

которая является высоко консервативной среди эукариотических и прокариотических медь-транспортирующих АТФаз [2, 3].

При секвенировании 15 экзона идентифицирована мутация I1102T (рис.). Мутация I1102T проявлялась клинически ранним (до 15-ти лет) поражением печени.

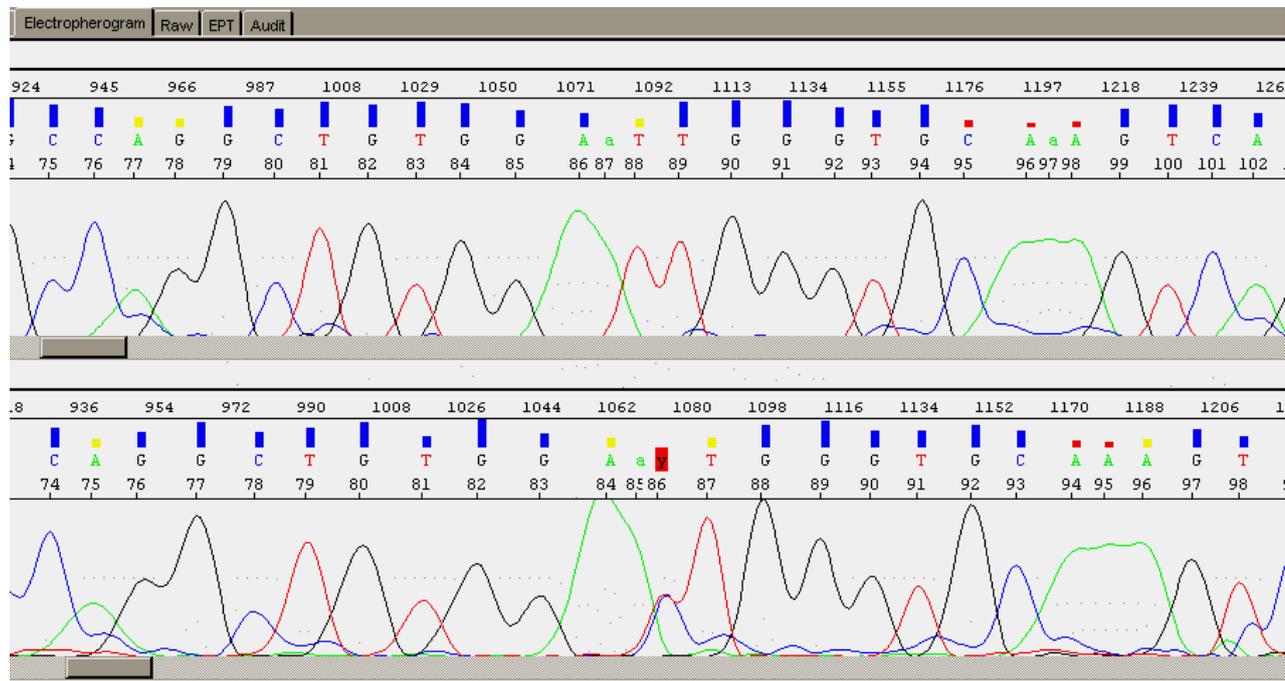


Рис. Секвенирование 15-го экзона гена АТР 7 В. Верхний ряд соответствует нормальной последовательности; нижний ряд содержит замену Т-А в позиции 1086 (красный маркер).

В результате проведенного исследования удалось полностью установить генотип у 44% обследованных пациентов. Наличие хотя бы одного мутантного аллеля удалось идентифицировать у 91% обследованных пациентов. Исследование мутаций при БКВ дает очень важную диагностическую информацию, дополняющую результаты биохимических и клинических методов исследования.

1. K. Petrukhin, S. G. Fischer, M. Pirastu et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene // Nature Genetics. – 1993. – V. 5. – P. 338-343.
2. S. Vrabelova, O. Letocha, M. Borsky, L. Kozak Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease // Molecular Genetics and Metabolism. – 2005. – V. 86. – P. 277-285.
3. M. Dijkstra, G. I. Veld, G. J. van den Berg Adenosine triphosphate-dependent copper transport in isolated rat liver plasma membranes // J. Clin. Invest. – 1995. – V. 95. – P. 412-416.

