

**ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ**

Ասատրյան Անուշ Լևոնի

**Ցիսպլատինի ազդեցությունը պոլի(ԱԿՖ-
ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվության կարգավորման վրա
տարբեր հասակի և սեռի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի
բջջակորիզներում**

Ա Տ Ե Ն Ա Խ Ո Ս ՈՒ Թ Յ ՈՒ Ն

**Գ.00.04 - Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման**

**Գիտական ղեկավար՝
ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր, Է.Ս.Գևորգյան**

Երևան 2016

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ.....	4
ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ.....	5
ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ.....	11
1.1. Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազների (ՊԱՌՊ) ընտանիք.....	11
1.2. ՊԱՌՊ 1-ի նշանակությունը քրոմատինի կառուցվածքի և ֆունկցիաների կարգավորման մեջ.....	16
1.3. ՊԱՌՊ –ի արգելակիչների կենսաբանական դերը.....	21
1.3.1. Բենզամիդը և նրա ածանցյալները որպես ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային արգելակիչներ ..	24
1.4. Ցիսպլատինի ազդեցության մեխանիզմները	27
1.4.1. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա	32
1.5. Դեղամիջոցների ազդեցության սեռական և հասակային տարբերությունները.....	33
1.5.1. Դեղերի բաշխումն օրգանիզմում.....	34
1.5.2. Դեղերի մեթաբոլիզմի կարգավորումը լյարդում.....	36
1.5.3. Դեղամիջոցների հեռացումն օրգանիզմից	40
ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ	42
2.1. Կորիզների անջատում.....	42
2.2. ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորումը մեկուսացված կորիզներում.....	43
2.3. ԴՆԹ-ի անջատում.....	43
2.4. ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզ.....	44
2.5. Ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման ինտենսիվության որոշում	44
2.6. Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվության որոշում	45
2.7. Իմունանույնականացում (Western-blotting)	46
2.8. Լուսային մանրադիտակում	47
2.9. Վիճակագրական վերլուծություն.....	47
ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ և ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ	48

3.1. Ցիսալատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում	48
3.2. ՊԱՌՊ 1-ի ալոստերիկ և մրցակցային արգելակիչների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիսալատինի ներարկումից հետո.....	54
3.3. Ցիսալատինի ազդեցությունը քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման բնույթի վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում	61
3.4. Ցիսալատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում.....	70
3.5. ՊԱՌՊ 1-ի ալոստերիկ և մրցակցային արգելակիչների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսալատինի ներարկումից հետո.....	77
3.6. Ցիսալատինի ազդեցությունը ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա թիմոցիտների կորիզներում	85
ԱՄՓՈՓՈՒՄ.....	89
ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ	94
ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ	96

ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

ՊԱՌՊ 1 - պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1

ԲԱՄ – բենզամիդ

ՆԱԴ – նիկոտինամիդադենինդինուկլեոտիդ

ՊԱՌ – պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)

BRCT – կրծքագեղձի քաղցկեղ-ասոցված սպիտակուցի C-ձայրային դոմեն

NAMPT - նիկոտինամիդֆոսֆոռիբոզիլտրանսֆերազ

NMNAT - նիկոտինամիդնոնուկլեոտիդ ադենիլիլտրանսֆերազ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Խնդրի արդիականությունը: Ուռուցքագոյացման բազմափուլ գործընթացի հիմքում ընկած է այս կամ այն բջջային պոպուլյացիայի անվերահսկելի աճը: Բջիջների քանակի համեմատաբար կայուն մեծությունը (բջջային հոմեոստազը) հյուսվածքներում և օրգաններում ապահովում են երկու հակամետ գործընթացներ՝ բջիջների բազմացումն և ծերացած, վնասված բջիջների մահը: Այս գործընթացների հավասարակշռությունն ապահովում է հյուսվածքների և օրգանների բնականոն գործունեությունը: Ուռուցքների առաջացումը պայմանավորված է կամ բջջային բազմացման գերակտիվացմամբ, կամ բջիջների հեռացման մեխանիզմների խաթարմամբ: Հայտնի է, որ բջիջների թե՛ բազմացման, թե՛ մահվան գործընթացներում առանցքային դեր է կատարում պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1 (ՊԱՌՊ 1) կորիզային ֆերմենտը [Hassa et al., 2006]: ՊԱՌՊ 1-ը, հանդիսանալով քրոմատինի հետ կապված հիմնական կորիզային գործառույթների ակտիվ մասնակից, մեծ դեր է կատարում բջիջների չարորակ վերափոխման ժամանակ և ախտահարված բջիջների վերացման խնդրում: Մյուս կողմից, այն առանցքային նշանակություն ունի ԴՆԹ-ի վնասվածքների վերականգնման գործընթացներում և, մեծացնելով ուռուցքային բջիջների կենսունակությունը, նվազեցնում է հակաուռուցքային դեղամիջոցների արդյունավետությունը: ՊԱՌՊ 1-ի երկակի դերը դրսևորվում է նրանում, որ բացի վերը նշված վերականգնողական գործունեությունից, ֆերմենտը մասնակցում է նաև բջջային մահն իրականացնող գրեթե բոլոր հայտնի գործընթացներին (ապոպտոզ, նեկրոզ, կարգավորված նեկրոզ, աուտոֆագիա): ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորումը մեծ նշանակություն ունի բջջային հոմեոստազի խախտման հետ կապված ախտածին իրավիճակներում՝ բորբոքումներ, ուռուցքագոյացում, նեյրոդեգեներատիվ փոփոխություններ, ուղեղի և սրտի կաթվածներ: Դրանով էլ պայմանավորված է գիտական մտքի սևեռուն ուշադրությունը ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների հանդեպ, որոնք մեծացնում են թվարկված հիվանդությունների բուժման արդյունավետությունը:

Քաղցկեղի բուժման ժամանակ կիրառվող դեղանյութերը, որպես կանոն, խիստ ցիտոտոքսիկ են և դրանց արդյունավետությունը սահմանափակվում է այն հանգամանքով, որ ուռուցքային բջիջների հետ համատեղ ազդեցության թիրախ են դառնում օրգանիզմի առողջ բջիջները: Այս պարագայում հատուկ նշանակություն է ձեռք բերում դեղամիջոցների ուղղորդված հակաուռուցքային արդյունավետության մեծացման ուղիների պարզաբանումը: Արդիական մոտեցումներից մեկը ԴՆԹ-վնասող դեղամիջոցների և ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների համատեղ կիրառումն է [Curtin, Szabo, 2013]: ՊԱՌՊ 1-ի որոշ արգելակիչներ, անցնելով նախակլինիկական փորձարկումների փուլը, արդեն կիրառվում են կրծքագեղձի քաղցկեղի բուժման ժամանակ [Megnin-Chanet et al., 2010]:

Ցիսպլատինը ամենահզոր և տարածված հակաուռուցքային դեղամիջոցներից մեկն է: Հայտնի է, որ փոխազդելով կորիզային ԴՆԹ-ի հետ, այն խախտում է քրոմատին-կապված ֆունկցիաները՝ դատապարտելով բջիջը մահվան [Clark et al., 2012]: Ցիսպլատին-ԴՆԹ ածանցյալների առաջացումը հանգեցնում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացմանը, որի շնորհիվ խթանվում է ԴՆԹ-ի վերականգնումը: ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները ոչ միայն ճնշում են ՊԱՌՊ 1-ի մասնակցությամբ ընթացող ԴՆԹ-ի վերականգնման գործընթացներն, այլև ճնշում են գլյուկոզի էներգետիկ ճեղքավորումը և ուռուցքային բջիջներում դրսևորում հակամեթաբոլիկ հակաուռուցքային դեղամիջոցներին բնորոշ ազդեցություն: ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների նախա- և կլինիկական փորձարկումների արդյունքները ցույց տվեցին, որ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման բուժիչ ներգործությունը տարբեր է արական և իգական սեռերի մոտ [Peralta-Leal et al., 2009]: Դեղամիջոցների ազդեցության տարիքային առանձնահատկությունները և ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների ազդեցության սեռական դիմորֆիզմը առաջ են քաշում այնպիսի դեղաբուժական մոտեցումների մշակման անհրաժեշտությունը, որոնք կարևորում են սեռական և տարիքային գործոնները:

Ցիսպլատինի ցիտոտոքսիկ ներգործությունը դրսևորվում է ոչ միայն ուռուցքային, այլև առողջ բջիջներում: Դրա հետևանքով երևան են գալիս դեղամիջոցի վնասակար ազդեցության հետևանքները (սրտխառնոց, փսխում, մազաթափություն, սակավարյունություն, երիկամային անբավարարություն, նեյրոտոքսիկ երևույթներ և

այլն): Հայտնի է, որ կաթնասունների օրգանիզմներում քսենոբիոտիկների, այդ թվում դեղամիջոցների, վնասագերծման և մեթաբոլիկ վերամշակման կարևորագույն օրգաններն են ուրցագեղձը և լյարդը: Ներկա ատենախոսությունը, ելնելով հարցի արդիականությունից, նվիրված է ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների ազդեցության ուսումնասիրությանը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում ցիսպլատինի ներարկումից հետո:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Ներկայացվող աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորման առանձնահատկությունները տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում: Մեր արջև դրված էին հետևյալ խնդիրները.

- ուսումնասիրել ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը սեռահասուն (10 շաբաթական) և ոչ սեռահասուն (6 շաբաթական) արու և էգ առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում

- հետազոտել ՊԱՌՊ 1-ի ալոստերիկ (ԱԵՖ) և մրցակցային (բենզամիդ) արգելակիչների ազդեցությունը տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում

- ուսումնասիրել ցիսպլատինի in vivo ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում

- հետազոտել ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների արդյունավետությունը տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում ցիսպլատինի ներարկումից հետո

- ուսումնասիրել ցիսպլատինի ազդեցությունը տարբեր սեռի և հասակի առնետների ուրցագեղձի տոքսիկ հետաճի վրա

- ուսումնասիրել ցիսպլատինի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման ինտենսիվության վրա առնետի լյարդի բջջակորիզներում

Աշխատանքի գիտական նշանակությունը և նորույթը: Աշխատանքում առաջին անգամ ցույց է տրված, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունն ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում դրսևորում է սեռական դիմորֆիզմ, ինչը բացակայում է թիմոցիտների կորիզներում: Կենդանիների սեռական հասունացման արդյունքում ի հայտ է գալիս ֆերմենտի ակտիվության կտրուկ նվազում և, միաժամանակ, լյարդի բջջակորիզներում դիտվող ֆերմենտի ակտիվության սեռական տարբերությունները վերանում են: Ցույց է տրված նաև այն, որ լյարդի բջջակորիզներում ֆերմենտի մրցակցային արգելակիչ բենզամիդի և ալոստերիկ արգելակիչ ԱԵՖ-ի միջոցով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության արգելակման գործընթացներում սեռական դիմորֆիզմ չի դրսևորվում, սակայն ի հայտ են գալիս հասակային հստակ տարբերություններ: Մրցակցային արգելակիչը շատ ավելի մեծ արդյունավետություն է ցուցաբերում սեռահասուն, իսկ ալոստերիկ արգելակիչը՝ ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում:

Սեռից անկախ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության հակամետ փոփոխություններ են դիտվում ցիսպլատինի ներարկումից հետո ոչ սեռահասուն և սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում. ֆերմենտի ակտիվությունը ճնշվում է ոչ սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում և խթանվում սեռահասուն առնետների մոտ: Հատկանշական է, որ թիմոցիտների կորիզների դեպքում ի հայտ է գալիս սեռական դիմորֆիզմ՝ ցիսպլատինի կողմից ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվություն խթանող ազդեցություն դիտվում է միայն էգ առնետների մոտ:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ցիսպլատինի ներարկումը տարբեր հասակի կենդանիներին տարաբնույթ ազդեցություն է թողնում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա վերը նշված արգելակիչների ներգործության արդյունավետության առումով: Ոչ սեռահասուն առնետների մոտ ցիսպլատինը չի ազդում արգելակիչների արդյունավետության վրա, մինչդեռ սեռահասուն կենդանիների մոտ ալոստերիկ արգելակիչ ԱԵՖ-ի արդյունավետությունը և՛ լյարդի, և՛ թիմոցիտների կորիզներում մեծանում է, իսկ մրցակցային արգելակիչ բենզամիդի արդյունավետությունը լյարդի բջջակորիզներում նվազում է, թիմոցիտների կորիզներում՝ մնում անփոփոխ: Աշխատանքում ցույց է տրված, որ ՊԱՌՊ 1-ի տրանսմոդիֆիկացնող և

ինքնամոդիֆիկացնող ակտիվությունների մեծությունը փոխվում է կախված կենդանիների հասակից և ցիսպլատինի in vivo ազդեցությունից: Սեռահասուն առնետների մոտ, ամենայն հավանականությամբ, գերակայություն է ստանում տրանսամոդիֆիկացնող բաղադրիչը:

Գիտական նորույթ է այն, որ ցիսպլատինի in vivo ազդեցությամբ հարուցած ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ուղեկցվում է ԴՆԹ –ի ճեղքավորման ինտենսիվության կտրուկ աճով, ինչը վկայում է քրոմատինի ապակոնդենսացման մասին: Եզրակացվում է, որ վերջինս կարող է լինել երկու կենսաքիմիական գործընթացների հետևանք՝ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացման և ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալների կողմից ԴՆԹ-ի ապապարուրման: Ի տարբերություն ցիսպլատինի, ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային և ալոստերիկ արգելակիչները նվազեցնում են ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման ինտենսիվությունը, ինչը բնորոշ է քրոմատինի կոնդենսացված վիճակին:

Ցույց է տրված նաև, որ թիմոցիտների կորիզներում ցիսպլատինի ազդեցության տակ ապոպտոզին բնորոշ ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորում չի դիտվում: Եզրակացվում է, որ ուրցագեղձի տոքսիկ հետաճի հետ կապված դեգեներատիվ փոփոխությունները պայմանավորված են ոչ թե բջիջների ապոպտոզով, այլ նեկրոզով:

Աշխատանքի գործնական արժեքը: Հայտնի է, որ ՊԱՌՊ 1 –ի արգելակումը մեծացնում է այնպիսի ծանր հիվանդությունների բուժման արդյունավետությունը, ինչպիսիք են ուղեղի և սրտամկանի կաթվածները, բակտերիալ տոքսիկ շոկը, Ալցհեյմերի, Պարկինսոնի հիվանդությունները և չարորակ նորագոյացությունները [Anwar et al., 2015]:

Ներկայումս ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման մեխանիզմների ուսումնասիրությունը և նոր արգելակիչների մշակումը համարվում է կարևոր գործնական խնդիր: Հայտնի է, որ չարորակ նորագոյացությունների բուժման ընթացքում ցիսպլատինի ցիտոտոքսիկ ազդեցության արդյունավետությունը մեծացնելու նպատակով կիրառվում են ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները [Curtin, Szabo, 2013]: Համատեղ կիրառության ժամանակ դեղամիջոցները կարող են դրսևորել սիներգիկ, ադիտիվ կամ անտագոնիստական փոխազդեցություններ: Ի լրումն, դեղամիջոցների ազդեցությունն ունի արտահայտված

կախվածություն հիվանդի սեռից և հասակից: Ներկայումս առաջ է քաշվում անձնականացված դեղաբուժական մոտեցումների անհրաժեշտությունը, ինչը թույլ կտա մեծացնել բուժման արդյունավետությունը, նվազեցնելով դեղամիջոցների անցանկալի կողմնակի ազդեցություններն առողջ օրգան-համակարգերի վրա: Այս տեսակետից կատարված հետազոտությունները, որոնք նվիրված են ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների և ցիտալատինի համատեղ ազդեցությանը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության և քրոմատինի կառուցվածքի վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների թիրախային օրգանների բջջակորիզներում, ունեն մեծ գործնական նշանակություն, և ստացված արդյունքները կարող են կիրառվել արդյունավետ բուժիչ սխեմաների մշակման համար:

Աշխատանքի ապրոբացիան: Կատարված հետազոտությունների արդյունքները ներկայացվել են մի շարք գիտաժողովներում՝ Международная Пушчинская Школа-Конференция Молодых Ученых «Биология - Наука XXI Века», Пушкино, 2012, 2015, 2016; Юбилейная Десятая Годичная Научная Конференция Российско-Армянского (Славянского) университета, Ереван, 2015; International Conference “Physical Concepts Of Nucleic –Acid Structure And Behavior”, Yerevan, 2013; New Aspects in Molecular Biotechnology and Biochemistry, Yerevan, 2013; Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության զարգացման հեռանկարներ-4", Երևան, 2013:

Տպագրված աշխատանքները: Ատենախոսական աշխատանքի թեմայով կատարված հետազոտությունների արդյունքները տպագրվել են 15 աշխատանքներում՝ 8 գիտական հոդվածներում և 7 գիտական թեզիսներում:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Ատենախոսական աշխատանքը կազմված է ներածությունից, երեք գլուխներից՝ գրական ակնարկ, նյութեր և մեթոդներ, արդյունքներ և դրանց քննարկումը, ամփոփումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը ներառում է 36 նկար և 2 աղյուսակ: Աշխատանքի ծավալը կազմում է 109 համակարգչային էջ:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

1.1. Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազների (ՊԱՌՊ) ընտանիք

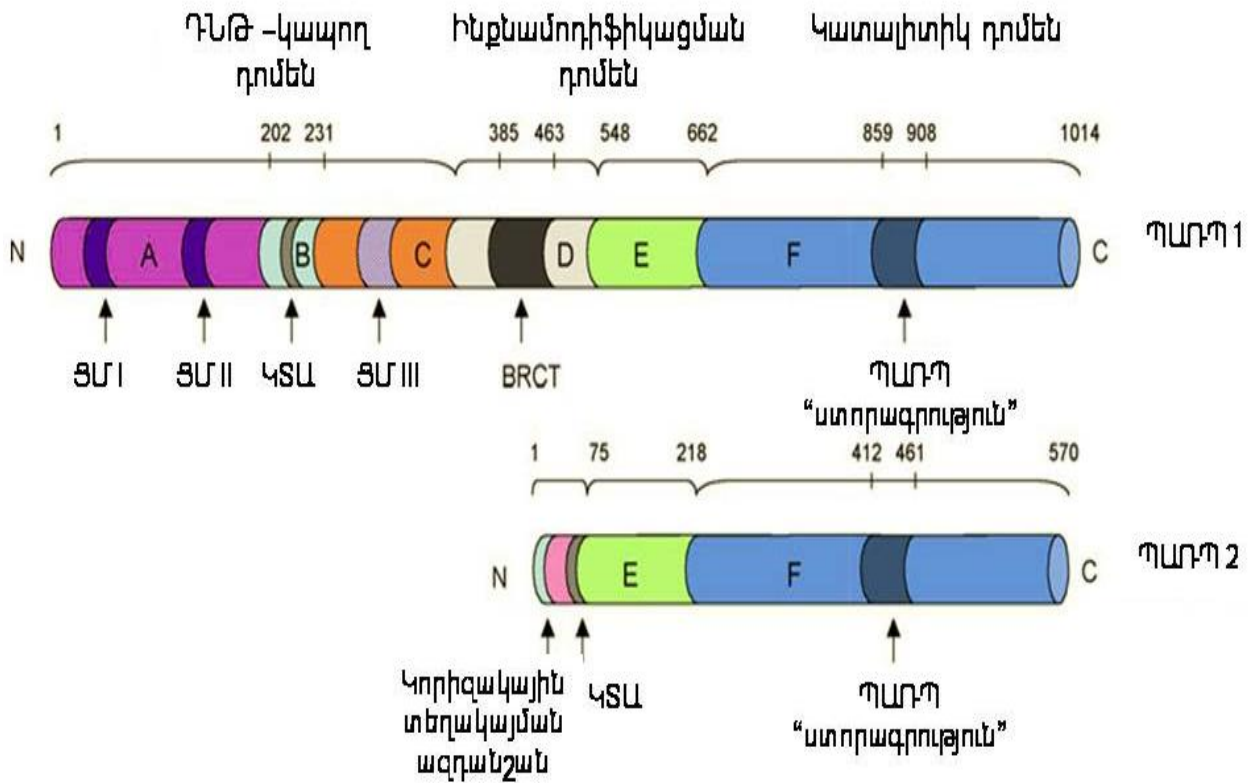
Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ ֆերմենտը (EC 2.4.2.30) հայտնաբերվել է Շամբոնի կողմից 60-ականներին [Chambon et al., 1963]: Մինչ այժմ նկարագրվել են ևս 17 ֆերմենտներ, որոնք դասվում են (ԱԿՖ-ռիբոզ)տրանսսֆերազների կամ պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ) սինթետազների ընտանիքին: ՊԱՌՊ-սպիտակուցների դասակարգումը կատարվում է ըստ դրանց կազմում առկա ֆունկցիոնալ դոմենների կամ ըստ մոլեկուլների հիմնարար ֆունկցիաների: ՊԱՌՊ 1 և 2-ը դասակարգվում են որպես ԴՆԹ-կախյալ պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազներ, որոնք իրականացնում են ԴՆԹ-ի միաշղթա խզումների ճանաչումը (նիք-սենսոր են) և մասնակցում են ԴՆԹ-ի վնասվածքների նորոգման բոլոր հայտնի գործընթացներին՝ հիմքերի հեռացում (BER), ոչ համընկնող հիմքերի հեռացում (MER), նուկլեոտիդների հեռացում (NER) և հոմոլոգ վերախմբավորում (HR): ՊԱՌՊ 1 և 2-ը գտնվում են բացառապես բջջակորիզում և դրանց բաժին է ընկնում ընդհանուր բջջային պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազային ակտիվության 90%-ը, ընդ որում ՊԱՌՊ 2-ի ակտիվությունը կազմում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության 1%-ը: Ընտանիքի մեջ են մտնում տանկիրազներ 1 և 2-ը, որոնք մասնակցում են թելոմերների երկարացման գործառույթներին, ցիտոպլազմային ՊԱՌՊ-երը, որոնց բնորոշ են ցիստեին-ցիստեին –հիստիդին տիպի ցինկ-մատներ և վոլտ-ՊԱՌՊ-երը՝ առայժմ չբացահայտված ֆունկցիաներով: ՊԱՌՊ 3 և ՊԱՌՊ 10-ը իրականացնում են ՊԱՌՊ 1-ի և հիստոնների մոնո(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացում [He et al., 2010]: ՊԱՌՊ-երի ընտանիքի բոլոր անդամներին հատուկ է էվոլյուցիոն խիստ պահպանողական կառուցվածք ունեցող կատալիտիկ դոմենը, որին կապվում է սուբստրատ ՆԱԴ⁺-ը, կատարվում է դրա քայքայումը նիկոտինամիդի և (ԱԿՖ-ռիբոզ)ային մնացորդի՝ վերջինիս տեղափոխումով սպիտակուցների վրա: (ԱԿՖ-ռիբոզ)ային մնացորդները նախ և առաջ տեղափոխվում են ՊԱՌՊ 1-ի ինքնամոդիֆիկացման դոմենում գտնվող լիզինային, գլյուտամինային և ասպարագինային մնացորդների վրա, իրականացնելով ֆերմենտի

