P. 1693-1703.

30. Gao Z.H., Seeling J.M., Hill V., Yochum A., Virshup D.M. Casein kinase 1 phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2002. — 99, № 3. — P. 1182-1187.

31. Rubinfeld B., Tice D.A., Polakis P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1 epsilon // *J. Biol. Chem.* — 2001. — 276, № 42. — P. 39037-39045.

32. Desagher S., Osen-Sand A., Montessuit S., Magnenat E., Vilbois F., Hochmann A., Journot L., Antonsson B., Martinou J.C. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8 // *Mol. Cell.* — 2001. — 8, № 3. — P. 601-611.

33. Knippschild U., Milne D.M., Campbell L.E., DeMaggio A.J., Christenson E., Hoekstra M.F., Meek D.W. 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. — 15, № 14. — P. 1727-1736.

34. Miyazaki K., Nagase T., Mesaki M., Narukawa J., Ohara O., Ishida N., Narukawa J., Ohara O., Ishida N. Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts // *Biochem. J.* — 2004. — 380, PT 1. — P. 95-103.

35. 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. — 38, № 3. — P. 312-319.

36. 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. — № 72. — P. 413-420.

37. Motzkus D., Loumi S., Cadenas C., Vinson C., Forsmann W.G., Maronde E. Activation of human period-1 by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways // *Chronobiol. Int.* —

2007. — 24, № 5. — P. 783-792.

38. Laposky A.D., Bass J., Kohsaka A. et al. Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism // *FEBS Lett.* — 2008. — Vol. 582 (1). — P. 142-151.

39. Яворовський О.П., Зенкіна В.І. Метил-третбутиловий ефір як глобальний забруднювач довкілля. Токсикологічні та екологічні аспекти ризику впливу в Україні // *Довкілля та здоров'я.* — 2006. — С. 75-80.

40. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O., Oguira 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, № 1. — P. 14-20.

41. Dardente H. Synchronization and genetic redundancy in circadian clocks // *Med. Sci. (Paris).* — 2008. — Vol. 24, № 3. — P. 270-276.

42. Panda S., Hogenesch J.B., Kay S.A. Circadian rhythms from flies to human // *Nature.* — 2002. — Vol. 417. — P. 329-335.

43. Gori M., Merrow M., Hutner B., Johnson J., Roenneberg T., Brunner M. A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa* // *EMBO J.* — 2001. — Vol. 20. — P. 7074-7084

44. Yang Y., Cheng P., Liu Y. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II // *Genes Dev.* — 2002. — Vol. 16. — P. 994-1006.

45. Price J.L., Blau J., Rothenfluh A., Abodeely M., Kloss B., Young M. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation // *Cell.* 1998. 94. — P. 83-95.

46. Martinek S., Inonog S., Manoukian A.S., Young M.W. A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock // *Cell.* — 2001. — Vol. 105. — P. 769-779.

47. Takano A., Shimizu K., Kani S., Buijs R.M., Okada M., Nagai K. Cloning and characterization of rat casein kinase 1epsilon // *FEBS Lett.* — 2000. — Vol. 477. — P. 106-112.

48. Eide E.J., Virshup D.M. Casein kinase I: another cog in the circadian clockworks // *Chronobiol. Int.* — 2001. — Vol. 18. — P. 389-398.

49. Eide E.J., Vielhaber E.L., Hinz W.A., Virshup D.M. The cir-

cadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon. *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 17248-17254.

50. Okamura H., Miyake S., Sumi Y., Yamaguchi S., Yasui A., Muijtjens M., Hoeijmakers J.H., van der Horst G.T. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cryptodeficient mice lacking a biological clock // *Science.* — 1999. — Vol. 286. — P. 2531-2534.

51. Yagita, K., Tamanini, F., Yasuda, M., Hoeijmakers, J.H., van Der Horst, G.T., Okamura, H. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein // *EMBO J.* — 2002. — Vol. 21. — P. 1301-1314.

52. Oster H., Yasui A., van der Horst G.T., Albrecht U. Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice // *Genes Dev.* — 2002. — Vol. 16. — P. 2633-2638.

53. Kim E.Y., Edery, I. Balance between DBT/CKI epsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — Vol. 103. — P. 6178-6183.

54. Gallego M., Kang H., Virshup D.M. Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2 // *Biochem. J.* — 2006. — Vol. 399. — P. 169-175.

55. Takahashi, J.S. Finding new clock components: past and future // *J. Biol. Rhythms.* — 2004. — Vol. 19. — P. 339-347.

56. Guillaumond F., Dardente H., Giguere V., Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors // *J. Biol. Rhythms.* — 2005. — Vol. 20. — P. 391-403.

57. Ueda H.R., Chen W., Adachi A., Wakamatsu H. A transcription factor response element for gene expression during circadian night // *Nature.* — 2002. — Vol. 418, — P. 534-539.

58. Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals // *Nature.* — 2002. — Vol. 418. — P. 935-941.

59. Akashi M., Takumi T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 12. — P. 441-448.

60. Shimba S., Ishii N., Ohta Y., Ohno T., Watabe Y., Hayashi M., Wada T., Aoyagi T., Tezuka M. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102, — P. 12071-12076.

61. Filipski E., King V.M., Li X., Granda T.G., Mormont M.C., Liu X., Claustrat B., Hastings M.H., Levi F. Host circadian clock as a control point in tumor progression // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2002. — 94, Vol. 9. — P. 690-697.

62. Mormont M.C., Levi F. Circadian-system alterations during cancer progress: a review // *Int. J. Cancer.* — 1997. — 70, № 2. — P. 241-247.

63. Мінченко О.Г., Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Завгородній І.В., Паустовський Ю.О., Тсучігара К., Есумі Г. Експресія казеїнкінази-1ε та SNARK у печінці, легенях та міокарді як показник впливу метил-третбутилового ефіру на організм лабораторних тварин // *Науковий вісник НМУ ім. О.О. Богомольця.* — 2008. — № 2-3. — P. 21-27.

64. Minchenko D.O., Mykhalchenko V.G., Tsuchihara K., Kanehara S., Yavorovsky O.P., Zavgorodny I.V., Paustovsky Y.O., Komisarenko S.V., Esumi H., Minchenko O.H. Unique alternative splice variants of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 mRNA // *Укр. біохім. журн.* — 2008. — Т. 80, Vol. 4. — С. 66-73.

65. Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Завгородній І.В., Паустовський Ю.О., Тсучігара К., Есумі Г., Мінченко О.Г. Експериментальні дані щодо порушення експресії циркадальних генів у печінці та легенях як показник токсичної дії метил-третбутилового ефіру на організм // *Укр. ж. з проблем медицини праці.* — 2008. — № 3 (15). — С. 20-26.

Надійшло до редакції 05.10.08.