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОСТРУКТУР

Е.В. Жорник, Л.А. Баранова, В.П. Емельянова, И.Д. Волотовский

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

wico@rambler.ru

Последнее десятилетие характеризуется стремительным развитием нанотехнологий. На сегодняшний день их влияние ощущается повсюду. Достижения нанотехнологии применяются в различных медицинских областях, например в онкологии и сердечно-сосудистой медицине. Нанотехнологии используются для изучения биомаркеров, в молекулярной диагностике, в области доставки лекарственных препаратов [1]. Некоторые наночастицы находят свое применение в промышленном использовании.

Не вызывают сомнений преимущества использования нанотехнологий, однако на сегодняшний день и сторонники, и противники не пришли к единому мнению о том, насколько безопасно использование наночастиц.

Потенциальная токсичность для человека, связанная с наноматериалами и наночастицами, привела к необходимости изучения риска, связанного с их влиянием на организм человека, а именно на гены, ответственные за ряд важных функций организма. Пристальное внимание ученых обращено на генотоксические свойства различных типов частиц и их роль в патогенезе различных заболеваний [2].

В качестве наночастиц, используемых в нанотехнологиях, применяются как природные компоненты, такие как Fe_2O_3 , ZrO_2 , Al_2O_3 , Si_3N_4 , Ag, TiO_2 , так и искусственно синтезированные, например углеродные нанотрубки. На сегодняшний день имеется ограниченное количество работ, посвященных изучению влияния углеродных нанотрубок на животных и человека. Поэтому таким важным является изучение потенциальных токсических эффектов углеродных нанотрубок на живые организмы, а в частности на генетический аппарат клетки.

Было показано, что как одностенные нанотрубки, так и многостенные нанотрубки оказывают влияние на ряд важных клеточных функций. Взаимодействие наночастицы с поверхностью клетки приводит к возникновению окислительного стресса, высвобождению провоспалительных цитокинов, снижению клеточной жизнеспособности [3]. Окислительный стресс приводит к активации различных транскрипционных факторов, а это влечет изменение экспрессии генов, ассоциированных с основными клеточными функциями. В этой связи методом ПЦР в реальном времени было изучено влияние углеродных наночастиц на экспрессию генов маркеров воспалительных реакций $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и IL-8 в лимфоцитах человека.

В ходе проведения экспериментов в качестве наночастиц использовались многостенные углеродные нанотрубки длиной 0,5-30 мкм с рабочей концентрацией 100 мкг/мл. В качестве объектов использовали матрицы кДНК, синтезированные на основе РНК. РНК выделялась из лимфоцитов периферической крови доноров после их инкубации с искусственными наноструктурами. Изучалось краткосрочное влияние нанотрубок на гены маркеров воспалительных реакций, инкубация с наноструктурами осуществлялась в течение 0,5, 1, 3 и 6 часов. В качестве контроля использовались аналогичные образцы, не обработанные наночастицами.

Изучение экспрессии генов проводили на амплификаторе в режиме реального времени MiniOpticon, BioRad (США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовались праймеры, специфические к генам $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и IL-8 . Реакционная смесь в объеме 15 мкл содержала 100 нг кДНК, 200 нМ dNTP, 10x High Fidelity PCR Buffer, 1 ед Taq-полимеразы производства Fermentas (Литва), 3,5 мМ MgCl_2 для праймеров $\text{TNF-}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ и 5,5 мМ MgCl_2 для праймеров IL-8 , 1x SYBR Green I и по 10 пмоль каждого праймера.

Было показано, что в качестве гена внутреннего контроля при работе с лимфоцитами предпочтительнее использовать ген 18S субъединицы рРНК, уровень экспрессии которого является практически неизменным при различных условиях проведения эксперимента (рис. 1 и рис. 2).

ПЦР в реальном времени позволил дать количественную оценку уровня экспрессии каждого из исследуемых генов. В ходе проведения экспериментов было выявлено увеличение экспрессии исследуемых генов со временем. Для гена $\text{TNF-}\alpha$ рост уровня экспрессии наблюдался, начиная с образца, подверженного действию углеродными нанотрубками в течение 0,5 часа, для гена $\text{IL-1}\beta$ - начиная с образца, подверженного часовой обработке наночастицами, а для гена IL-8 значимое увеличение уровня экспрессии было показано лишь в образцах, подвергшихся действию нанотрубок не менее 3 часов.