ինքնամոդիֆիկացումը: Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)ային պոլիմերային պոչիկը սպիտակուցներից հեռացվում է ՊԱՌԳ՝ պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)գլիկոհիդրոլազ ֆերմենտի կողմից:

ՊԱՌՊ 1-ը ամենատարածված ոչ հիստոնային կորիզային սպիտակուցն է, որի քանակությունը բջջում կազմում է 10^5 - 10^6 մոլեկուլ 1 բջջի հաշվարկով [Jiang et al., 2015]: Բջջակորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի պարունակությունը զիջում է միայն հիստոնային սպիտակուցների պարունակությանը [D'Amours et al., 1999]: ՊԱՌՊ 1-ի բաշխվածությունը քրոմատինում պատահական չէ և մենահատուկ է բջջի տեսակին: Մարդու ՊԱՌՊ 1 կոդավորող գենը գտնվում է 1q41-42 քրոմոսոմում, ունի 23 էկզոն և ունի 43 հ.գ.ն. երկարություն: ՊԱՌՊ 1 սպիտակուցի մոլեկուլային զանգվածը 113 կԴա է և այն կազմված է առնվազն 6 դոմեններից (նկ.1):

N-ծայրային հատվածում գտնվում է ԴՆԹ – կապող դոմենը (ԴԿԴ) (A), որի ցինկ-մատները իրականացնում են ՊԱՌՊ 1-ի միացումը ԴՆԹ-ին: ՊԱՌՊ 1-ի 2 “ցինկ-մատները” եզակի են, քանի որ ճանաչում են ոչ թե ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունները, այլ փոփոխված ԴՆԹ-կառուցվածքները [Wacker et al., 2007]: Երրորդ “ցինկ-մատը” պատասխանատու է ՊԱՌՊ 1-ի կատալիտիկ կենտրոնի ակտիվացման համար ԴՆԹ-ին կապվելուց հետո: B դոմենը կազմված է երկու մասից՝ կորիզային տեղակայման ազդանշան կոչվող հաջորդականությունից (ԿՏԱ) և կասպազ 3-ով ճեղքվող հատվածից: Ինքնամոդիֆիկացման դոմենը (D) պարունակում է BRCT հաջորդականություն, որի միջոցով ՊԱՌՊ 1-ը մտնում է տարբեր սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցությունների մեջ:

Ինքնամոդիֆիկացման դոմենը պարունակում է գլյուտամինաթթվի, ասպարագինաթթվի, լիզինի մնացորդներ, որոնք հանդիսանում են պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերների հիմնական ակցեպտորները ինքնա(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացման ընթացքում և լեյցինային մոտիվներ, որոնք միջնորդում են հոմոդիմերացման կամ հետերոդիմերացման գործընթացները [Luo, Kraus, 2012]: C-ծայրային (F) կատալիտիկ դոմենը պարունակում է «ՊԱՌՊ-ի ստորագրություն» կոչվող ամինաթթվային հաջորդականությունը, որը բնորոշ է ՊԱՌՊ ընտանիքի բոլոր անդամներին: Այս դոմենը հարուստ է տրիպտոֆանով, գլիցինով և անհրաժեշտ է ՊԱՌ պոլիմերների սինթեզի համար [Yelamos et al., 2011]:



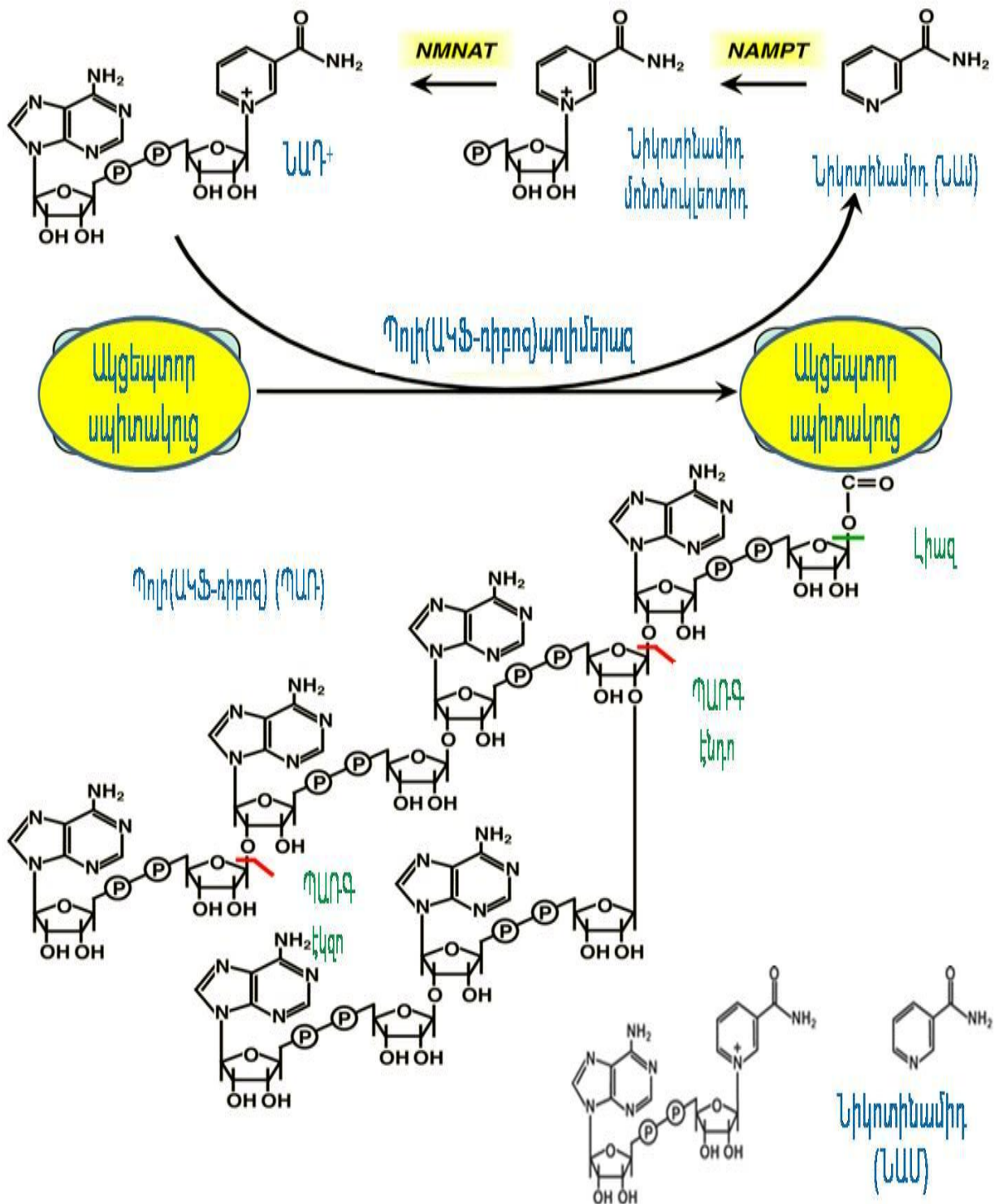
Նկար 1. ՊԱՌՊ 1 և ՊԱՌՊ 2-ի դոմենային կառուցվածքը [Megnin-Chanet et al., 2010]:

Բջջակորիզներում ՊԱՌՊ 1-ը տրանսպոլի(ԱԿՖ-որբոզ)իլացնում է հիստոնները, բարձր շարժունակությամբ ոչ հիստոնային սպիտակուցները, կորիզային լամինի սպիտակուցները, տոպոիզոմերազները, ՊԱՌՊ 2-ը: Պոլի(ԱԿՖ-որբոզ)ի մնացորդները կարող են ոչ կովալենտ կապերով միանալ p53 սպիտակուցին և հետերոզեն կորիզային ռիբոնուկլեինապրոտեիններին [Rouleau et al., 2004]:

ՊԱՌՊ 2-ը, ինչպես և ՊԱՌՊ 1 -ը, ակտիվանում է ի պատասխան ԴՆԹ -ի վնասվածքների, սակայն ցուցաբերում է ավելի ցածր ակտիվություն: Այս երկու ֆերմենտները կորիզում գործում են փոխլրացման սկզբունքով, մեծացնելով ԴՆԹ-վնասվածքների նորոգման արդյունավետությունը: ՊԱՌՊ 2-ի և ՊԱՌՊ 1-ի գեների միանվագ հեռացումը մկան գենոմից հանգեցնում է սաղմնային մահացության՝ մատնանշելով դրանց կենսական նշանակությունը: Մկան ՊԱՌՊ 2-ի կառուցվածքը նման է ՊԱՌՊ 1-ի կառուցվածքին, սակայն դրա մոլեկուլում բացակայում են ցինկ-մատնները, կատալիտիկ դոմենի կառուցվածքը (F դոմեն) 69% նմանություն է ցուցաբերում ՊԱՌՊ 1-ի համապատասխան դոմենի հետ: ՊԱՌՊ 2-ի ԴՆԹ-կապող

դոմենը կառուցվածքով տարբերվում է ՊԱՌՊ 1-ի ԴՆԹ-կապող դոմենից, ինչն էլ պայմանավորում է յուրաքանչյուր ֆերմենտի կողմից ԴՆԹ –ի կառուցվածքի ճանաչման յուրահատկությունները [Luo, Kraus, 2012]:

ՊԱՌՊ 1-ը կարգավորում է քրոմատինի կառուցվածքը, ԴՆԹ –ի մեթաբոլիզմը և գեների էքսպրեսիան քրոմատինային սպիտակուցների պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացման շնորհիվ: ՊԱՌՊ 1 –ը ակտիվանում է ի պատասխան տարբեր բջջային սթրեսային իրավիճակների, այդ թվում ԴՆԹ –ի շղթաների խզումների, որոնք առաջանում են այնպիսի գործընթացների արդյունքում, ինչպիսիք են ԴՆԹ –ի վերականգնումը, ռեկոմբինացիան, գենային վերադասավորումները, օքսիդային սթրեսը, ԴՆԹ-կապվող դեղամիջոցների ազդեցությունը: Ակտիվանալուց հետո ՊԱՌՊ 1-ը արագորեն իրականացնում է ՆԱԴ⁺-ի ճեղքավորումը նիկոտինամիդի և ԱԿՖ-ռիբոզ մնացորդների, որոնք էլ իրենց հերթին կապվում են ասպարագինաթթվի, գլյուտամինաթթվի և լիզինի մնացորդներին եթերային կապով [Altmeyer et al, 2009]: (ԱԿՖ-ռիբոզ)-մնացորդները արագորեն միանում են առաջին (ԱԿՖ-ռիբոզ)ին α -գլիկոզիդային կապերով, ընդ որում աճող շղթայում կարող են ձևավորվել ճյուղավորումներ՝ սինթեզող ֆերմենտի և փոխազդող զույգի բնույթից կախված [Beneke, 2012]: In vivo պայմաններում ՊԱՌՊ 1 – ն ինքնին հանդիսանում է պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացման (ՊԱՌացում) առաջնային թիրախ, ընդ որում ՊԱՌ պոլիմերների ավելի քան 90% -ը հայտնաբերվել է ՊԱՌՊ 1-ում [Peralta-Leal et al., 2009]: Ռեակցիայի արդյունքում ձևավորվում են մինչև 200 (ԱԿՖ-ռիբոզ) մնացորդից բաղկացած գծային կամ ճյուղավորված շղթաներ (ՊԱՌ), ընդ որում ճյուղավորումը տեղի է ունենում յուրաքանչյուր 20-50 (ԱԿՖ-ռիբոզ)-մնացորդից հետո (նկ. 2): ՊԱՌՊ 1-ի կողմից պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերացմանն ենթարկված սպիտակուցների պոլիմերային պոչիկներն իրենցից ներկայացնում են ծառանման կառուցվածքներ, որոնք օժտված են մեծ բացասական լիցքով: Բացասական լիցքավորման հետևանքով փոփոխությանն ենթարկված քրոմատինային սպիտակուցները սկսում են վանվել ԴՆԹ-ից, ապակոնդենսացնելով քրոմատինի հարակից շրջանները:



Նկար 2. ՆԱՂԴ⁺-ի և ՊԱՌ-ի կենսասինթեզը [Krishnakumar, Kraus, 2010]:

ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը տեղի է ունենում դիմերացման հետևանքով [Jorgensen et al., 2009, Langelier et al., 2012]: Գենոտոքսիկ միացությունների նկատմամբ բջջային պատասխանի առաջին ռեակցիան պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացման կտրուկ ակտիվացումն է

[Haince et al., 2007, Haince et al., 2008]: Գենոմի կայունությունն ապահովող կարևոր սպիտակուցներն, ինչպիսիք են թելոմերազները, p53 սպիտակուցը, հիստոնները, հիմքերի էքսցիզիոն վերականգնման սպիտակուց XRCC 1-ը, նուկլեոտիդների էքսցիզիոն վերականգնման սպիտակուց XPA-ն և այլն, ունեն մոտ 20 հիդրոֆոբ ամինաթթվային մնացորդներից բաղկացած շրջաններ, որոնք կապվում են պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերներին (ՊԱՌ) [Karras et al., 2005]:

ՊԱՌ-Պ 1-ը որոշիչ դեր է կատարում նյարդային, ստերոիդ, ռետինոիդ և այլ հորմոնների ազդանշանային ուղիների ակտիվացման համար անհրաժեշտ գեների ազդանշան-կախյալ կարգավորման գործընթացում [Kraus, 2008, Kim et al., 2004]: ՊԱՌ-Պ 1-ը փոխում է քրոմատինի կառուցվածքն և թիրախ գեների պրոմոտորներում կապված տրանսկրիպցիայի գործոնների հավաքակազմը: Այս գեների էքսպրեսիան կարգավորվում է որոշակի ազդանշանային ուղիներով: Որոշ ուղիներ ներառում են բջջային կինազներ (ERK1/2, JNK1, PKC և այլն) [Cohen-Armon, 2007]: ERK1/2 ուղու միջոցով ազդանշանումը մեծացնում է ՊԱՌ-Պ 1-ի ակտիվությունը: ERK1/2 կինազը ֆոսֆորիլացնում է ՊԱՌ-Պ 1-ը սերին 372 և տրիպտոֆան 373 մնացորդներում [Zhang et al., 2007]: Կինազ JNK1-ի կողմից ՊԱՌ-Պ 1-ի ֆոսֆորիլացումն ապահովում է ՊԱՌ-Պ 1-ի կայուն երկարատև ակտիվացումը բջիջներում ջրածնի պերօքսիդով հրահրված սթրեսի ժամանակ [Kauppinen et al., 2006]:

ՊԱՌ-Պ 1-ի ֆոսֆորիլացումն, այնուամենայնիվ, միշտ չէ որ հանգեցնում է ֆերմենտի ակտիվացմանը: Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ պրոտեինկինազ C-ի կողմից ՊԱՌ-Պ 1-ի ֆոսֆորիլացումը հանգեցնում է ֆերմենտի արգելակմանը [Krishnakumar, Kraus, 2010]:

1.2. ՊԱՌ-Պ 1-ի նշանակությունը քրոմատինի կառուցվածքի և ֆունկցիաների կարգավորման մեջ

Դրոզոֆիլների մոտ ի պատասխան ջերմային շոկի, ՊԱՌ պոլիմերներն անմիջապես կուտակվում են քրոմոսոմային այն լոկուսներում, որոնք պարունակում են ջերմային շոկի – պատասխան սպիտակուցների գեները: ՊԱՌ-Պ 1-գենի հեռացումը կամ արգելակումը խթանում է Hsp70 գենի տրանսկրիպցիան: Դեռևս պարզ չէ, թե ինչ

մեխանիզմով է ՊԱՌՊ 1-ն ընկալում ջերմային շոկի ազդանշանը, սակայն ենթադրվում է, որ այդ պրոցեսն իր մեջ կարող է ներառել ջերմային շոկի գործոնի հետ փոխազդեցություն, որը ԴՆԹ-կապվող տրանսկրիպցիոն գործոն է [Ji, Tulin 2010, Petesch, Lis, 2008]:

Գեների գործունեության ակտիվության վերահսկման ուղիներից մեկը գեների լուեցման հատուկ գործընթացներն են: Դրանցից մեկը հիստոնների դեացետիլացման գործառույթն է: Այն իրականացվում է հատուկ կորիզային ֆերմենտներով՝ սիրտուիններով (Sirt): Ինչպես և ՊԱՌՊ 1-ը, սիրտուինների ընտանիքի դեացետիլազները որպես ելանյութ օգտագործում են ՆԱԴ⁺-ը: Այս ընտանիքի որոշ անդամներ դրսևորում են նաև մոնո(ԱԿՖ-ռիբոզ)տրանսֆերազային ակտիվություն [Mao et al., 2011]: Ինչպես պարզվեց, ՊԱՌՊ 1-ի և որոշ սիրտուինների միջև գոյություն ունի ֆունկցիոնալ կապ: ՊԱՌՊ 1-ի և Sirt1 –ի միջև ֆունկցիոնալ փոխազդեցությունն որոշիչ դեր է կատարում քրոմատինի կառուցվածքի, գենոմի ամբողջականության պահպանման մեջ և բջիջների գոյատևմանն ուղղված գործընթացներում: Ցույց է տրվել, որ ՊԱՌՊ 1 –ը և Sirt 1 –ը գործում են անտագոնիստական սկզբունքով, այսինքն, Sirt 1 –ի ակտիվացումը բերում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության նվազման [Tulin et al., 2006]: ՊԱՌՊ 1-ը և Sirt 1 –ը մրցակցում են կորիզային ՆԱԴ⁺-ի համար և երկու ֆերմենտներն էլ արգելակվում են նիկոտինամիդով [Zhang et al., 2009]: ՊԱՌՊ 1-ի և Sirt 1 –ի միջև փոխազդեցությունը չի սահմանափակվում մրցակցությամբ ՆԱԴ⁺-ի համար: Հայտնի է, որ օքսիդային սթրեսի ժամանակ Sirt ընտանիքի ներկայացուցիչ Sirt 6-ը տեղակայվում է ԴՆԹ –ի երկշղթա խզումների հատվածներում և մոնո(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնում է ՊԱՌՊ 1-ը լիզին 521 դիրքում: Այս մոդիֆիկացումը ակտիվացնում է ՊԱՌՊ 1-ը և, հետևաբար, ԴՆԹ –ի վերականգնման ՊԱՌՊ 1-կախյալ ուղիները [Luo, Kraus, 2012]: Այսպիսով, սիրտուինների և ՊԱՌՊ 1-ի համաձայնեցված գործունեությունը մեծ դեր է կատարում քրոմատինի ֆունկցիոնալ ակտիվության պատշաճ մակարդակի ապահովման հարցում [Tulin et al., 2003]:

ՊԱՌՊ 1-ը ներգրավված է ԴՆԹ –ի վերականգնման և տրանսկրիպցիայի կարգավորման գործընթացներում և ներկայումս համարվում է բջիջների կենսունակության պահպանման և բջջային մահվան գլխավոր կարգավորիչն

օրգանիզմում ընթացող բորբոքային գործընթացների և ուռուցքագոյացման ժամանակ: ՊԱՌՊ 1-ն որոշիչ դեր է կատարում բորբոքային գործընթացներին իմունային պատասխանի ձևավորման համար անհրաժեշտ տրանսկրիպցիայի գործոն NF-kB-ի ակտիվացման մեջ [Hassa , Hottiger, 2002]:

Հայտնի է, որ քրոմատինի ապակոնդենսավորումը հանդիսանում է քրոմատինի ֆունկցիաների խթանման և գեների գործարկման համար անհրաժեշտ առաջին նախապայմանը: ՊԱՌՊ 1-ը պատկանում է այն ֆերմենտների շարքին, որոնք փոխում են քրոմատինի փաթեթավորումը կորիզում: ՊԱՌՊ 1-ը կարող է ապակոնդենսացնել և «բացել» քրոմատինի կառուցվածքը՝ հիստոնների ՊԱՌ-ացման և նուկլեոսոմների ապակայունացման շնորհիվ (մասնավորապես, հիստոն H1-ի): Քրոմատինի ապապարուրումից հետո ՊԱՌՊ 1-ը կարող է անջատվել ԴՆԹ-ից: ՊԱՌՊ 1-ի հեռացումը մատչելի է դարձնում քրոմատինի մերձակա հատվածը ԴՆԹ-ի վերականգնումն իրականացնող ֆերմենտների համար: Հայտնի է, որ ՊԱՌՊ 1-ը կապվում է H1, H2A և H2B հիստոնների հետ: Ի լրումն դրան, ՊԱՌՊ 1-ի հետ փոխազդում են նուկլեոսոմների միջուկային հիստոններ H3 և H4 –ը: Ինչպես պարզվեց, հիստոն H4-ն ակտիվացնում է ՊԱՌՊ 1-ին, մինչդեռ H2A հիստոնը լիովին ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը [de Murcia G. et al., 2003, Pinnola et al., 2007, Quenet et al., 2008]: Քրոմոսոմային ոչ հիստոնային սպիտակուցներ HMGP –ն, HP1 α և HP1 β -ն ևս ՊԱՌ-ացվում են [Tanuma, Johnson, 1983]: Բացի ԴՆԹ –ի վերականգնման գործընթացին մասնակցելուց, ՊԱՌՊ 1-ը մասնակցում է նաև օքսիդային սթրեսով հարուցված քրոմատինի վերականգնմանը: Հայտնի է, որ նուկլեոսոմային հիստոնները պաշտպանում են ԴՆԹ –ն ազատ ռադիկալներով միջնորդված վնասվածքներից: Այս գործընթացը կախված է նուկլեոսոմների ամբողջականությունից: Գենոմի ամբողջականությունը պահպանելու համար, օքսիդացված հիստոնները պետք է խիստ ընտրողական ձևով քայքայվեն 20S պրոտեոսոմի կողմից: H1 և H4 հիստոնները ունեն քայքայման բարձր արժեքներ, մինչդեռ ՊԱՌ-ացված H2A հիստոնը՝ շատ ցածր [Catalgol et al., 2010]: ՊԱՌՊ 1 և ՊԱՌԳ –ը կարող են ազդել նաև քրոմատինի դոմենային կառուցվածքի վրա ՆԱԴ⁺-կախյալ հիստոն դեացետիլազ Sirt2 –ի հետ փոխազդեցության միջոցով: ՊԱՌՊ 1-ի կողմից իրականացված հիստոնների

ՊԱՌ-ացումն ապակոնդենսացնում է քրոմատինը գեների լոեցման գործընթացի վաղ փուլերում, ինչը հեշտացնում է Sirt2 –ի մոտեցումն ացետիլացված հիստոնների ծայրերին: Սիրտուկիների կողմից իրականացվող հիստոնների դեացետիլացումը հանգեցնում է քրոմատինի համապատասխան հատվածի կոնդենսատորմանը, ինչն, ընդհանուր առմամբ, ՊԱՌ-ացման հետ մեկտեղ ապահովում է քրոմատինի կառուցվածքի դինամիկ փոփոխությունները [Ji , Tulin, 2010, Verdone et al., 2015]:

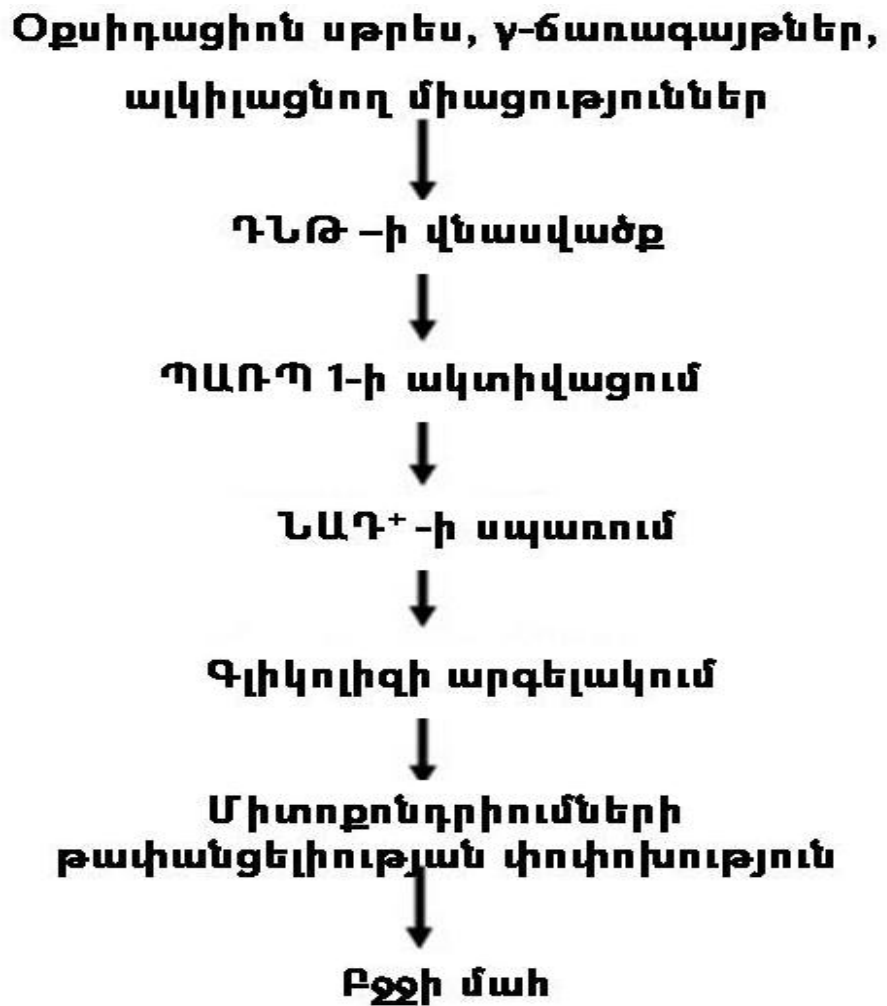
ՊԱՌ-ացմանն ենթակա են ոչ միայն հիստոններն և ԴՆԹ –ի վերականգնումն իրականացնող սպիտակուցներն, այլև p53 սպիտակուցը, ցիկլին-կախյալ կինազի արգելակիչ p21 սպիտակուցն, ինչը ցույց է տալիս ՊԱՌ-Պ 1-ի մասնակցությունը բջջային բոլորաշրջանի կարգավորման գործառույթում [Pleschke et al., 2000]: Այսպիսով, ՊԱՌ-Պ 1-ը հանդիսանում է ԴՆԹ –ի խզումների վերականգնման համար անհրաժեշտ կարգավորիչ մոլեկուլ:

ՆԱԴ⁺ -ի ներբջջային պաշարների սպառումը ֆերմենտի գերակտիվացման հետևանքով կարող է սահմանափակել ՊԱՌ-Պ 1-ի ինքնաՊԱՌ-ացման հնարավորություններն և վերականգնողական գործընթացների արդյունավետությունը: Սա կարող է հանդիսանալ ԴՆԹ-ի ապարդյուն վերանորոգման արգելակման մեխանիզմ այն պարագայում, երբ ԴՆԹ –ի մեծաքանակ վնասվածքները մահաբեր են բջջի համար և անհրաժեշտ է գործարկել բջջային մահվան ծրագրերը [Ha, Snyder 1999, Ryabocon et al., 2008]: In vitro համակարգերում ՊԱՌ-Պ 1-ը ունակ է արգելակել ԴՆԹ պոլիմերազ α և β -ն, ԴՆԹ լիգազ II –ն, ապոպտիկ էնդոնուկլեազները: ՊԱՌ-ացման միջոցով ակտիվանում են նաև քրոմատին ռեմոդելավորող սպիտակուցներ Alc 1 և APLF1-ը [Gottschalk et al., 2009, Eustermann et al., 2010]: ՊԱՌ-Պ 1-ը փոխազդում է նաև վերների սինդրոմի սպիտակուց՝ WRN-ի հետ: WRN –ն մասնակցում է հիմքերի էքսցիզիոն վերականգնման, ԴՆԹ –ի երկշղթա խզումների վերականգնման, թելոմերների կրկնապատկման և կայունացման գործընթացներում: WRN-ն և ՊԱՌ-Պ 1-ը անմիջականորեն փոխազդում և կազավորում են մեկը մյուսին [Adelfalk et al., 2003], և կարող են ձևավորել համալիրներ ԴՆԹ-պրոտեինկինազի K70/Ku80 ենթամիավորների հետ [Li et al., 2004]: Թելոմերներում ՊԱՌ-Պ 1-ի ակտիվությունն անհրաժեշտ է դրանց կայուն երկարությունը պահպանելու համար

[Beneke et al., 2008]: ՊԱՌՊ 1-ի գործունեությունը թելոմերներում և նրա փոխազդեցությունը WRN –ի հետ վկայում են այն մասին, որ ֆերմենտը մեծ դեր է կատարում ծերացման հետ կապված գործընթացներում [Mangerich, Burkle, 2012]:

Ապոպտոզի խթանման գործոնը (AIF) միտոքոնդրիալ ֆլավոպրոտեին է, որը կարող է տեղափոխվել կորիզ և խթանել ապոպտոզի կասպազ-անկախ ուղին: Ցույց է տրվել, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը հանգեցնում է միտոքոնդրիումների թափանցելիության փոփոխությունների և AIF-գործոնի արձակմանը միտոքոնդրիումների միջթաղանթային տարածությունից: ՆԱԴ⁺-ի ներբջջային պարունակության մեծացումը կանխում է AIF –ի տեղափոխությունը [Alano et al., 2004]: Հետազոտությունների արդյունքները վկայում են, որ ՆԱԴ⁺-ի սպառումը անհրաժեշտ է բջջային մահվան այն ձևի համար, որը միջնորդվում է միտոքոնդրիումների թափանցելիության փոփոխություններով և AIF –ով ուղեկցվող ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացմամբ:

ԴՆԹ-ի մեծաքանակ վնասվածքների, ՆԱԴ⁺-ի պարունակության և ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կապը կարելի է ներկայացնել հետևյալ գծապատկերով (նկ. 3):



Նկար 3. ՆԱԴ⁺-ն որպես ԴՆԹ –ի վնասման և բջջային մահվան պրոցեսները կապող օղակ [Ying et al., 2005]:

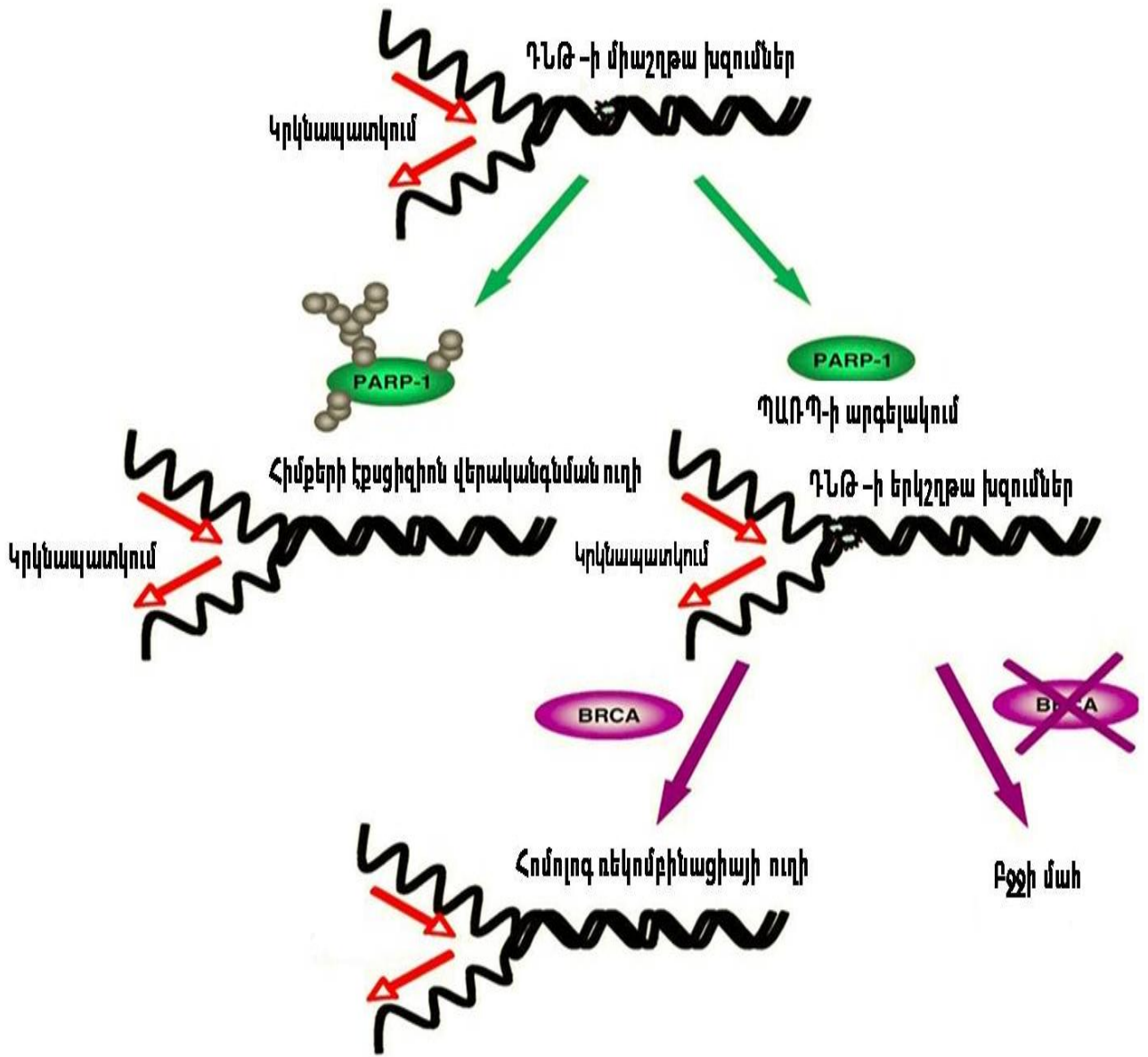
1.3. ՊԱՌՊ –ի արգելակիչների կենսաբանական դերը

ՊԱՌՊ 1-ի ամենանշանակալի կենսաբանական դերը ԴՆԹ-ի վնասվածքների նորոգումն է և վերջինիս ամբողջականության վերականգնումը: Հիստոնների մոդիֆիկացումները կարևոր դեր են կատարում ԴՆԹ-վերականգնող համալիրի կողմից վնասված հատվածների ճանաչման և դրանց մատչելիությունն ապահովելու համար: ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը կտրուկ մեծանում է ԴՆԹ –ի շղթաների խզումների առաջացումից հետո և այդ պատճառով Ֆերմենտը ներկայումս դասվում է բջջային «զգացող» կամ սենսորային մոլեկուլների դասին: ՊԱՌՊ 1-ը առանցքային դեր է կատարում ԴՆԹ-ի վերականգնման գործընթացների համար: Ֆերմենտի ակտիվացման առաջնային թիրախ է հանդիսանում հենց ինքը՝ ՊԱՌՊ 1-ը: Ֆերմենտի ինքնառիբոզիլացումը խթանում է XRCC1 սպիտակուցի հետ փոխազդեցությունն՝

ինքնամոդիֆիկացման դոմենում գտնվող BRCT ամինաթթվային հաջորդականության միջոցով: Դա հանգեցնում է ԴՆԹ-պոլիմերազ β-ի և ԴՆԹ լիգազ III-ի հավաքագրմանն և, այսպիսով, ապահովում միաշղթա խզման վերականգնումը: ՊԱՌՊ 1-ը ներգրավված է նաև ԴՆԹ-ի երկշղթա խզումների վերականգնման գործընթացում և կանխում է հոմոլոգ ԴՆԹ-ների անտեղի ռեկոմբինացիան [Weinstock, 2006]:

ՊԱՌՊ 1-ի դերն այս հիմնարար կենսաբանական գործընթացներում կարևորում է ֆերմենտի արգելակման նշանակությունը: Այսպես, օրինակ, ՊԱՌՊ –ի արգելակման արդյունքում դիտվում է ԴՆԹ –ի մեծ քանակությամբ միաշղթա խզումների կուտակում: Դրա հետևանքով մեծանում է ԴՆԹ-ի երկշղթա խզումների հաճախականությունն, ինչն, ի վերջո, հանգեցնում է ԴՆԹ-ի կրկնապատկման և բջջային բոլորաշրջանի արգելակմանը: Այն բջիջներն, որոնց ԴՆԹ –ի երկշղթա խզումների վերականգնման գործընթացները լիարժեք չեն գործում, դրսևորում են բարձր զգայունություն ՊԱՌՊ –ի քիմիական արգելակիչների նկատմամբ [Bryant et al., 2005, Farmer et al., 2005, McCabe et al., 2006]: Ի հակադրություն դրան, երկշղթա խզումների վերականգնման հզոր համակարգ ունեցող բջիջները մեծ ճշգրտությամբ վերականգնում են վնասվածքներն և ցածր զգայունություն են ցուցաբերում ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների հանդեպ (նկ. 4):

Կրծքագեղձի քաղցկեղի նկատմամբ հակվածությունը պայմանավորող BRCA 1 և BRCA 2 գեների մուտացիաները պատասխանատու են կրծքագեղձի ժառանգական քաղցկեղի առաջացման համար: BRCA 1 և BRCA 2 գեները կոդավորում են արդյունավետ հոմոլոգ ռեկոմբինացիայի (<Ռ) (երկշղթա խզումների վերականգնման ուղի) համար պատասխանատու սպիտակուցներ [Tutt et al., 2001]:



Նկար 4. ՊԱՌՊ-ի արգելակիչները ԴՆԹ-ի վերականգնման թերացումներով պայմանավորված քաղցկեղների բուժման պրոցեսում [Peralta-Leal et al., 2009]:

ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները մահացու են այն բջիջների համար, որոնցում BRCA-սպիտակուցները բացակայում են կամ քիչ են սինթեզվում, քանի որ այդ սպիտակուցների թերացման պայմաններում ԴՆԹ-ի երկշղթա խզումների վերականգնումը լիովին կախված է դառնում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունից: Այսպիսով, ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները արդյունավետ են BRCA 1 և BRCA 2 մուտացիաներ կրող քաղցկեղային բջիջների վերացման համար և կիրառվում են որպես մոնոթերապևտիկ հզոր գործոն նման մուտացիաներով պայմանավորված քաղցկեղային

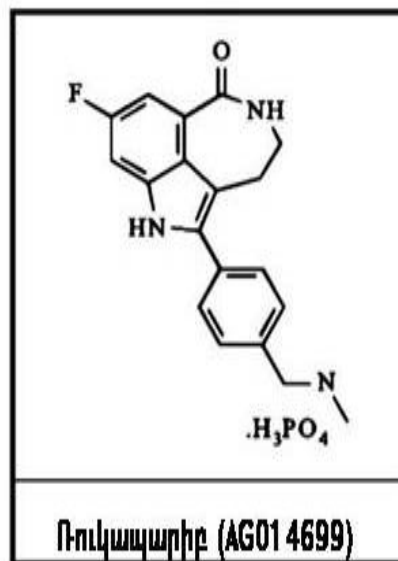
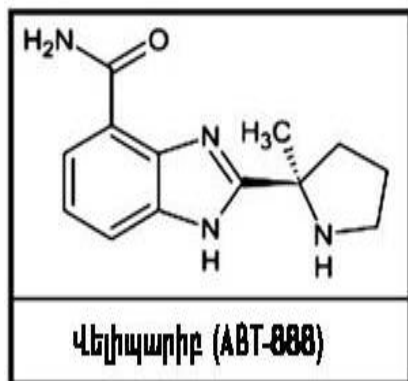
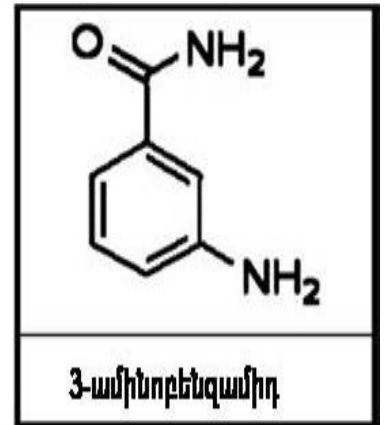
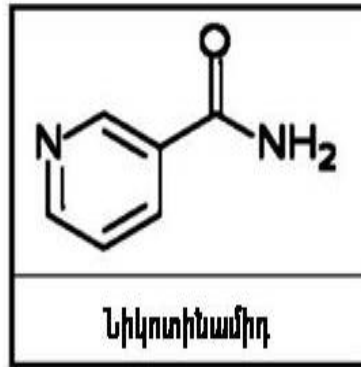
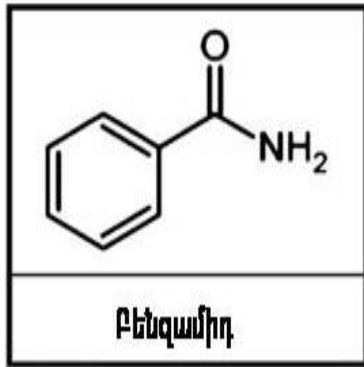
հիվանդությունների բուժման մեջ [Leung et al., 2011, Horton, Wilson, 2013, Curtin, Szabo, 2013]:

ՊԱՌՊ 1-ի արգելակումը պաշտպանիչ ազդեցություն ունի մի շարք բորբոքային և իշեմիկ հիվանդությունների ժամանակ, ինչպիսիք են սրտանոթային հիվանդությունները, շաքարախտը, էնդոտոքսիկ շոկը, ունաստիկ արթրիթը, կաթվածները:

1.3.1. Բենզամիդը և նրա ածանցյալները որպես ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային արգելակիչներ

ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների մեծ մասը հանդիսանում են նիկոտինամիդադենինդինուկլեոտիդի (ՆԱԴ⁺) մոլեկուլի նմանակներ: Ինչպես արդեն նշվել է, ՊԱՌՊ 1-ը կատալիզում է ՆԱԴ⁺ -ի ճեղքավորումը մինչև ԱԿՖ և ԱԿՖ-ռիբոզ և ԱԿՖ-ռիբոզ մոլեկուլների միացումը թիրախ սպիտակուցներին [D'amours et al., 1999]: Հետևաբար ՆԱԴ⁺-անման մոլեկուլներն արգելակում են ՆԱԴ⁺-ի կապումը ֆերմենտին, ճնշելով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը: ՊԱՌՊ 1-ի առաջին սերնդի արգելակիչները բացահայտվել են դեռևս 30 տարի առաջ. բենզամիդ (ԲԱՄ), նիկոտինամիդ և տեղակալված բենզամիդ, այն է 3-ամինոբենզամիդ (3-ԱԲ): Ցույց է տրվել, որ նշված արգելակիչները հանդիսանում են ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային արգելակիչներ (նկ.5):

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ բենզամիդները հանդիսանում են ավելի հզոր արգելակիչներ, քան նիկոտինամիդները [Anwar et al., 2015]: Այնուամենայնիվ այս դասական արգելակիչները զուրկ են սպեցիֆիկությունից: Բենզամիդն և 3-ԱԲ-ն ՊԱՌՊ 1-ի սպեցիֆիկ արգելակիչներ չեն, նրանք ազդում են բջջի կենսունակության, գլյուկոզի փոխանակության և ԴՆԹ -ի սինթեզի վրա: Ընդ որում, 3-ԱԲ -ն կիրառվում է քեմոթերապիայի և ռադիոթերապիայի հետ համատեղ, և արգելակչի միլիմոլյար կոնցենտրացիաները արդեն իսկ ցուցաբերում են տոքսիկ ազդեցություն [Peralta-Leal, 2009]:



Նկար 5. Դեղաբուժությունում կիրառվող ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները:

Բենզամիդի ածանցյալներում կարևորվում է կարբոքսի խմբի առկայությունն, որի N-ակտիվացումը կամ փոխարինումը թիոամիդ խմբով էականորեն նվազեցնում է վերջիններիս ակտիվությունը: Բենզամիդը արգելակում է ՊԱՌՊ 1-ը, մրցակցելով ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում ՆԱԴ⁺-ի կապման հետ, սակայն ԲԱՄ-ը կապվում է նաև ԴՆԹ -ի հետ և այսպիսով խոչընդոտում ՊԱՌՊ 1 -ի կողմից ԴՆԹ -ի խզումների ճանաչման գործընթացն՝ արգելակելով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը [Southan, Szabo, 2003]: ՊԱՌՊ 1-ի հզոր արգելակիչների երկրորդ սերունդը մշակվել է 1990-ական թվականներին և ներառում է 170 մենահատուկ արգելակիչներ: Բոլոր այս արգելակիչները կարող են որակավորվել որպես բենզամիդի այլընտրանքային ձևեր: Նշված արգելակիչները խաթարում են ՊԱՌՊ 1 -ի և ՆԱԴ⁺ -ի միջև կապի

առաջացումն և կիրառվում են միկրոմոլյար կոնցենտրացիայով: Արգելակիչների երրորդ սերունդը բենզամիդազոլներն են: Այս մոլեկուլները ունեն ցիկլիկ կառուցվածք, ինչպիսին է AG014699, որը կիրառվում է կլինիկական փորձարկումներում: Շատ արգելակիչներ 3-ԱԲ –ի ածանցյալներ են, ունեն տարբեր լուծելիություն և ֆարմակոկինետիկ բնութագրեր, և լայնորեն կիրառվում են կլինիկական փորձարկումներում: Դրանցից են ABT-888, INO-1001, BSI-201 և այլն [Davar et al., 2012]: Ներկայումս կլինիկական կիրառություն են գտել ՊԱՌՊ 1-ի հետևյալ արգելակիչները.

Օլապարիբը (AZD2281) ՊԱՌՊ 1/2-ի և տանկիրազների արգելակիչ է, օրգանիզմում ցիտոտոքսիկության ընդհանուր դրսևորումներով՝ սրտխառնոց, փսխում, լուծ և հոգնածություն: Կիրառվում են կլինիկական փորձարկումներում որպես մոնոթերապևտիկ միջոցներ, կամ համատեղ այլ հակառուտուցքային միջոցների հետ կրծքագեղձի, ձվարանների, ուղիղ և հաստ աղիների քաղցկեղի բուժման ընթացքում [Yuan et al., 2011]:

Ռուկապարիբը (AG-014699) ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչ է, որը չի դրսևորում ցիտոտոքսիկ ազդեցություն մոնոթերապևտիկ բուժման պարագայում: Քաղցկեղի զարգացման ուշ փուլերում կիրառվում է թեմոզոլումիդի հետ համատեղ:

Վելիպարիբը (ABT-888) ՊԱՌՊ 1/2-ի արգելակիչ է:

Նիրապարիբը (MK-4827 ՊԱՌՊ 1 և ՊԱՌՊ 2 –ի հզոր արգելակիչ է:

CEP-9722 ՊԱՌՊ 1/2 –ի արգելակիչ է և CEP-8983 –ի սինթեզի սկզբնակը: Օժտված է թեմոզոլումիդի, իրինոտեկանի և ճառագայթման նկատմամբ գլիոբլաստոմայի, հաստ աղիքի, նեյրոբլաստոմայի բջիջների զգայունությունը մեծացնելու ունակությամբ՝ առանց ոսկրածուծի արյունաստեղծ ունակության վրա ազդելու:

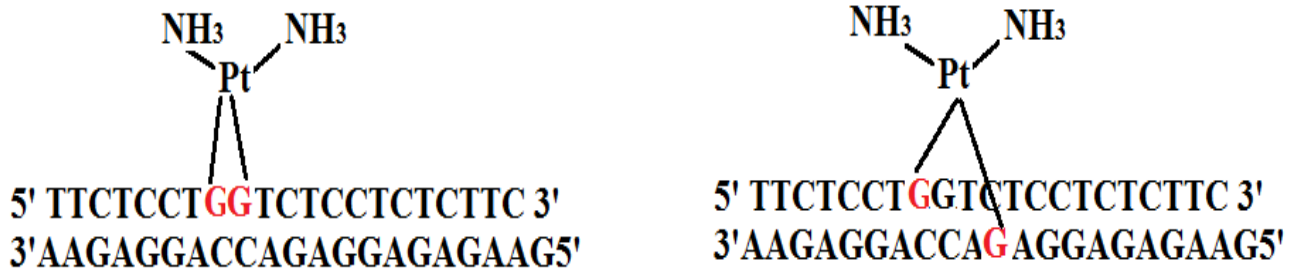
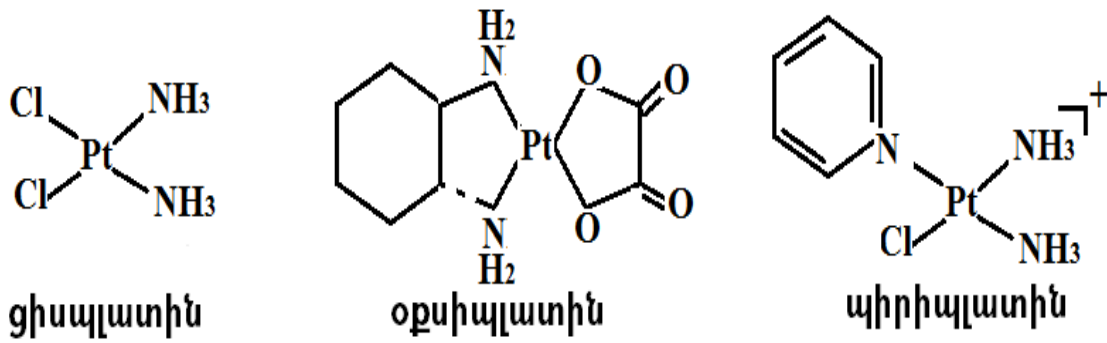
E7016 (GP-21016) ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչ է, որը կարող է մեծացնել ուռուցքի զգայունությունը ճառագայթման նկատմամբ:

ՊԱՌՊ 1-ի նշված արգելակիչները պատկանում են մրցակցային արգելակիչների խմբին: ՊԱՌՊ 1-ի նորանոր արգելակիչների ստեղծումը հանդիսանում է արդի դեղագիտության կարևորագույն խնդիրներից մեկը:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ԱԵՖ –ը, բացի հայտնի էներգետիկ դերի, հանդես է գալիս նաև որպես ՊԱՌՊ 1-ի ալոստերիկ արգելակիչ: Հաստատված է, որ ԱԵՖ-ը կապվում է ՊԱՌՊ 1-ի ինքնառօրոգիլացման դոմենում և գրեթե լիովին արգելակում է ֆերմենտի ինքնամոդիֆիկացման գործընթացը [Kun et al., 2004]: ՆԱԴ⁺-ի ներբջջային կոնցենտրացիայի փոքրացման ժամանակ ՊԱՌՊ 1-ի տրանսպորի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող ակտիվությունը լիովին ճնշվում է, մինչդեռ պահպանվում է ինքնապորի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող ակտիվությունը: Ինքնամոդիֆիկացման արդյունքում ՊԱՌՊ 1-ի խնամակցությունը ԴՆԹ –ի նկատմամբ զգալիորեն փոքրանում է, ֆերմենտը պոկվում է ԴՆԹ-ից և ինակտիվանում [Schreiber et al., 2006]: Քրոմատինի ազատված հատվածներն ավելի մատչելի են դառնում տրանսկրիպցիայի գործոնների, էնդոնուկլեազների, վերականգնողական ֆերմենտների համար: ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորման այս մեխանիզմը վստահելի կապ է ստեղծում քրոմատինի ֆունկցիոնալ վիճակի և բջջի էներգետիկ վիճակի միջև, ինչը իր մեջ ներառում է ՊԱՌՊ 1-ի և ԱԵՖ –ի փոխազդեցության առանձնահատկությունները [Kraus et al., 2008, Beneke, 2012]:

1.4. Ցիսպլատինի ազդեցության մեխանիզմները

Հակաուռուցքային ազդեցություն ունեցող դեղամիջոցների զինանոցում կարևոր տեղ են գրավում պլատինի աղերը: 1970 թվականը կարելի է համարել այն եզրագիծը, որը հակաուռուցքային բուժումը բաժանեց երկու հստակ շրջանների: Քաղցկեղի տարբեր ձևերի բուժման համար որպես մոնոթերապևտիկ կամ համակցված թերապևտիկ դեղամիջոց կիրառվում են ցիսպլատինը, օքսիպլատինը, կարբոպլատինը և պիրիպլատինը [Wang, Lippard, 2005, Jung, Lippard, 2007]: Հաստատված է, որ ներբջջային ցիսպլատինի միայն 1%-ն է կապվում գենոմային ԴՆԹ-ի հետ: Պլատինային դեղամիջոցները, կապվելով ԴՆԹ –ի կազմի մեջ մտնող գուանինային հիմքերի հետ, ձևավորում են ներշղթայական և միջշղթայական կարեր (նկ. 6), որոնք արգելակում են տրանսկրիպցիան և գործի դնում ապոպտոզի գործընթացը [Foltinova et al., 2008]:



Նկար 6. Պլատինային միացությունների քիմիական կառուցվածքը և ցիսպլատինի միացումը ԴՆԹ-ին:

Ցիսպլատինը կիրառվում է սերմնարանների, ձվարանների, միզապարկի, գլխի, պարանոցի, թոքերի տարբեր չարորակ նորագոյացությունների բուժման ժամանակ: Թեև ցիսպլատինն ամենաարդյունավետ հակաուռուցքային դեղամիջոցներից է, նրա օգտագործումն ունի նաև խիստ բացասական կողմեր: Մասնավորապես, ցիսպլատինն առաջացնում է երիկամային սուր անբավարարություն՝ խթանելով երիկամային խողովակների էպիթելային բջիջների ապոպտիկ մահը: Դեղամիջոցը տոքսիկ ազդեցություն ունի մարսողական համակարգի լորձաթաղանթների էպիթելային բջիջների, լսողական նյարդի և այլ նյարդային բջիջների վրա: Ցիսպլատինի թվարկած բացասական ազդեցություններին գումարվում է այն, որ դեղամիջոցի տևական գործածման դեպքում չարորակ ուռուցքների բջիջները կորցնում են զգայունությունը նրա նկատմամբ [Basu, Krishnamurthy, 2010]:

Ցիսպլատինի բջիջ ներթափանցման ուղիները լիովին պարզաբանված չեն: Համաձայն ժամանակակից պատկերացումների ցիսպլատինը բջիջ է թափանցում հատուկ անցուղիներով կամ հեշտացված տրանսպորտի մասնագիտացած համակարգով: Բջջի ներսում ցիսպլատինն ենթարկվում է ուժեղ հիդրատացման՝ քլորի

իոնների դուրս մղումով: Վերջնական հիդրատացված մոլեկուլը ձեռք է բերում դրական լիցք և հեշտությամբ միանում զանազան բջջային նուկլեոֆիլներին: Այդպիսի նուկլեոֆիլներ են ԴՆԹ-ն, ՌՆԹ-ն, սպիտակուցները, թաղանթային ֆոսֆոլիպիդները, բջջակմախքի մանրաթելերն և թիուլ-պարունակող զանազան մոլեկուլները: Ենթադրվում է, որ կորիզային ԴՆԹ-ն ցիսպլատինի հիմնական բջջային թիրախն է, և ԴՆԹ-ցիսպլատին փոխազդեցության արգասիքներն ունեն ցիտոտոքսիկ ազդեցություն: Ցիտոտոքսիկ ազդեցություն կարող են ունենալ նաև ցիսպլատին-միտոքոնդրիումային ԴՆԹ-ն, ցիսպլատին-ֆոսֆոլիպիդներ փոխազդեցության արգասիքները [Cepeda et al, 2004]:

Այն մեխանիզմներն, որոնք գործարկվում են ԴՆԹ-ցիսպլատինի փոխազդեցության արգասիքների առաջացումից հետո և հանգեցնում բջջի մահվան, դեռևս լիովին պարզաբանված չեն: Հաճախ ցիսպլատինի ազդեցությանն ենթարկված բջիջները մահանում են ապոպտիկ ճանապարհով, այսինքն դեղամիջոցի ցիտոտոքսիկ ազդեցության կարևորագույն ուղիներից մեկն ապոպտոզն է:

Ցիսպլատինի ցիտոտոքսիկ ազդեցության երկրորդ կարևոր մեխանիզմը բջիջների վաղաժամ ծերացման գործընթացի խթանումն է: Ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-ի վնասվածք ունեցող բջիջներում կրկնապատկումը կարող է արգելակվել: Ցիսպլատինի ներգործությունից հետո կրկնապատկման արգելակումը կատարվում է այն մեխանիզմով, որը բնորոշ է ծերացող բջիջներին՝ p53 սպիտակուցի ակտիվացումով [Boulikas, Vougiouka, 2003]:

Ցիսպլատինը միացություններ է առաջացնում ոչ միայն ԴՆԹ-ի, այլև զանազան սպիտակուցների հետ (շուրջ 106 սպիտակուցային ածանցյալ յուրաքանչյուր բջջում) [Karasawa et al., 2013]: Ցիսպլատին-սպիտակուց ածանցյալները կարող են հանդիսանալ ապոպտոզի խթանիչներ: Հայտնի է, որ ցիսպլատինն ակտիվացնում է կասպազ-3-ը: Ենթադրվում է, որ ի պատասխան ցիսպլատինի ներգործությանը ցիտոպլազմային կառույցների վրա, բջջում խթանվում է ապոպտոզը [Mandic et al., 2003]:

Ցիսպլատինի ազդեցության մեխանիզմներն ապոպտոզի խթանման պրոցեսում դեռևս պարզաբանված չեն: Ներկայումս առաջարկված են երկու հավանական

մեխանիզմներ, որոնք բացատրում են, թե ինչպես են ազդում ցիսպլատինով մոդիֆիկացված ԴՆԹ-սպիտակուց ածանցյալները բջիջների կենսունակության վրա:

Համաձայն “հարձակողական մոդելի” բարձր շարժունակության խմբին պատկանող ոչ հիստոնային սպիտակուցները (HMG) կարող են խթանել ապոպտոզը՝ միանալով ցիսպլատին-ԴՆԹ ածանցյալներին: Ըստ առաջարկված երկրորդ մոդելի HMG սպիտակուցները միանում են ցիսպլատին-ԴՆԹ ածանցյալներին և պաշտպանում վերջիններիս ռեպարացիայի ֆերմենտների ազդեցությունից՝ չեզոքացնելով ԴՆԹ-ի վերականգնման գործընթացները: Այս մոդելը կոչվեց “վահան ռեպարացիայից” [Cepeda, 2007]:

Մարդու և առնետների արագ զարգացող քաղցկեղների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ դրանց բջիջներին հատուկ է գլիկոլիզի բարձր մակարդակ [Warburg, 1956]: Դա պայմանավորված է նրանով, որ *c-myc* օնկոգենի կողմից խթանվում են գլիկոլիտիկ ֆերմենտները (գլյուկոզ տեղափոխիչ 1՝ GLUT1, հեքսոգֆոսֆատ իզոմերազ HPI, ֆոսֆոֆրուկտոկինազ 1՝ PFK1, գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատդեհիդրոգենազ՝ GAPDH, ֆոսֆոգլիցերատկինազ՝ PGK և էնոլազ՝ ENO) [Griguer et al., 2005].

Ցիսպլատինն արգելակում է գլիկոլիտիկ ֆերմենտները [Zhou et al., 2002, Xu et al., 2005]: Ցիսպլատինի անմիջական ազդեցությունը գլիկոլիզի ֆերմենտների վրա դեռևս լիովին պարզաբանված չէ: Ցածր չափաբաժինների կիրառման դեպքում (10-75 մկՄ) առողջ բջիջներում ցիսպլատինը խթանում է ապոպտոզը: Ավելի բարձր չափաբաժինների դեպքում (>100մկՄ) երիկամներում գրանցվում է լիպիդների պերօքսիդացում, պիրոլիսաղոլաթթվով խթանված գլյուկոնեոգենեզի արգելակում և քամինոհիպուրատի մեծ քանակների կուտակում, ինչը բնորոշ է օրգանական տրանսպորտային համակարգի արգելակմանը [Schwerdt, 2005]:

Միևնույն ուռուցքի տարբեր բջիջները ցիսպլատինի ազդեցության ներքո կարող են մահանալ թե՛ ապոպտիկ, թե՛ նեկրոտիկ ճանապարհներով [Ying et al., 2005]:

Եթե 80-ականներին իշխում էր այն տեսակետն, որ ցիսպլատինը սպանում է ուռուցքային բջիջները նեկրոզով, իսկ 90-ականներին՝ ապոպտոզով, ապա հիմա պարզվում է, որ այս երկու վարկածներն էլ իրավացի են: Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ ուռուցքային բջիջների մահվան ձևը ցիսպլատինի ազդեցության ժամանակ

որոշվում է բջիջներում ԱԵՖ-ի պարունակությամբ: Եթե այն մեծ է, ապա նույնիսկ ՊԱՌՊ 1-ի գերակտիվացումը չի սպառում նրա պաշարները և բջիջը հնարավորություն է ունենում ավարտել ապոպտիկ ծրագիրը: Հակառակ դեպքում բջիջը մահանում է նեկրոզով [Ha, Snyder, 1999]: Որքան էլ վերջինս անցանկալի է թվում, այնուամենայնիվ, նեկրոտիկ մահն ուռուցքագոյացման ընթացքում կարող է օրգանիզմին ընձեռնել իմունային համակարգի մոբիլիզացման լրացուցիչ հնարավորություն և դրանով իսկ ավելի էֆեկտիվ ծառայել օրգանիզմին, քան ապոպտիկ մահը:

Այն բջիջներն, որոնցում ցիսպլատինի կոնցենտրացիան փոքր է, մահանում են ապոպտոզով: Միևնույն պոպուլյացիայի բջիջներն, որոնց մեջ դեղամիջոցի կոնցենտրացիան մեծ է, մահանում են նեկրոզով: Ուռուցքային բջջի մահվան ձևը կամ եղանակը կախված է ոչ միայն ցիսպլատինի կոնցենտրացիայից, այլև բջջի մեթաբոլիկ վիճակից՝ ԱԵՖ-ի պարունակությունից [Fuertes et al., 2003]:

Ցավոք, ցիտոտոքսիկ հակաուռուցքային դեղամիջոցների արդյունավետությունը մեծապես սահմանափակվում է այն հանգամանքով, որ տևական կիրառման հետևանքով ուռուցքային բջիջները կորցնում են զգայունությունը դրանց նկատմամբ [Fuertes et al., 2003]: Ձեռք բերած «դեղային կայունության» պատճառները բազմազան են:

Ուռուցքային բջիջները դառնում են «դեղակայուն» հետևյալ պատճառներով.