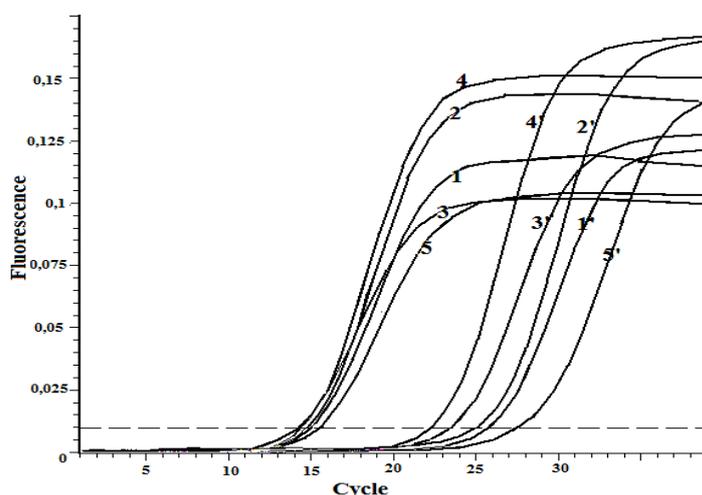


Рис. 1. График данных флуоресценции 18sRNA и TNF- α при проведении ПЦР в реальном времени. 1-кривая флуоресценции 18sRNA образца, подверженного влиянию нанотрубок в течение 0,5 ч., 2 - 1 ч., 3 - 3 ч., 4 - 6 ч., 5 - кривая флуоресценции образца, не подверженного влиянию нанотрубок; 1'-кривая флуоресценции TNF- α образца, подверженного влиянию нанотрубок в течение 0,5 ч., 2'- 1 ч., 3'- 3 ч., 4'- 6 ч., 5'- кривая флуоресценции образца, не подверженного влиянию нанотрубок.

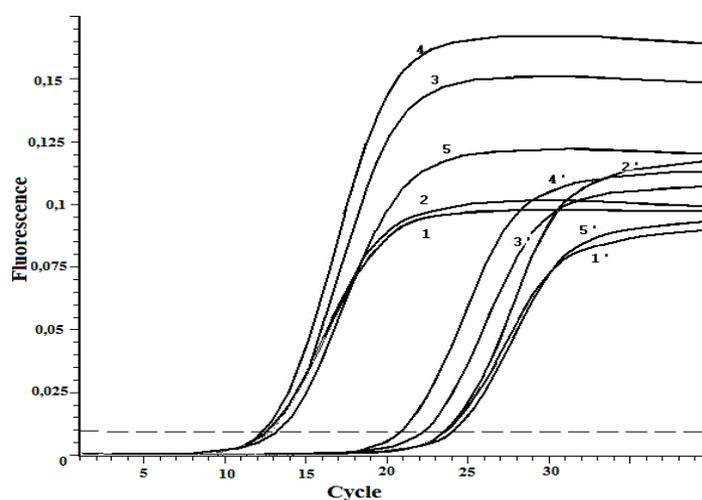


Рис. 2. График данных флуоресценции 18sRNA и И-8 при проведении ПЦР в реальном времени. 1-кривая флуоресценции 18sRNA образца, подверженного влиянию нанотрубок в течение 0,5 ч., 2 - 1 ч., 3 - 3 ч., 4 - 6 ч., 5 - кривая флуоресценции образца, не подверженного влиянию нанотрубок; 1'-кривая флуоресценции И-8 образца, подверженного влиянию нанотрубок в течение 0,5 ч., 2'- 1 ч., 3'- 3 ч., 4'- 6 ч., 5'- кривая флуоресценции образца, не подверженного влиянию нанотрубок.

Проведенные эксперименты подтвердили, что углеродные нанотрубки обладают генотоксическим действием. В соответствие с полученными данными можно предположить, что нанотрубки способны индуцировать в клетке окислительный стресс, что в свою очередь приводит к активации транскрипционных факторов, контролирующих транскрипцию провоспалительных генов. В ответ на действие TNF- α происходит активация факторов транскрипции NF- κ B, AP-1, которые в свою очередь регулируют активность некоторых генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов, таких как И-1 β и И-8 и других медиаторов воспаления и индуцирует программированную гибель клетки.

1. C. Medina, M. J. Santos-Martinez, A. Radomski Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance // British Journal of Pharmacology. 2007. P. 1-7.
2. G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy//Particle and Fibre Toxicology. 2005. V. 2. P. 8-43.
3. O. Zeni, R. Palumbo, R. Bernini et al. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes // Sensors. 2008. № 8. P. 488-499.