- դեղամիջոցի ներթափանցման մեխանիզմների խախտում
- Ոդեղամիջոցի ներբջջային կուտակման խանգարում
- Ոդեղամիջոցի ներբջջային վնասազերծման մեխանիզմների խախտում
- ՊԴՆԹ-ի վերականգնման/ռեպարացիայի էֆեկտիվության մեծացում
- Ուսպոպտոզի գործընթացի թերացումներ

Սակայն պարզվեց, որ հակաուռուցքային դեղամիջոցների ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը կարելի է մեծացնել ներգործելով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա:

1.4.1. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա

Հայտնի է, որ ուռուցքագոյացումը մեծապես պայմանավորված է գենոմի ապակայունացմամբ, ինչի մեջ մեծ դեր ունի ՊԱՌՊ 1-ը:

Ինչպես ցույց է տրվել, ՊԱՌՊ 1-ը, հանդիսանալով քրոմատին-կապված կորիզային ֆունկցիաների ակտիվ մասնակից, մեծ դեր է կատարում բջիջների թե՛ չարորակ վերափոխման ընթացքում, թե՛ վերափոխված բջիջների վերացման խնդրում: Ինչպես պարզվեց, ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները զգալիորեն մեծացնում են հակաուռուցքային դեղամիջոցների արդյունավետությունն, և ֆերմենտի ակտիվության ճնշումը հանդիսանում է քաղցկեղի բուժման ամենախոստումնալից ուղիներից մեկը [Wang, Weaver, 2011]:

Համաձայն իշխող տեսակետի, գենոտոքսիկ գործոններով մակածված ԴՆԹ-ի վնասվածքները կարող են ունենալ երեք տիպի հանգուցալուծումներ: Դրանք են՝

- ✓ ՊԱՌՊ 1-ի չափավոր ակտիվացում, որի հետևանքով խթանվում են ԴՆԹ-ի վերականգնման մեխանիզմները: Այդ դեպքում վնասվածքները վերականգնվում են և բջիջը վերապրում է:
- ✓ ԴՆԹ-ի անվերականգնելի վնասվածքների դեպքում ակտիվանում է կասպազների -3,-6,-7 համալիրն, որը քայքայում է ՊԱՌՊ 1-ն և բջիջը մահանում է ապոպտիկ մահով:
- ✓ ԴՆԹ-ի զանգվածային վնասվածքների ժամանակ տեղի է ունենում ՊԱՌՊ 1-ի գերակտիվացում, որը սպառում է ներբջջային ՆԱԴ⁺-ի, ապա ԱԵՖ-ի պաշարները: Այս պարագայում բջիջը մահանում է նեկրոզով [Lu, Cederbaum, 2007]:

ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները մեծացնում են բջիջների զգայունությունը ցիսպլատինի հանդեպ [He et al., 2010, Clark et al., 2012]:

Ճանաչելով ԴՆԹ-ի խզումներն և ձևափոխված կառուցվածքները [Lonskaya et al., 2005, Wacker et al., 2007] ՊԱՌՊ 1-ը ակտիվանում է ցիսպլատին-ԴՆԹ փոխազդեցության արգասիքներով: Ակտիվացման հետևանքով խթանվում է ԴՆԹ-ի վերականգնման համալիրի անդամների հավաքագրումն և իրականացվում է ԴՆԹ-ի փոխակերպված հատվածների վերականգնումը: Հետազոտությունների արդյունքները

ցույց տվեցին, որ թեև ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալներին կապվում են թե՛ ՊԱՌՊ 1-ն և թե՛ նրա ինքնամոդիֆիկացված ձևն, այնուամենայնիվ, վերջինիս խնամակցությունը ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալների նկատմամբ ավելի ցածր է [Zhu et al., 2010]: ՊԱՌՊ 1-ի ուժգին շարունակական ինքնամոդիֆիկացումը հանգեցնում է նրան, որ ֆերմենտն անջատվում է քրոմատինի համապատասխան հատվածից և ունակ է դառնում միանալ և խթանել ցիսպլատինով մակածված ԴՆԹ-ի նորանոր վնասվածքների ճանաչումն և նորոգումը: Ինքնամոդիֆիկացման արգելակման դեպքում, ՊԱՌՊ 1-ը կապված է մնում ԴՆԹ-ցիսպլատին կայքերում, քողարկելով այդ հատվածները ԴՆԹ-վերականգնող համալիրի սպիտակուցներից: Նման իրավիճակը կոչվում է ՊԱՌՊ 1-ի «ծուղակավորում» և ինքնին կարող է ունենալ ցիտոտոքսիկ ազդեցություն [Murai et al., 2012]:

1.5. Դեղամիջոցների ազդեցության սեռական և հասակային տարբերությունները

Քաջ հայտնի է, որ դեղամիջոցների ճնշող մեծամասնությունը դրսևորում է անցանկալի երկրորդային ազդեցություն, քանզի դրանք ներգործում են ոչ միայն թիրախային ախտածին գործընթացների վրա, այլև լրջորեն խաթարում նորմալ նյութափոխանակությունը: Այս առումով առավել մեծ վտանգ են ներկայացնում ցիտոտոքսիկ և գենոտոքսիկ դեղամիջոցները, որոնք լայնորեն կիրառվում են ուռուցքաբուժության մեջ: Հետևաբար, դեղամիջոցների ֆարմակոկինետիկայի և ֆարմակոդինամիկայի ուսումնասիրությունն անհրաժեշտ է դեղամիջոցների թերապևտիկ արդյունավետությունը բարձրացնելու և կողմնակի ազդեցությունները նվազեցնելու համար [Hamburg, Collins, 2010]: Ցիտոտոքսիկ դեղամիջոցների կիրառման ժամանակ հատուկ նշանակություն է ձեռք բերում նվազագույն արդյունավետ կոնցենտրացիայի որոշումն և կիրառումը: Կուտակված կլինիկական տվյալների վիճակագրական վերլուծությունը ցույց տվեց, որ դեղերի ազդեցությունը մեծապես կախված է հիվանդի սեռից և հասակից:

Դեղամիջոցների ադսորբցիան և յուրացումը մեծապես կախված են այն ուղիներից, որոնցով դրանք օրգանիզմ են ներմուծվում՝ ներարկում, քունկ, կլանում:

Ներարկման պարագայում մեծ նշանակություն ունի ձևը՝ ներորովայնային, մաշկային, մկանային և այլն: Ադսորբցիան կարող է կատարվել մաշկի միջոցով, մարսողական, շնչառական կամ միզասեռական համակարգերի ուղիները պատող էնդոթելիումի շերտով:

Մաշկի կառուցվածքի և կենսաբանական ակտիվությունների (արտազատիչ, շնչառական, ճարպարտադրողական գործառույթներ) տարբերություններն, որոնք բնորոշ են տարբեր սեռերին, անխուսափելիորեն ազդում են դեղերի մաշկային ադսորբցիայի վրա: Կանանց և տղամարդկանց մաշկերը տարբերվում են մի շարք հատկանիշներով:

Շատ դեղամիջոցներ ներմուծվում են օրգանիզմ կլանման միջոցով: Ինչպես հայտնի է, աղեստամոքսային համակարգի զանազան բաժիններում դեղամիջոցի գտնվելու ժամանակը տարբեր է, իսկ տեղափոխության արագությունները կախված են նյութի ճարպալուծությունից, pH-ից, մոլեկուլային զանգվածից և իոնացման աստիճանից, որոնք տարբերվում են տղամարդկանց և կանանց մոտ: Ի լրումն դրան, տղամարդկանց օրգանիզմում գործող լեղաթթուների կազմը տարբերվում է կանանց լեղաթթուներից՝ ազդելով դեղամիջոցների լուծելիության վրա:

Դեղամիջոցների յուրացումը մեծապես կախված է լյարդում գործող դեղամիջոցները փոխակերպող ֆերմենտների (ԴՓՖ) և մասնագիտացած տեղափոխիչ սպիտակուցների գործունեությունից: Դեղամիջոցների մեթաբոլիզմն իրականացնող ԴՓՖ-ների ընտանիքը կազմված է P450 ցիտոքրոմներից, սուլֆոտրանսֆերազներից և ուրիդինդիֆոսֆոզյուկուրոնոզիլտրանսֆերազից: Այս ֆերմենտների ակտիվության վրա մեծապես ազդում են տարբեր բնույթի հորմոններ, ինչով և պայմանավորվում է ԴՓՖ-ների գործունեության կախվածությունը տարիքից և սեռից [Waxman, Holloway, 2009]:

1.5.1.Դեղերի բաշխումն օրգանիզմում

Ադսորբցիայից հետո, անցնելով արյան հոսքի մեջ, դեղամիջոցները կապվում են արյան պլազմայի սպիտակուցների հետ: Դեղերի հետագա տարածումն օրգանիզմում կախված է բազմաթիվ ֆիզիոլոգիական գործընթացներից, այդ թվում՝ մարմնի ֆիզիկական կառուցվածքից և ճարպաշերտի բաշխումից:

Տղամարդկանց և կանանց արյան պլազմայի սպիտակուցներն էական տարբերություններ չեն դրսևորում դեղամիջոցների կապման գործառույթներում: Հարկ է նշել, որ միջինում ազատ ջրի ներբջջային պարունակությունը տղամարդկանց օրգանիզմում ավելի մեծ է: Ի լրումն դրան, տղամարդկանց մոտ ավելի մեծ են արյան, արյան պլազմայի և ձևավոր մասնիկների ծավալները: Թերևս դրանով է պայմանավորված այն, որ ջրալուծ դեղամիջոցների հավասար չափաբաժինների օգտագործման դեպքում, վերջիններիս կոնցենտրացիան կանանց արյան մեջ ավելի մեծ է լինում:

Դեղամիջոցների բաշխումը կարող է տարբերվել նրա շնորհիվ, որ կանանց և տղամարդկանց մոտ տարբերվում են դեպի հյուսվածքներ և օրգաններ ուղղված արյան հոսքերի ծավալները: Հայտնի է, որ դեպի լյարդ ուղղված արյան ծավալը շատ ավելի փոքր է կանանց մոտ և, թեպետ դեղամիջոցները փոխակերպող ֆերմենտների ընտանիքի առանցքային ֆերմենտ CYP3A4-ը ավելի բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում կանանց լյարդում, դեղամիջոցների զտումը նրանց օրգանիզմում ավելի դանդաղ է ընթանում:

Արյան պլազմայում դեղ-կապող հիմնական սպիտակուցները ներկայացված են ալբումինով, α 1-թթվային գլիկոպրոտեինով (AAG) և α գլոբուլիններով: AAG-ի պարունակությունը բջիջներում կախված է էստրոգեններից: β -Էստրադիոլը փոքրացնում է AAG-ի պարունակությունն արյան պլազմայում՝ խթանելով AAG-ի գլիկոլիզացումը լյարդում: Հորմոնի ազդեցության հետևանքով արյան պլազմայում մեծանում է դեղ-կապող գլոբուլինների քանակը՝ փոխելով դեղամիջոցի ակտիվ բաժնի պարունակությունը: β -Էստրադիոլը կարող է կարգավորել ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը լյարդում՝ կոմպլեքսավորվելով ֆերմենտի հետ հորմոնի կորիզային ռեցեպտորի միջոցով [Bigos et al., 2009]:

Բազմաթիվ ճարպալուծ նյութեր, այդ թվում դեղամիջոցներ, թույներ և այլ քսենոբիոտիկներ կարող են ավելի մեծ քանակությամբ կուտակվել կանանց օրգանիզմում ճարպային շերտի պատճառով: Օրգանիզմում ճարպային շերտի բաժնեմասը տատանվում է կախված ոչ միայն սեռից, այլև տարիքից: Կախված

ճարպաշերտի մեծությունից փոխվում են նաև արյունամատակարարման ծավալները և դեղամիջոցի պարունակությունը արյան պլազմայում:

Կանանց և տղամարդկանց մոտ դեղամիջոցների ներծծումը տեղի է ունենում շնչառական ուղիների, աղեստամոքսային համակարգի տարբեր բաժիններում և ընթանում են տարբեր արագություններով: Լեղաթթուների կառուցվածքի սեռական տարբերությունները պայմանավորում են դեղամիջոցների լուծելիության տարբերությունները տղամարդկանց և կանանց մոտ [Nicolas, Espie, 2009]:

Դեղամիջոցների կենսամատչելիությունը մեծապես պայմանավորված է տեղափոխիչ սպիտակուցների արդյունավետ աշխատանքով: Շատ դեպքերում դեղամիջոցների հյուսվածքային բաշխման, չեզոքացման և տոքսիկ ազդեցության սեռից կախված տարբերությունների հիմքում ընկած են տեղափոխիչ սպիտակուցների տարբերությունները [Soldin et al., 2011]:

Տղամարդկանց մոտ ստամոքսային հյուսվածքում ավելի թթվային է ($pH=1.92$), քան կանանց մոտ ($pH=2.59$), բացի այդ ստամոքսային հեղուկի բազային և առավելագույն հոսքի և թթվի արտազատության մակարդակները տղամարդկանց մոտ ևս ավելի բարձր են: Ցածր pH -ը պատճառ է հանդիսանում թույլ թթուների ներծծման ցածր մակարդակի և թույլ հիմքերի ներծծման բարձր մակարդակի համար: Հակադեպրեսանտների (հակաընկճախտային դեղամիջոցների), որոնց մեծ մասը թույլ հիմքեր են, ներծծումն էականորեն ավելի բարձր մակարդակով է կատարվում կանանց մոտ, ինչը խթանվում է նաև ստամոքսի դատարկման ցածր արագությամբ և աղիներով տեղափոխման ավելի երկար տևողությամբ [Bigos et al., 2009]:

1.5.2. Դեղերի մեթաբոլիզմի կարգավորումը լյարդում

Դեղամիջոցների մեթաբոլիզմը (կենսաբանական փոխակերպումները) հիմնականում իրականացվում է լյարդում, ինչպես նաև բարակ աղիներում, թոքերում, երիկամներում և մաշկում: Օրգանիզմում դեղերի կենսաբանական փոխակերպումների վրա մեծապես ազդում է դեղամիջոցների փոխակերպման ֆերմենտների ակտիվությունը լյարդում: Այդ ֆերմենտներին են պատկանում ցիտոքրոմների ընտանիքի ներկայացուցիչները՝ CYP-խմբի ֆերմենտները: Այս խմբի ֆերմենտները գտնվում են լյարդի և բարակ աղիների էնդոցիտոզ բջիջների հարթ էնդոպլազմատիկ

ցանցի թաղանթներում: CYP-երի ակտիվությունների անհատական տարբերությունները պայմանավորված են մի շարք գործոններով՝ կոդավորող գեների պոլիմորֆիզմով և գեների տրանսկրիպցիայի կարգավորումով [Ingelman-Sundberg et al., 2007]: CYP -երի գեների ակտիվացումը լյարդում կարող է մակաձվել մի շարք էպիգենետիկ գործոններով՝ շաքարախտով, բորբոքային գործընթացներով, ակոհոլի օգտագործումով և սպիտակուցային սննդի անբավարար մակարդակով, ցիրկադային ռիթմերով [Gachon et al., 2006]:

Ֆերմենտները կոդավորող գեները գտնվում են աուտոսոմներում, սակայն չի բացառվում, որ դրանց էքսպրեսիան կարգավորվում է սեռական հորմոններով: Ենթադրվում է, որ ֆարմակոկինետիկայի տարբերություններն իգական և արական սեռերի մոտ հիմնականում պայմանավորված են դեղամիջոցների մեթաբոլիկ փոխակերպումների առանձնահատկություններով: Սակայն նախքան դեղամիջոցների մեթաբոլիզմի քննարկումը, հարկ է նշել, որ սեռական հորմոնները կարող են ազդել դեղամիջոցների ներծծման և բաշխման վրա [Waxman, Holloway, 2009]:

Իրականում դեղամիջոցների մեթաբոլիզմի սեռից կախված տարբերությունները սկիզբ են առնում CYP - գեների էքսպրեսիայի մակարդակներից: CYP3A4-ը հանդիսանում է ցիտոքրոմ P450-ի գերակայող ձևը մարդկանց լյարդում: Կանանց լյարդի բջիջներում արտադրվում է ավելի շատ CYP3A4-ի ի-ՌՆԹ և համապատասխան սպիտակուց: Դրանով պայմանավորված է այն հանգամանքը, որ նրանց օրգանիզմում ավելի արագ է կատարվում հակաուռուցքային դեղամիջոց ֆոսֆամիդի N-դիքլորէթիլացումը: Դեղի նման փոխակերպումը կտրուկ մեծացնում է վերջինիս նեյրոտոքսիկ ազդեցությունը: Հաստատված է, որ P450-ի մեկ այլ իզոմերը կոդավորող գենի՝ CYP2A6 –ի ակտիվությունը կարգավորվում է էստրոգենով [Scandlyn et al., 2008]: Ընդհանուր առմամբ սեռական տարբերությունների դրսևորումները դեղերի մեթաբոլիզմի մեջ հանգեցնում են նրան, որ կանանց մոտ ավելի ուժգին են դրսևորվում դեղամիջոցների և հատկապես հակաուռուցքային դեղաբուժման վնասակար ազդեցությունները: Նշենք, որ առնետների լյարդի բջիջներում դրսևորվում է շուրջ 1000 տարբեր գեների էքսպրեսիայի սեռական դիմորֆիզմ [Kwekel et al., 2010]: Թերևս 80-ականներին կուտակվել էին բազմաթիվ տվյալներ, որոնք վկայում էին նրա մասին, որ

սեռական հորմոնների ազդեցությունը դեղամիջոցների մեթաբոլիզմի վրա առնետների և մկների լյարդում միջնորդված է աճի հորմոնի ազդեցությամբ: Արու առնետների լյարդում ԴՓՖ-ների գեների մի մասի լիակատար էքսպրեսիայի համար անհրաժեշտ է աճի հորմոնը, մինչդեռ մյուս մասի էքսպրեսիան կախված չէ դրանից: Ինչպես պարզվեց, աճի հորմոնի ազդեցությունն արու կենդանիների լյարդում իրականացվում է տրանսկրիպցիան ակտիվացնող ազդանշանային գործոններով, մասնավորապես STAT5b-ով: *STAT5b* գենի խաթարումը մկների մոտ հանգեցնում է նրան, որ լիովին վերանում է աճի հորմոնի ազդեցությունն արական գեների էքսպրեսիայի վրա: STAT5b-ի բացակայությունն արու առնետների լյարդում ճնշում է 850 արական գեների 90% -ի ակտիվությունն և հակառակը՝ խթանում է 753 իգական գեների 61% -ի գործունեությունը: Էզ առնետների լյարդում STAT5b-ի ակտիվությունը շատ ավելի ցածր է STAT5a-ի ակտիվությունից, որն անհրաժեշտ է իգական գեների էքսպրեսիայի համար [Clodfelter et al., 2006, Clodfelter et al., 2007]: Այսպիսով, արուների մոտ STAT5b-ն խթանում է արական գեների և ճնշում է իգական գեների էքսպրեսիան:

Գեների էքսպրեսիայի կարգավորման մեխանիզմներից մեկը հանդիսանում են քրոմատինի փաթեթավորման փոփոխությունները: Նման գործընթացներում քրոմատինի առանձին խտացված հատվածներ կարող են ապապարուրվել՝ դառնալով ավելի մատչելի տրանսկրիպցիայի գործոնների համար: Քրոմատինի փաթեթավորմանը մասնակցում են բազմաթիվ էպիգենետիկ գործոններ՝ ԴՆԹ-ի մեթիլացում, հիստոնների ացետիլացում, կորային հիստոնների և քրոմատին-կապված ոչ հիստոնային սպիտակուցների ֆոսֆորիլացում, մեթիլացում, պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացում և այլն: Պարզվեց, որ դեղամիջոցների և քսենոբիոտիկների մեթաբոլիզմի մասնակից սպիտակուցներ կոդավորող *CYP2C11* և *Slp* գեների ԴՆԱզ գերզգայուն տեղամասերը պրոմոտորային հատվածներում, որտեղ քրոմատինը գրեթե լիովին ապապարուրված է, տարբերվում են առնետների արական- և իգական-սպեցիֆիկություն դրսևորող գեների մոտ: Աճի հորմոնի տևական ազդեցության դեպքում արուների լյարդում ավելի ակտիվ *CYP* գեների հավաքակազմը կարող է փոխվել իգական օրգանիզմին հատուկ ակտիվ *CYP* գեների հավաքակազմի: Այս երևույթը կոչվում է գեների ֆեմինիզացում: Այն կարող է կատարվել STAT5b, FOXA2 և

FOXA1 գործոններով, որոնք կարող են միանալ համապատասխան գեների էնհանսերներում տեղակայված նուկլեոսոմային ԴՆԹ-ին և խթանել քրոմատինի ապապարուրումն և տրանսկրիպցիայի ակտիվացումը կարգավորող այլ տարրերի միացումը [Endo et al., 2005]:

Ընդհանրացնելով քննարկված տվյալները, կարելի է եզրակացնել, որ դեղամիջոցների մեթաբոլիկ փոխակերպումները կատարող ֆերմենտների գործունեության սեռից-կախված տարբերությունները մեծապես պայմանավորված են աճի հորմոնի կարգավորիչ ազդեցությամբ, որի պարունակությունն արյան պլազմայում տարբեր է իգական և արական օրգանիզմներում:

Գոյություն ունեն մի շարք օրինակներ, որոնք վկայում են այն մասին, որ իգական սեռական հորմոնները ազդում են դեղերի նյութափոխանակության ուղիների վրա: Կանանց մոտ գրանցվել է բարձր զգայունություն օպիոիդների հանդեպ: Հայտնի է, որ օպիոիդային ռեցեպտորների խտությունն և դոֆամիներգիկ ֆունկցիան ենթակա են իգական հորմոնների ազդեցությանը՝ կանանց մոտ ցավազրկման ժամանակ բերելով բացասական ռեակցիաների (ADR) բարձր մակարդակների, ինչպիսիք են շնչառության դժվարացումը և մշտական ուժգին ցավերը: Ավելին, սեռական հորմոնները ներգրավված են նաև ցավազրկող դեղամիջոցների թիրախ հանդիսացող գամա-ամինակարապաթեվի ռեցեպտորների ֆունկցիոնալ փոփոխությունների մեջ: Էստրոգեններն ունեն թաղանթային, ցիտոպլազմային և կորիզային թիրախներ [Nicolson et al., 2010]: Տույց է տրվել, որ α - էստրադիոլը կապվում և գործի է դնում թաղանթային իոնային անցուղիներն և ռեցեպտորներն, ինչպիսիք են ԱԵՖ-K⁺ սրտամկանային անցուղին և օպիոիդային ռեցեպտորները: Էստրոգենի կորիզային թիրախները ER α հորմոնային ռեցեպտորներն են, որոնք անմիջականորեն կարգավորում է *CYP1B1* –ի էքսպրեսիան [Tsuchiya et al., 2004.]:

Էստրոգենի և պրոգեստերոնի բարձր մակարդակները փոխում են լյարդի ֆերմենտների ակտիվությունն, ինչը կարող է մեծացնել դեղամիջոցների կուտակումը կամ իջեցնել որոշ դեղամիջոցների չեզոքացման մակարդակը: Իգական ստերոիդային հորմոններն և պրոլակտինը մասնակցում են աուտոիմունային ռեակցիաներին և աուտոիմունային/բորբոքային հիվանդությունների հետ կապված ախտաճին

իրավիճակների ձևավորմանը: Վերջիններիս հաճախականությունը կանանց մոտ 2-10 անգամ ավելի մեծ է, քան տղամարդկանց մոտ: Նյութափոխանակության փոփոխությունները կարող են կախված լինել նաև այն հորմոններից, որոնց քանակությունն օրգանիզմում փոխվում է դաշտանային ցիկլի ընթացքում, հակաբեղմնավորիչների կիրառման արդյունքում, հղիության կամ դաշտանի ընդհատման ընթացքում: Դաշտանային ցիկլի ընթացքում սեռական հորմոնների մակարդակը կապված է լյարդի յուրահատուկ ֆերմենտների ակտիվացման և որոշ դեղերի մաքրման (քլիրենս) մակարդակի հետ: Օրինակ, կաֆեինի և թեոֆիլինի մաքրումն օրգանիզմից ավելի արագ է վաղ ֆոլիկուլային փուլում և ավելի երկարացված է դեղին մարմնի միջին փուլում [Buchanan et al., 2009]:

Դեղամիջոցների մեթաբոլիզմն և դեղորայքի վնասաբեր ազդեցության պատճառները բազմազան են և լիովին ուսումնասիրված չեն: Սակայն արդեն իսկ կուտակված փաստերը վկայում են, որ դեղամիջոցներն ավելի շատ են կուտակվում կանանց արյան պլազմայում, ինչի պատճառով նրանց մոտ ավելի շատ և հաճախ են արտահայտվում դեղերի բացասական ազդեցությունները:

1.5.3. Դեղամիջոցների հեռացումն օրգանիզմից

Դեղամիջոցների հեռացումն օրգանիզմից կատարվում է երկու փոխլրացնող ուղիներով՝ մեթաբոլիկ փոխակերպումների և արտաթորության շնորհիվ: Եթե չգործեն այս ուղիները, դեղամիջոցները շարունակորեն կշրջեն օրգանիզմում և, կապվելով զանազան ռեցեպտորների հետ, էապես կխաթարեն զանազան ֆիզիոլոգիական գործընթացներ: Օրգանիզմից դեղերը հեռացվում են երեք հիմնական ուղիներով՝ երիկամներով, լյարդի և թոքերի միջոցով: Դրանց հիմնական զանգվածն օրգանիզմից դուրս է մղվում արտազատման շնորհիվ (մեզ և կղկղանք):

Երիկամները հանդիսանում են դեղամիջոցների և դրանց մեթաբոլիտների արտազատման հիմնական օրգանները (երիկամային քլիրենս): Երիկամային արտազատման գործընթացը կազմող բոլոր երեք գործառույթները՝ ֆիլտրում, խողովակային արտազատում և ռեադսորբցիա, էապես տարբերվում են էգերի և արուների մոտ: Երիկամային քլիրենսն ավելի մեծ է տղամարդկանց մոտ [Wang, Huang, 2007]: Հայտնի է, որ բոլոր հասակային խմբերում մեթաբոլիկ փոխակերպումներն

ավելի արագ են կատարվում տղամարդկանց օրգանիզմներում: Դա տեղի է ունենում այն պատճառով, որ տղամարդկանց օրգանիզմում ավելի ակտիվ գործող կմախքային մկանների զանգվածն ավելի մեծ է:

Գլյուտատին-Տ-տրանսֆերազը դեղերի չեզոքացման գործընթացի հիմնական գործող ֆերմենտներից է: Պարզվել է, որ ֆերմենտի երիկամային իզոֆերմենտները տարբեր են տղամարդկանց և կանանց մոտ: Այսպիսով, տղամարդկանց և կանանց սեռից կախված ֆիզիոլոգիական և ֆարմակոգենետիկական տարբերությունները պայմանավորում են դեղամիջոցների արդյունավետության և տոքսիկ ազդեցությունների վերագնահատման անհրաժեշտությունը [Wauthier, Waxman, 2008]:

ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների ընդլայնվող կիրառությունը տարբեր հիվանդությունների բուժման ժամանակ բացահայտեց, որ դրանց արդյունավետությունը մեծապես կախված է ոչ միայն ԴՆԹ-ի վնասվածքների վերականգնման մեխանիզմների առանձնահատկություններից և ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունից [Montoni et al., 2013], այլև հիվանդի սեռից [Jog, Carichio, 2013, Zaremba et al., 2011]: Կուտակված տվյալներն եկան հաստատելու, որ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների թերապևտիկ ազդեցության սեռից-կախված առանձնահատկությունները պետք է անհրաժեշտաբար հաշվի առնվեն չափաբաժինների և բուժման տևողության որոշման ժամանակ:

ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Փորձարարական հետազոտությունների ընթացքում օգտագործվել են Sigma (ԱՄՆ) ֆիրմայի ռեակտիվներ: Հետազոտվել են 6 շաբաթական (ոչ սեռահասուն) և 10 շաբաթական (սեռահասուն) ոչ ցեղատեսակային սպիտակ լաբորատոր էգ և արու առնետներ՝ 100 գ և 150 գ զանգվածով, համապատասխանաբար: Յուրաքանչյուր փորձարարական հետազոտության ընթացքում օգտագործվել է 4 առնետ: Ցիսպլատինի ջրային լուծույթը 10 մգ/1000գ կենդանու զանգվածի հաշվարկով ներարկվել է ներորովայնային ձևով: Կենդանիները գլխատվել են ցիսպլատինի ներարկումից 48 ժամ հետո թեթև եթերային անզգայացումից հետո: Հիդրոկորտիզոնի ջրային սուսպենզիան ներարկվել է ներորովայնային 5մգ և 10մգ/1000գ կենդանու զանգվածի հաշվարկով: Առնետները գլխատվել են հորմոնի ներարկումից 24 ժամ հետո: Ստուգիչ խմբի կենդանիներին ներարկվել է 0.2մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթ: Հետազոտությունների ընթացքում պահպանվել են “Փորձարարական և գիտական այլ նպատակների համար օգտագործվող ողնաշարավոր կենդանիների պաշտպանության” Եվրոպական կոնվենցիայի պահանջները (Ստրասբուրգ, 18 մարտի, 1986թ.): Կենսաէթիկայի ազգային կենտրոնի արձանագրությունը կից ներկայացվում է:

2.1. Կորիզների անջատում

Կորիզների անջատումը թիմոցիտներից և լյարդի բջիջներից իրագործվել է Հյուիշի մեթոդով [Hewish, Burgoyne, 1973]: Հոմոգենացման միջավայրի կազմի մեջ մտնում են հետևյալ բաղադրիչները՝ 0.25 Մ սախարոզ; 20 մՄ Տրիս pH 7.4; 60մՄ KCl; 15մՄ NaCl; 0.15մՄ սպերմին և 0.5մՄ սպերմիդին: Լյարդի կորիզների անմշակ նստվածքը վերասուսպենզվել է ռեակցիոն միջավայրում, որը պարունակել է 2.2 Մ սախարոզ, 20 մՄ Տրիս pH 7.4; 60մՄ KCl; 15մՄ NaCl; 0.15մՄ սպերմին և 0.5մՄ սպերմիդին և ցենտրիֆուգվել 60 րոպե տևողությամբ (24000 g): Սախարոզի ավելցուկից կորիզային նստվածքում ազատվել ենք լրացուցիչ սուսպենզավորմամբ 0,25 Մ սախարոզում, որին հետևել է ցենտրիֆուգում (700 g, 15 րոպե):

Թիմոցիտներն անջատվել են ուրցագեղձի մանրացումից և թույլ շփվող տեֆլոնե միսոցով ապակե հոմոգենատորում խյուսի խնայող հոմոգենացումից հետո: Թիմոցիտների հոմոգենացման միջավայրը նույնն է, ինչ լյարդի հոմոգենացման համար: Թիմոցիտների կորիզներն անջատվել են ցենտրիֆուգման միջոցով (700g, 15 րոպե): Նստվածքում ստացված կորիզները վերասուսպենզվել են հոմոգենացման միջավայրում: Կորիզների վերջնական պատրաստուկը ստացվել է ցենտրիֆուգումից հետո (700g, 15 րոպե):

Լյարդի բջիջների և թիմոցիտների կորիզային կախույթների խտությունները նորմավորվել են ըստ 1N NaOH-ում լուծված նմուշների օպտիկական խտության, որը համապատասխանում է 1մգ/մլ ԴՆԹ-ի լուծույթի կլանմանը: Համապատասխան նոսրացումներից հետո 0.1մլ ծավալով կորիզային կախույթի նմուշներն ինկուբացվել են հոմոգենացման միջավայրում 37°C-ում տարբեր տևողությամբ:

2.2. ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորումը մեկուսացված կորիզներում

Քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման որակական և քանակական վերլուծության համար կորիզային նմուշներին ավելացվել են CaCl_2 և MgCl_2 լուծույթներն այնպես, որ երկվալենտ իոնների վերջնական կոնցենտրացիաները հավասարվեն 1 մM և 6մM, համապատասխանաբար: Աղերի ավելացումից հետո կորիզային կախույթներն ինկուբացվել են 60 րոպե 37°C-ում: Երկվալենտ իոնների ներկայությամբ կորիզների ինկուբացումից հետո ԴՆԹ-ի էնդոնուկլեոլիտիկ ճեղքավորման ռեակցիան դադարեցնելու նպատակով հետագոտվող նմուշների վրա ավելացվել է 1մլ տարալուծող լուծույթ հետևյալ բաղադրությամբ. 0,5 M Տրիս pH 8; 0.5 M EDTA; 0.8% SDS: Ֆրագմենտավորված ԴՆԹ-ն հետագոտվել է կորիզներից անջատումից հետո:

2.3. ԴՆԹ-ի անջատում

ԴՆԹ-ի անջատումը կատարվել է ըստ արձանագրության [Sambroock, Russel, 2001]: Մեկուսացված կորիզներից ԴՆԹ-ի անջատումը թույլ է տալիս շրջանցել պրոտեինազ K-ով ավելցուկային սպիտակուցների քայքայման փուլը: Կորիզների տարալուծումից հետո, որը տևում է 24 ժամ, խառնուրդը վեր է ածվում թափանցիկ

մածուցիկ լուծույթի: ՌՆԹ-ի հեռացման համար նմուշները մշակվել են ՌՆազ A-ով (20մկգ/մլ) 30 րոպե տևողությամբ 37°C-ում: Կորիզային սպիտակուցների մնացորդներն, ինչպես նաև ՌՆազը, հեռացվել են 7.5 Մ ամոնիումի ացետատի ավելացումով, այնպես, որ աղի վերջնական կոնցենտրացիան նմուշում կազմել է 2.5 Մ: Բնափոխված սպիտակուցներն առաջացնում են սպիտակ փաթիլանման նստվածք: Սպիտակուցների նստվածքն անջատվել է ցենտրիֆուգումով (15 րոպե, 22000 g, 3°C): ԴՆԹ պարունակող վերնստվածքը տեղափոխվել է մաքուր փորձանոթների մեջ: Այնուհետև ԴՆԹ –ի անջատման նպատակով վերնստվածքին ավելացվել է սառեցված իզոպրոպիլ սպիրտ՝ մինչև 60-75% վերջնական կոնցենտրացիան: Նմուշները սառեցվել են սառնարանի սառցախցիկում (-24°C) 12-14 ժամ: ԴՆԹ-ի ձևավորված նստվածքը անջատվել է ցենտրիֆուգումով (10000 g, 15 րոպե): Իզոպրոպիլ սպիրտը հեռացնելու համար ԴՆԹ-ի նստվածքը մշակվել է էթանոլով (70%), որից հետո լուծվել է համապատասխան լուծիչում՝ TE-ում (10մՄ Տրիս pH 8; 1մՄ EDTA):

2.4. ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզ

ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզն իրականացվել է 1.8%-ոց ազարոզային ժելում TAE բուֆերում (100մՄ Տրիս pH 8; 0,89Մ քացախաթթու; 0.02Մ EDTA) [Sambroock, Russel, 2001]: Ժելում ԴՆԹ –ի ֆրագմենտները տարաբաժանող դաշտի լարվածությունը կազմել է 8 վ/սմ: ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների երևակման համար ժելն ինկուբացվել է էթիդիումի բրոմիդի լուծույթում (0.5 մկգ/մլ) 10 րոպե: Ներկի ավելցուկը հեռացվել է հոսող ջրի շիթի տակ 10 րոպեի ընթացքում: Ժելերի լուսանկարումը կատարվել է թվային լուսանկարչական ֆոտոխցիկով HP-730 մակրոլուսանկարման ռեժիմում ներթափանցող ուլտրամանուշակագույն լուսավորման պայմաններում (տրանսիլյումինատոր՝ Vilber Lourmat ECX-20M, 305 նմ):

2.5. Ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման ինտենսիվության որոշում

ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների քանակական պարունակության որոշումն իրականացվել է ժելի թվային լուսանկարի նեգատիվ պատկերի միջոցով, որը վերլուծվել է համակարգչային ծրագրով (FUJIFILM, Science lab, Image Gauge V4.0) [Science Lab, 2001]: Ծրագիրը հնարավորություն է տալիս քանակապես գնահատել

դենսիտամետրման կորի գումարային մակերեսն, այսինքն ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների լուսարձակման (նեգատիվի պարագայում՝ սև բծի գունավորման) գումարային ինտենսիվությունը:

2.6. Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվության որոշում

Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվությունն որոշվել է Փուֆի և Հերգենրոթերի կողմից մշակված մեթոդով [Putt, Hergenrother, 2004]: Մեթոդի հիմքում ընկած է հիմնային միջավայրում մրջնաթթվի ներկայությամբ ՆԱԴ⁺-ի և ացետոֆենոնի միջև տեղի ունեցող ռեակցիան, որի արդյունքում առաջանում է գունավորված վերջնանյութ: Գունավորված վերջնանյութի առավելագույն կլանումը չափվում է 378 նմ ալիքի երկարության տակ: Մեր կողմից մշակված հատուկ մոտեցումների շնորհիվ մեթոդը կիրառվել է կորիզային պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվության որոշման համար: Հոմոգենացման միջավայրում սուսպենզված կորիզներին (1մլ) հաջորդաբար ավելացվել են 20մՄ CaCl₂, 180 մՄ MgCl₂ և 4.3մՄ ՆԱԴ⁺-ի մայրական լուծույթներ: Նշված նյութերի վերջնական կոնցենտրացիաները 1.25 մլ ռեակցիոն ծավալում կազմել են 1մՄ, 6մՄ և 0.5 մՄ՝ CaCl₂, MgCl₂ և ՆԱԴ⁺-ի համար, համապատասխանաբար: Կորիզներն ինկուբացվել են 10ր, 37°C պայմաններում, որից հետո ռեակցիան դադարեցվել է ցենտրիֆուգման միջոցով ռեակցիոն միջավայրից կորիզների հեռացումով: Մնացորդային ՆԱԴ⁺-ի քանակն որոշվել է 50 մկլ վերնստվածքային լուծույթի վեցական նմուշներում: Վերնստվածքային լուծույթի համապատասխան ծավալներին հաջորդաբար ավելացվել են 2Մ KOH-ի, 20% ացետոֆենոնի և 88% մրջնաթթվի լուծույթներ: Ռեակտիվների վեջնական կոնցենտրացիաները ռեակցիոն միջավայրում KOH-ի, ացետոֆենոնի և մրջնաթթվի համար կազմել են 222մՄ, 2.2% և 44%, համապատասխանաբար: Նշված պայմաններում կորիզային սուսպենզիաների օպտիկական կլանումն ունի գծային կախվածություն ՆԱԴ⁺-ի քանակից: Որպես ՊԱԴՊ 1-ի հարաբերական ակտիվության միավոր ընդունվել է 1 մգ/մլ ԴՆԹ պարունակող կորիզային սուսպենզիայի կողմից 10 րոպեում սպառված ՆԱԴ⁺-ի քանակը:

2.7. Իմունանույնականացում (Western-blotting)

Սպիտակուցների քանակական որոշումն իրականացվել է ըստ սպիտակուցների էլեկտրաֆորեզի և իմունաբլոթինգի համար անհրաժեշտ սարքավորումներն և լուծույթներն արտադրող ընկերությունների արձանագրությունների [Electrophoresis and Blotting, Bio-Rad, 2011, Electrophoresis: A guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis, Bio-Rad, 2011, Protein Eceptorphoresis, Technical Manual, Amersham Biosciences, General Western Blot Protocol, Abcam, 2013, Mahmood, Yang, 2012]:

Բջիջների հոմոգենատը վերլուծվում է էլեկտրոֆորետիկ բաժանման միջոցով պոլիակրիլամիդային ժելում (ՊԱժ), որի ընթացքում սպիտակուցները տարաբաժանվում են ըստ մոլեկուլային զանգվածի: Մեր փորձերում SDS-ՊԱժ էլեկտրոֆորեզի համար օգտագործվել են 10%-անոց բաժանող (pH 8,8) և 5%-անոց կոնցենտրացնող (pH 6,8) ժելեր: Էլեկտրոֆորեզը իրականացվել է 120 V լարվածություն ունեցող դաշտում հետևյալ բաղադրությամբ բուֆերային լուծույթում՝ 1,5M տրիս pH 8.3, գլիցին, SDS (Na^+ -դոդեցիլսուլֆատ):

Ըստ զանգվածի բաժանված սպիտակուցները նույնականացնելու համար պոլիակրիլամիդային ժելից դրանք տեղափոխել են նիտրոցելյուլոզային թաղանթի վրա: Տեղափոխումն իրականացվել է 70վ լարվածության դաշտում հետևյալ բուֆերային լուծույթում (25 մM Տրիս, 192 մM գլիցին և 20% մեթանոլ, pH 8,3): Տեղափոխումը տևել է 90-100 րոպե սառը պայմաններում: Նիտրոցելյուլոզային թաղանթը սպիտակուցներով ինկուբացվել է արգելափակող լուծույթում (10մM Տրիս, 150մM NaCl, 0,05% Tween 20): Սպիտակուց-հակամարմին ոչ մենահատուկ կապումն արգելակելու համար ինկուբացման բուֆերին ավելացվել է հորթի շիճուկային ալբումին՝ 3% վերջնական կոնցենտրացիայով: Ինկուբացումը տևել է 24 ժամ, 4°C: Ինկուբացման ավարտից հետո թաղանթները լվացվել են բուֆերով: Առաջնային հակամարմինների հետ ինկուբացումն ընթացել է հետևյալ պայմաններում. առաջնային հակամարմինների քանակը միջավայրում համապատասխանել է արտադրող ընկերության ցուցումներին, տևել է նվազագույնը 2 ժամ: Առաջնային հակամարմիններ պարունակող միջավայրի հեռացումից և դրան հետևող լվացումներից հետո կատարվել է ինկուբացում երկրորդային հակամարմիններ պարունակող լուծույթում: Թաղանթի վրա

սպիտակուցային գծերի երևակման համար օգտագործվել են թթու ֆոսֆատազի սուբստրատները: Դրանք են BCIP/NBT (5-բրոմ-4-քլոր-3'-ինդոլիլֆոսֆատ ք-տոլուիդինի աղ)/(նիտրոկապույտ տետրազոլիումի քլորիդ) համալիրը: Նախապես չորացված թաղանթը տեղափոխվում է BCIP/NBT պարունակող բուֆերի մեջ, որից 3-4 րոպե անց սկսում են երևակվել սպիտակուցի գծերը:

2.8. Լուսային մանրադիտակում

Բոլոր փորձարարական խմբերի կենդանիների ուրցագեղձերը ֆիքսվել են 24 ժամվա ընթացքում Չեմբեռլենի ֆիքսող խառնուրդում (70% էթիլ սպիրտ, 40% ֆորմալին, սառցաքացախաթթու): Նմուշները ջրազրկվել են աճող տոկոսայնությամբ սպիրտի լուծույթներում. երկու անգամ 80% էթիլ սպիրտի մեջ 1-2 ժամ տևողությամբ, մեկ անգամ 96% էթիլ սպիրտում 1-2 ժամ և վերջնականը՝ 1 ժամ 100% բացարձակ սպիրտում: Քսիլոլով լվացումից հետո ֆիքսված նմուշները պարփակվել են պարաֆինում և պատրաստվել են ուրցագեղձի 5 մկմ 100 պարաֆինային կտրվածքներ: Պարաֆինը կտրվածքներից հեռացվել է քսիլոլով: Հիստոլոգիական նմուշները ներկվել են հեմատոքսիլինով 5-6 րոպեի ընթացքում (բջջակորիզների ներկում), որին հետևել է լվացում ջրում (2 րոպե): Ցիտոպլազման ներկվել է 1% էոզինով (1-2 րոպե): Ներկելուց հետո կատարվել է կտրվածքների ջրազրկում 70% և 96% էթիլ սպիրտում (2-ական րոպե), որին հետևել է մասնակի գունաթափումը քսիլոլով (2 րոպե): Նմուշներն ուսումնասիրվել են լուսային մանրադիտակով (խոշորացում 400 անգամ):

2.9. Վիճակագրական վերլուծություն

Արդյունքների վիճակագրական տարբերություններն որոշվել են ըստ Ստյուդենտի չափորոշիչի [Rice, 2006]: $p < 0.05$, տվյալները համարվել են վստահելի:

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ և ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

3.1. Ցիսալատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում

Քաղցկեղային բջիջների բարձր կենսունակությունը հաճախ պայմանավորված է դրանց մահվան գենետիկական ծրագրերի խաթարմամբ կամ բազմազան էպիգենետիկ բնույթի փոփոխություններով: Մասնավորապես, քաղցկեղային բջիջների մեծամասնության մոտ դիտվում են մուտացիաներ այն գեներում, որոնք պատասխանատու են p53 սպիտակուց-կախյալ ապոպտոզի իրականացման համար, ինչպես նաև մուտացիաներ ՊԱՌՊ 1 –ի գենում [Eastman, Perez, 2006]: Ինչպես արդեն նշվել է, ՊԱՌՊ 1-ը կենտրոնական դեր է կատարում ԴՆԹ–ի վնասվածքների, բջիջների կենսունակության վերականգման, ինչպես նաև բջջային մահվան տարբեր մեխանիզմների խթանման գործընթացներում [Megnin-Chanet et al., 2010]: Ակնհայտ է, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը բջջում կարող է փոփոխվել ոչ միայն համապատասխան գենի մուտացիայի շնորհիվ, այլև բազմաթիվ ներբջջային ազդակների ներգործության հետևանքով:

ՊԱՌՊ 1–ի ցածր ակտիվությունը կարող է արգելակել ԴՆԹ–ի վերականգնումն և այդ դեպքում բջիջը չի կարողանա հաղթահարել միթոզի միջփուլային անցակետային արգելքները: Նման իրավիճակում խթանվում են ապոպտիկ գործընթացները: Մյուս կողմից, ԴՆԹ–ի զանգվածեղ վնասվածքների հետևանքով ՊԱՌՊ 1 –ը կարող է գերակտիվանալ: Այս դեպքում բջջին սպառնում է ՆԱԴ⁺-ի պաշարների լիակատար սպառումը: Այդ պաշարների վերականգնման ճիգերը հանգեցնում են ներբջջային ԱԵՖ–ի պարունակության կտրուկ նվազմանը: Էներգետիկ պաշարների սպառման հետևանքով վրա է հասնում բջջի նեկրոտիկ մահը [Burkle, 2005]:

Վերջին տասնամյակում կատարված հետազոտությունների տվյալները եկան հաստատելու ՊԱՌՊ 1-ի ազդեցության բարդ մեխանիզմները: Պարզվեց, որ թեև ֆերմենտի ակտիվացումը դիտվում է բազմաթիվ ախտածին վիճակներում և բուն

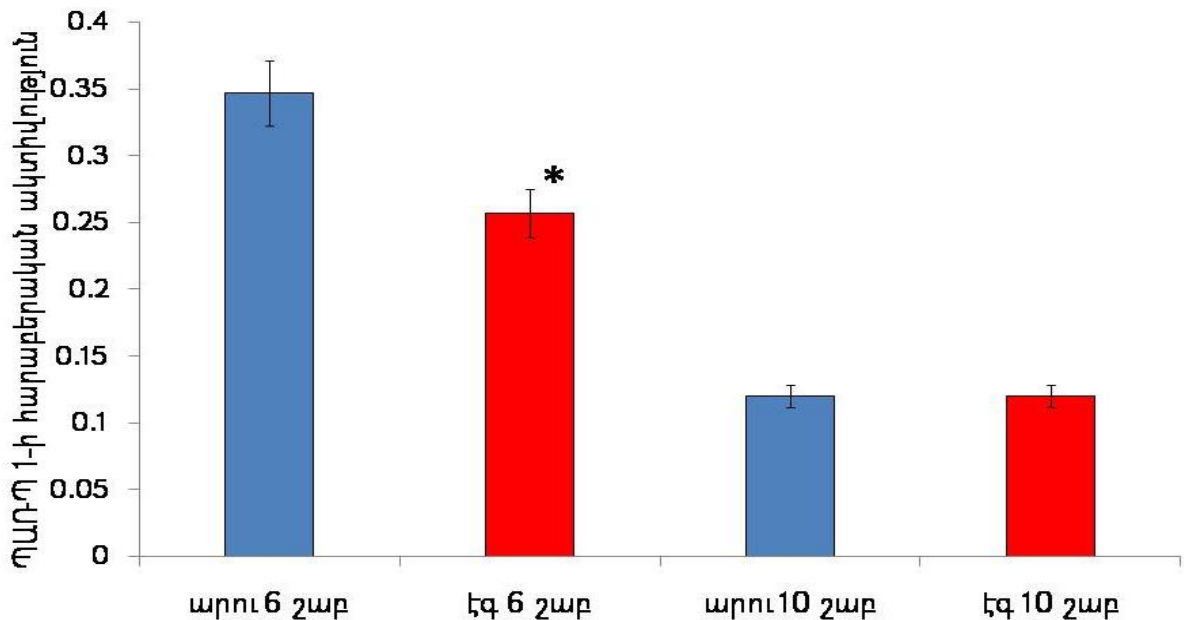
հիվանդությունների ժամանակ, ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման բուժիչ ներգործությունը տարբեր է արական և իգական սեռերի մոտ [Szabo et al., 2006]: Սեռական դիմորֆիզմի նման դրսևորումը չափազանց կարևոր խնդիր է առաջ քաշում: Այն կայանում է նրանում, որ չարորակ ուռուցքների դեղաբուժումը պետք է մշակվի ելնելով հիվանդի սեռից: Քաղցկեղային բջիջներում ՊԱՌՊ 1 –ի ակտիվության վերահսկումն և նպատակաուղղված կարգավորումը կարող է զգալիորեն մեծացնել հակաուռուցքային թերապիայի արդյունավետությունն և միաժամանակ թույլ կտա նվազեցնել դեղամիջոցների տոքսիկ ազդեցությունն առողջ հյուսվածքների և օրգանների վրա:

Առաջին խնդիրն, որը դրված էր մեր առջև տվյալ աշխատանքում, կայանում էր ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվության որոշման մեջ տարբեր հասակի էգ և արու առնետների լյարդի բջջակորիզներում:

Նկար 7-ում ներկայացված տվյալներն արտացոլում են ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունը տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Ինչպես տեսնում ենք ստացված արդյունքներից, ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը լյարդի բջջակորիզներում ունի սեռից և հասակից կախված արտահայտված տարբերություններ: Ոչ սեռահասուն արու առնետների լյարդում ֆերմենտի ելակետային ակտիվությունն ավելի քան 25%-ով գերազանցում է էգ կենդանիների հեպատոցիտների ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությանը: Հայտնի է, որ շուրջ 1000 գեների էքսպրեսիան լյարդում դրսևորում է սեռից-կախված սպեցիֆիկություն [Kwekel et al., 2010], ինչը կարող է բացատրել ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունների տարբերությունն ոչ սեռահասուն էգ և արու առնետների լյարդի բջջակորիզներում:

Ինչպես տեսնում ենք զետեղված տվյալներից, սեռահասուն կենդանիների մոտ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռից կախված տարբերությունները վերանում են: Հավանաբար, սեռահասուն կենդանիների մոտ գերակայում են ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորման կենսաքիմիական մեխանիզմներն, որոնց գործունեությունը կախված չէ ֆերմենտային սպիտակուցի քանակից (գենային էքսպրեսիայի տարբեր մակարդակներից): Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ֆերմենտի ելակետային ակտիվությունները կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում

հասակի հետ փոքրանում են 2,5-3 անգամ, ինչը համահունչ է գրական տվյալներին [Mangerich, Burkle, 2012]:



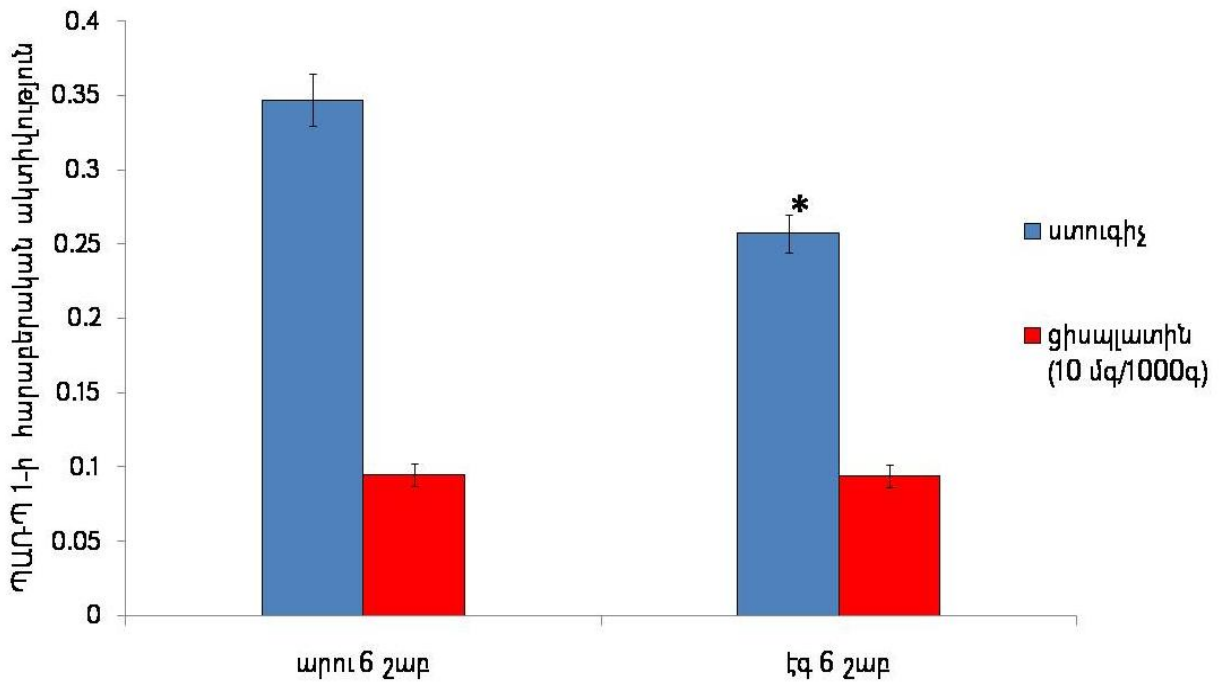
Նկար 7. ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունն ոչ սեռահասուն և սեռահասուն արու և էգ ստուգիչ խմբի առնետների լյարդի բջջակորիզներում, * - $p < 0.05$:

ՊԱՌՊ 1-ը յուրահատուկ ֆերմենտ է, որի ակտիվությունն ունի երկու բաղադրիչներ՝ ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերացում և տրանսպոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերացում [D'Amours et al., 1999]: Ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերացման ժամանակ ԱԿՖ-ռիբոզի մնացորդները միացվում են ինքնամոդիֆիկացման դոմենում գտնվող լիզինային և արգինինային մնացորդների կողմնային շղթաներին, մինչդեռ տրանսպոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերացման ընթացքում ԱԿՖ-ռիբոզի մնացորդները տեղափոխվում են այլ սպիտակուցային մոլեկուլների համապատասխան ամինաթթուների կողմնային շղթաների վրա: Ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերացման գործընթացը կարգավորում է ՊԱՌՊ 1-ի և քրոմատինի կազմում գտնվող ԴՆԹ-ի միջև գործող կապի ուժգնությունը: ԴՆԹ-ն տվյալ պարագայում հանդես է գալիս «կոֆերմենտի» դերում: Սակայն ՊԱՌՊ 1-ի կենսաբանական ֆունկցիաների

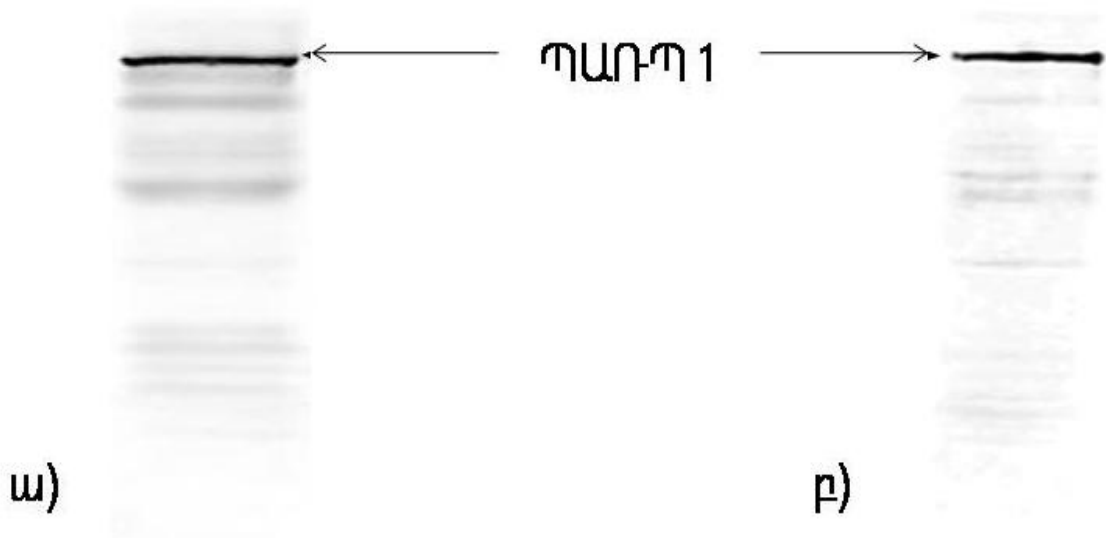
կատարման համար (նիք-սենսորային, ԴՆԹ վերականգնման սպիտակուցների համալիրի հավաքագրում) անհրաժեշտ է ֆերմենտի և ԴՆԹ-ի կապի դինամիկ բնույթի ապահովումը: Ֆերմենտի անդարձելի միացումը ԴՆԹ-ին հանգեցնում է, այսպես կոչված, ֆերմենտի «ծուղակավորմանը», ինչը խոչընդոտում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացմանը ԴՆԹ –ի վնասվածքների կամ քիմիական ձևափոխությունների հետևանքով [Horton, Wilson, 2013]: ՊԱՌՊ 1-ի ինքնամոդիֆիկացման հետևանքով ֆերմենտի մոլեկուլը ձեռք է բերում բացասական լիցք և վերջինիս կապը ԴՆԹ-ի հետ թուլանում է, ֆերմենտն անջատվում է ԴՆԹ-ից: Այս ճանապարհով ազատված ֆերմենտի մոլեկուլները կարող են փոխազդեցության մեջ մտնել ԴՆԹ-ի նորանոր հատվածների հետ, պայմանավորելով ֆերմենտի ակտիվացումն և ազդանշանելով ԴՆԹ-ի վնասված հատվածները քրոմատինում: Ինքնամոդիֆիկացման բաժնին է ընկնում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության գրեթե 99% [Kun et al., 2004]: Պարզվել է, որ ակտիվ բազմացող բջիջներում գերակշռում է ՊԱՌՊ 1-ի ինքնամոդիֆիկացումն, որը ապահովում է ֆերմենտի բարձր ակտիվությունը [Kun et al., 2006]: Ելնելով նրանից, որ սեռահասուն առնետների մոտ լյարդի զանգվածի աճը դանդաղում է, մեր կողմից դիտվող ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության նվազումը կարելի է բացատրել ֆերմենտի տրանսամոդիֆիկացնող ակտիվության գերակայությամբ:

Մեր կողմից ստացված արդյունքները վկայում են, որ ցիսպլատինի ներարկումից 48 ժամ հետո ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիսպլատինը ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը 2.5-3.5 անգամ էգ և արու կենդանիների մոտ, համապատասխանաբար (նկ. 8):

Կիրառելով ՊԱՌՊ 1-ի իմունալոգիական նույնականացման վեսթերն բլոթինգի մեթոդը, մենք ցույց տվեցինք, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կտրուկ նվազումը լյարդի բջիջների կորիզներում պայմանավորված չէ ֆերմենտի սպիտակուցային մոլեկուլի ճեղքավորմամբ (նկ. 9) և հանդիսանում է ՊԱՌՊ 1-ի ֆերմենտային ակտիվության արգելակման հետևանք:



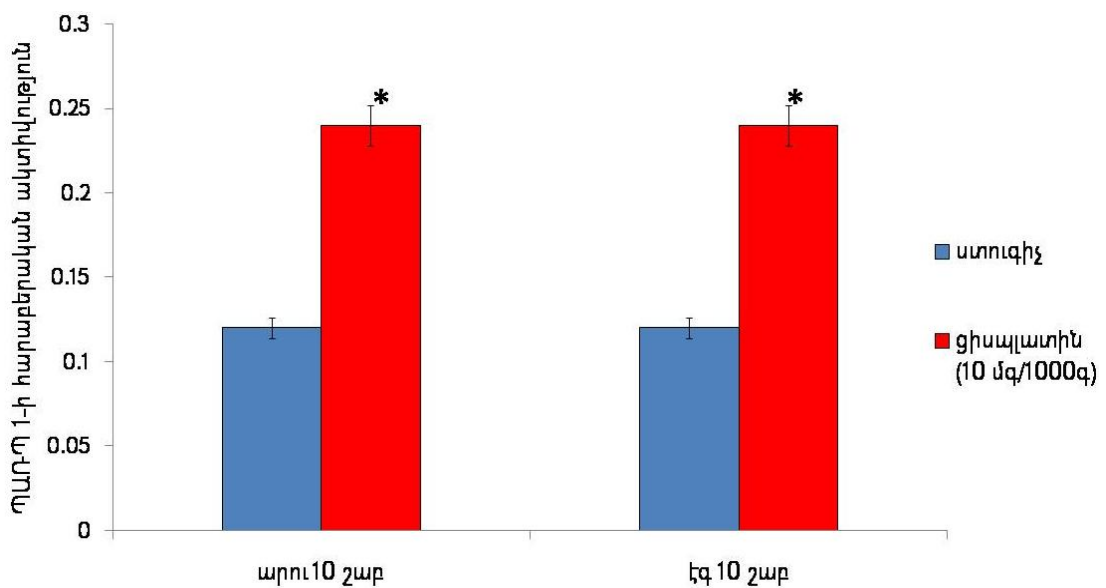
Նկար 8. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն արու և էգ առնետների լյարդի բջջակորիզներում, * - $p < 0.05$:



Նկար 9. ՊԱՌՊ 1-ի նույնականացումը վեսթերն բլոթինգի միջոցով. ա) ստուգիչ և բ) ցիսպլատին ներարկված (48 ժամ) ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի կորիզային սպիտակուցներում:

Նման արգելակումը կարող է պայմանավորված լինել քսենոբիոտիկների թունազերծման ֆերմենտային համակարգի նվազ արդյունավետ գործունեությամբ ոչ սեռահասուն առնետների մոտ, քանզի առնետների լյարդում հասակից և սեռից կախված փոխվում է այն գենային կլաստերների էքսպրեսիան, որոնք պատասխանատու են քսենոբիոտիկների յուրացման, դեղամիջոցների թունազերծման և ԴՆԹ-ի ռեպարացիայի համար [Kwekel et al., 2010]: Մյուս կողմից, գրական տվյալներից հայտնի է, որ ցիսպլատինը կտրուկ ճնշում է գլյուկոզի և ՆԱԴ⁺-ի նյութափոխանակությունը [Zhou et al., 2002, Rodriguez-Enriquez et al. 2009]: Կարելի է ենթադրել, որ ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության անկումը պայմանավորված է նաև ՆԱԴ⁺-ի ցածր պարունակությամբ:

Էապես փոխվում է ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցության պատկերը սեռահասուն առնետների մոտ (նկ. 10): ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռական դիմորֆիզմն այլևս չի դրսևորվում: Ցիսպլատինի ներարկումից հետո էգ և արու կենդանիների լյարդում դիտվում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կրկնակի աճ: Սեռահասուն առնետների լյարդի ավելի հզոր թունազերծող ունակությունը կարող է չեզոքացնել ցիսպլատինի վնասակար ազդեցությունն էներգետիկ նյութափոխանակության վրա, դրանով իսկ նպաստելով ՊԱՌՊ 1-ի դասական ակտիվացմանը ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալներով [Luo, Kraus, 2012, Zhu et al., 2010]:



Նկար 10. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն արու և էգ առնետների լյարդի բջջակորիզներում, * - $p < 0.05$:

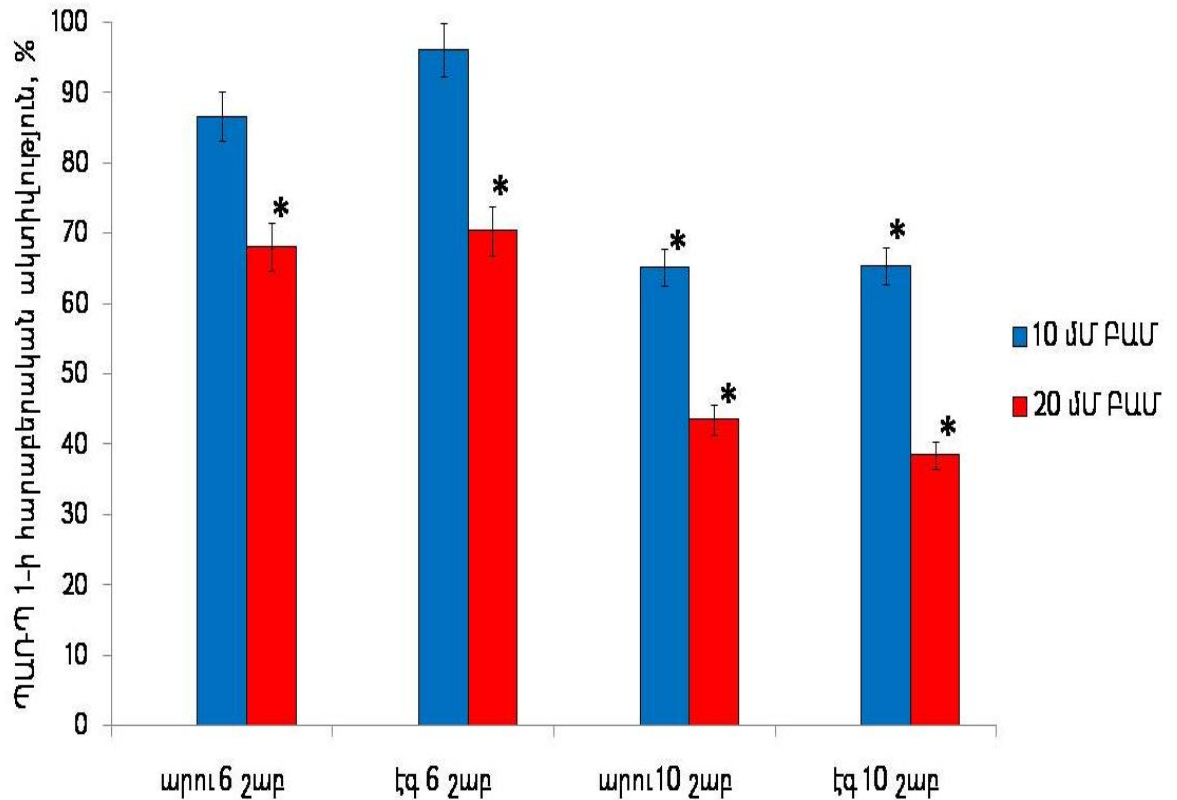
3.2. ՊԱՌՊ 1-ի ալոստերիկ և մրցակցային արգելակիչների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիտապլատինի ներարկումից հետո

Հայտնի է, որ ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային արգելակիչ բենզամիդն ունի արտահայտված ազդեցություն նյութափոխանակության վրա, քանզի ընկճում է գլյուկոզի ճեղքավորումը [Peralta-Leal et al., 2009]: ԲԱՄ-ի ներարկման հետ կապված ֆիզիոլոգիական բարդություններից և կողմնակի ազդեցություններից խուսափելու համար մենք ուսումնասիրել ենք ֆերմենտի արգելակումը մեկուսացված կորիզների համակարգում: Ուսումնասիրվել է ԲԱՄ-ի կենսաբանական ազդեցություն դրսևորող մինիմալ կոնցենտրացիաների ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում: ԲԱՄ-ն (կամ ԱԵՖ-ն) ավելացվել են կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ:

ԲԱՄ-ը հանդիսանում է ՊԱՌՊ 1-ի առաջին սերնդի հայտնի արգելակիչ: Ենթադրվում է, որ ԲԱՄ-ը ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը՝ մրցակցելով ՆԱԴ⁺-ի հետ ակտիվ կենտրոնում կապվելու համար: ԲԱՄ-ի արգելակող ազդեցությունը տարածվում է և՛ տրանս-, և՛ ինքնառիթմալիացնող ակտիվությունների վրա [Kun et al., 2004]:

Մեր կողմից ստացված արդյունքների համաձայն, 10մՄ ԲԱՄ-ը հավաստելիորեն չի փոխում ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզների ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը, մինչդեռ նվազեցնում է ֆերմենտի ակտիվությունը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում մոտ 30%-ով: 20մՄ ԲԱՄ-ի ազդեցության ժամանակ ֆերմենտի ակտիվությունն ոչ սեռահասուն էգ և արու կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում նվազում է հավասար չափով (30% և 32%-ով, համապատասխանաբար): Արգելակիչը շատ ավելի մեծ արդյունավետություն է ցուցաբերում սեռահասուն կենդանիների մոտ, ինչը ավելի արտահայտված է 20 մՄ ԲԱՄ –ի դեպքում: Ոչ սեռահասուն և սեռահասուն առնետների բջջակորիզներում

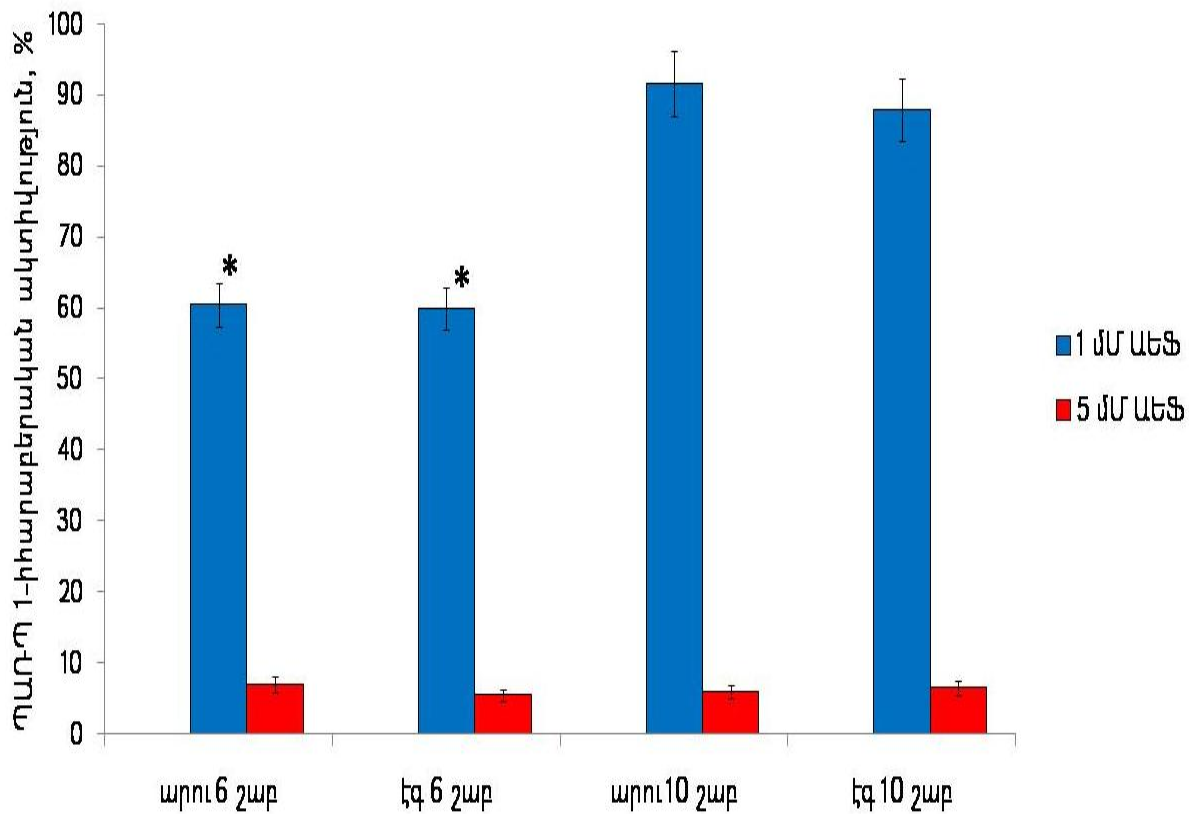
Ֆերմենտի արգելակման սեռից-կախված վստահելի տարբերությունները բացակայում են (նկ. 11):



Նկար 11. Բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում: ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի, * - $p < 0.05$:

Հայտնի է, որ ԱԵՖ-ի ներբջջային պարունակությունը տատանվում է 1-10մՄ սահմաններում [Kim et al., 2004]: Մեր փորձերի արդյունքները ցույց են տալիս, որ ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում 1 մՄ ԱԵՖ-ն արգելակում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը մոտ 40%-ով, անկախ կենդանիների սեռից (նկ. 12): Սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում 1մՄ ԱԵՖ-ը գործնականորեն չի ազդում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Այսպիսով, ֆերմենտի ակտիվության հասակից կախված նվազմանը զուգահեռ մեծանում է կայունությունը 1մՄ ԱԵՖ-ի հանդեպ: Կորիզների ինկուբացման միջավայրում ԱԵՖ-ի ավելի բարձր ֆիզիոլոգիական

կոնցենտրացիաներին (5 մՄ) համապատասխանող քանակի ներկայությունը լիովին ճնշում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը բոլոր խմբերի կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում (նկ.12):



Նկար 12. ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն և սեռահասուն առնետների լյարդի մեկուսացված բջջակորիզներում: ԱԵՖ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԱԵՖ-ի, * - $p < 0.05$:

Հայտնի է, որ ԱԵՖ-ը սպեցիֆիկորեն արգելակում է ՊԱՌՊ 1-ի ինքնապոլիոհիբոզիլացնող ակտիվությունը: Այսպիսով, ստացված արդյունքների վերլուծությունը գալիս է հաստատելու Կունի և համահեղինակների առաջարկած վարկածը, համաձայն որի ակտիվ բազմացող բջիջներում գերակշռում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության ինքնաոհիբոզիլացման բաժնեմասը [Kun et al., 2006]:

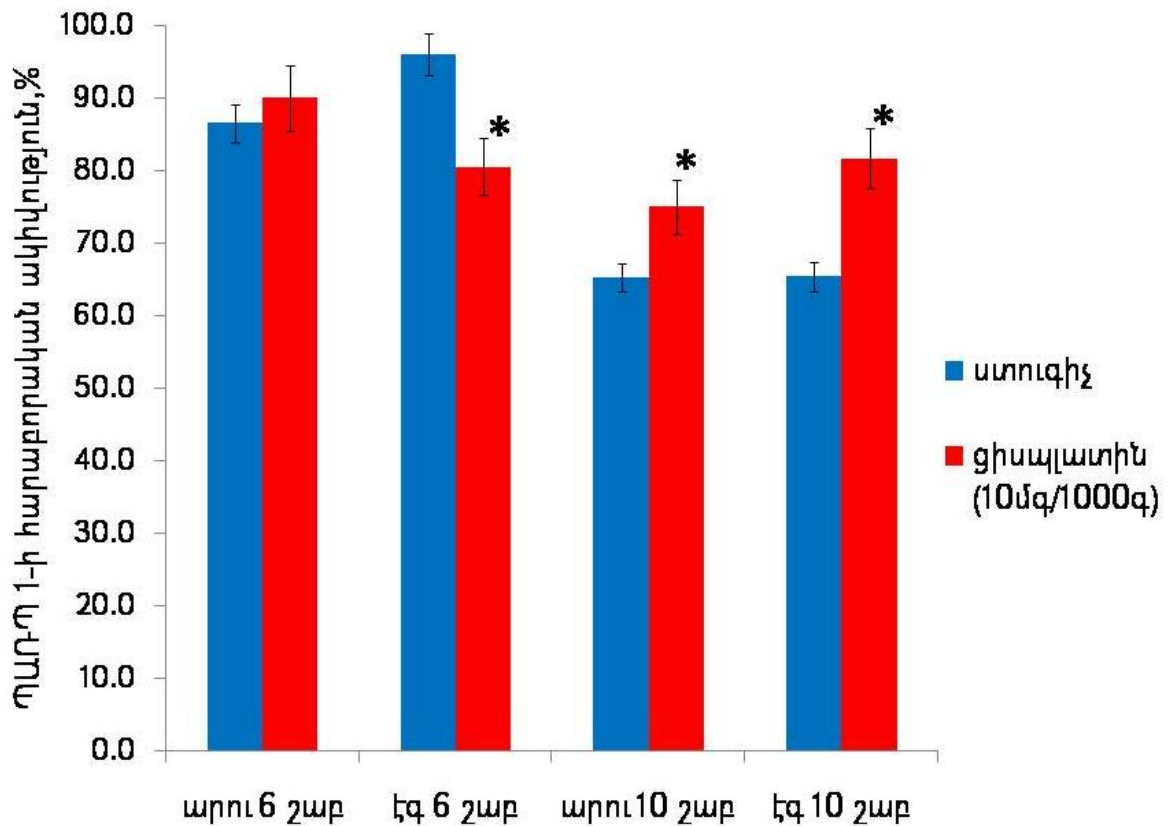
Ընդհանուր առմամբ այս տվյալները ցույց են տալիս, որ լյարդի բջջակորիզներում ԲԱՄ-ով և ԱԵՖ -ով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության արգելակման մեջ

սեռական տարբերությունները բացակայում են, սակայն առկա են հասակային տարբերություններ:

Ներկայումս ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները թևակոխել են կլինիկական փորձարկումների փուլն և լայնորեն կիրառվում են հակաուռուցքային դեղամիջոցների հետ համատեղ տարբեր չարորակ նորագոյացությունների բուժման ժամանակ: Ելնելով նրանից, որ դեղամիջոցները դրսևորում են ազդեցության խիստ որոշակի սեռից և հասակից կախված տարբերություններ [Soldin et al., 2011], մենք խնդիր դրեցինք ուսումնասիրել ցիսպլատինի և ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների համատեղ ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր հասակի էգ և արու առնետների լյարդի բջջակորիզներում:

Հայտնի է, որ ԴՆԹ-ի վնասվածքների կամ կառուցվածքի խաթարումների ժամանակ բջջակորիզներում մոտ 500 անգամ մեծանում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը: Այդ պատճառով ՊԱՌՊ 1-ը համարվում է ԴՆԹ-ի վնասվածքների մասին ազդանշանող մոլեկուլ [Thomas, Tulin, 2013]: Ռենտգենյան ճառագայթման և ԴՆԹ-ն ավիլացնող նյութերի՝ MNNG, MNU, MMS և ցիսպլատինի ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը շատ ավելի մեծ է այն ժամանակ, երբ բջիջներում բացակայում է կամ շատ ցածր է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը [Montoni et al., 2013]: Այս դիտարկումները բացատրվում էին նրանով, որ ՊԱՌՊ 1-ը հանդիսանում է ոչ միայն ԴՆԹ-ի վնասվածքները ազդանշանող մոլեկուլ, այլև անհրաժեշտ է այդ վնասվածքների վերականգնման համար: Ելնելով այս իրողությունից, տրամաբանական էր ենթադրել, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության ճնշումը կմեծացնի հակաուռուցքային դեղամիջոցների ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը: Լաբորատոր հետազոտությունների և նախակլինիկական փորձարկումների արդյունքները հստակորեն ցույց տվեցին այս ենթադրության իրավացիությունը [Horton, Wilson, 2013]: ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները ճնշում են օքսիդացման գործընթացներն և գլյուկոզի էներգետիկ ճեղքավորումը ուռուցքային բջիջներում, հանդես գալով նաև որպես հակամեթաբոլիկ հակաուռուցքային դեղամիջոցներ [Zhou et al., 2002]:

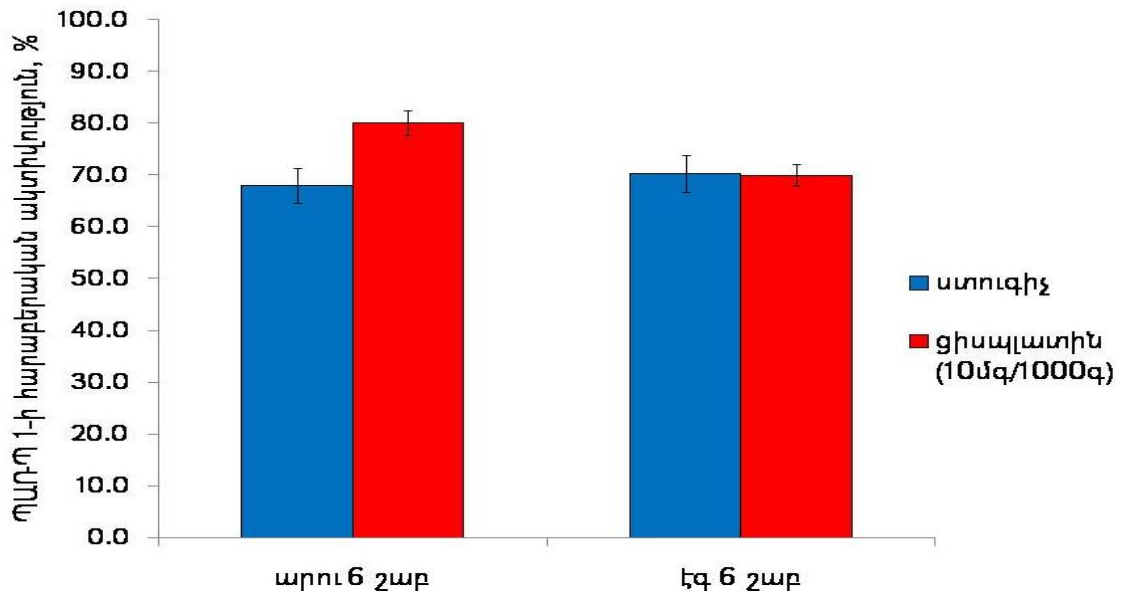
Համաձայն ստացված տվյալների, ցիսալատինի *in vivo* ներգործությունը լիովին փոխում է ՊԱՌՊ 1-ի ԲԱՄ-ով արգելակման պատկերն առնետների լյարդի բջջակորիզներում (նկ. 13):



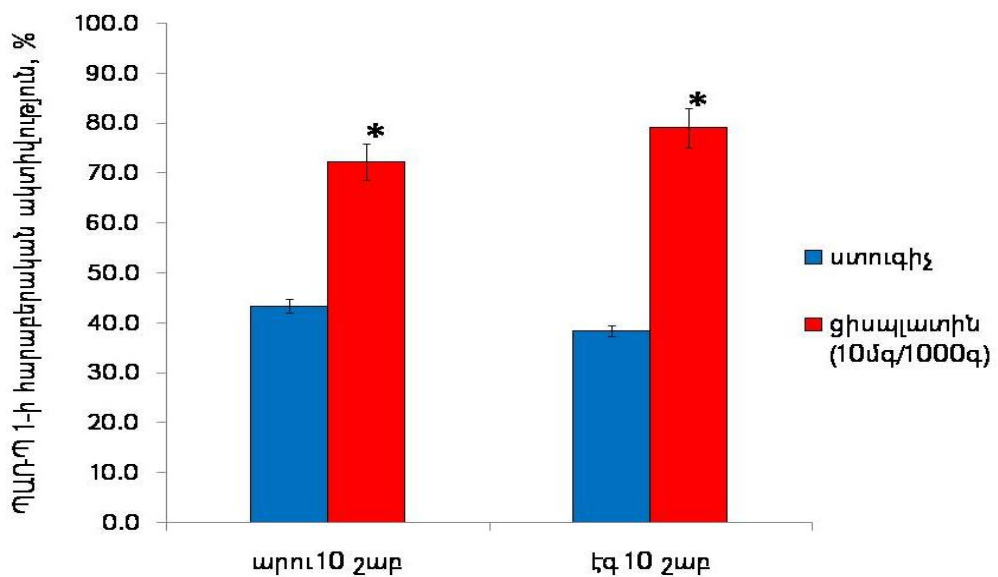
Նկար 13. 10 մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա լյարդի բջջակորիզներում ցիսալատինի ներարկումից 48 ժամ հետո (10մգ/1000գ): ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի, * - $p < 0.05$:

Ցիսալատինի ներարկումից 48 ժ հետո 10 մՄ ԲԱՄ-ն արդյունավետ է ոչ սեռահասուն էգ առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիսալատինի ներգործությունը հանգեցնում է ՊԱՌՊ 1-ի զգայունության նվազմանը ԲԱՄ-ի հանդեպ: Պատկերը ավելի արտահայտիչ է դառնում 20մՄ ԲԱՄ-ի ազդեցության դեպքում (նկ. 14):

Ցիսալատինի ներարկումից հետո սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում 20 մՄ ԲԱՄ-ի արգելակիչ ունակությունը նվազում է 1.5-2 անգամ (նկ. 15):

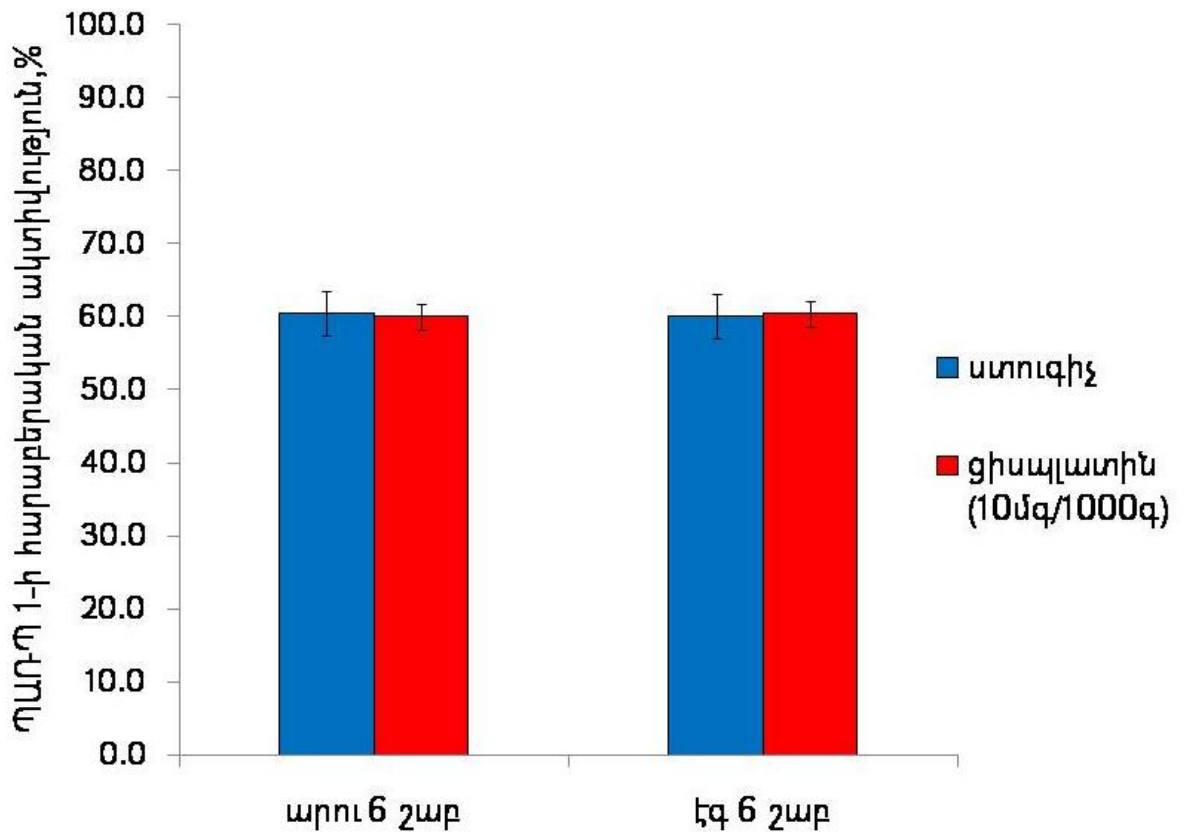


Նկար 14. 20 մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն առնետների յարդի բջջակորիզներում ցիտալատինի (10մգ/1000գ) ներարկումից 48 ժամ հետո: ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը որոշվել է անմիջապես բջջակորիզների անջատումից հետո: ԲԱՄ-ն ավելացվել է բջջակորիզների ինկուբացման միջավայր ռեակցիայի սկսվելուց 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի:



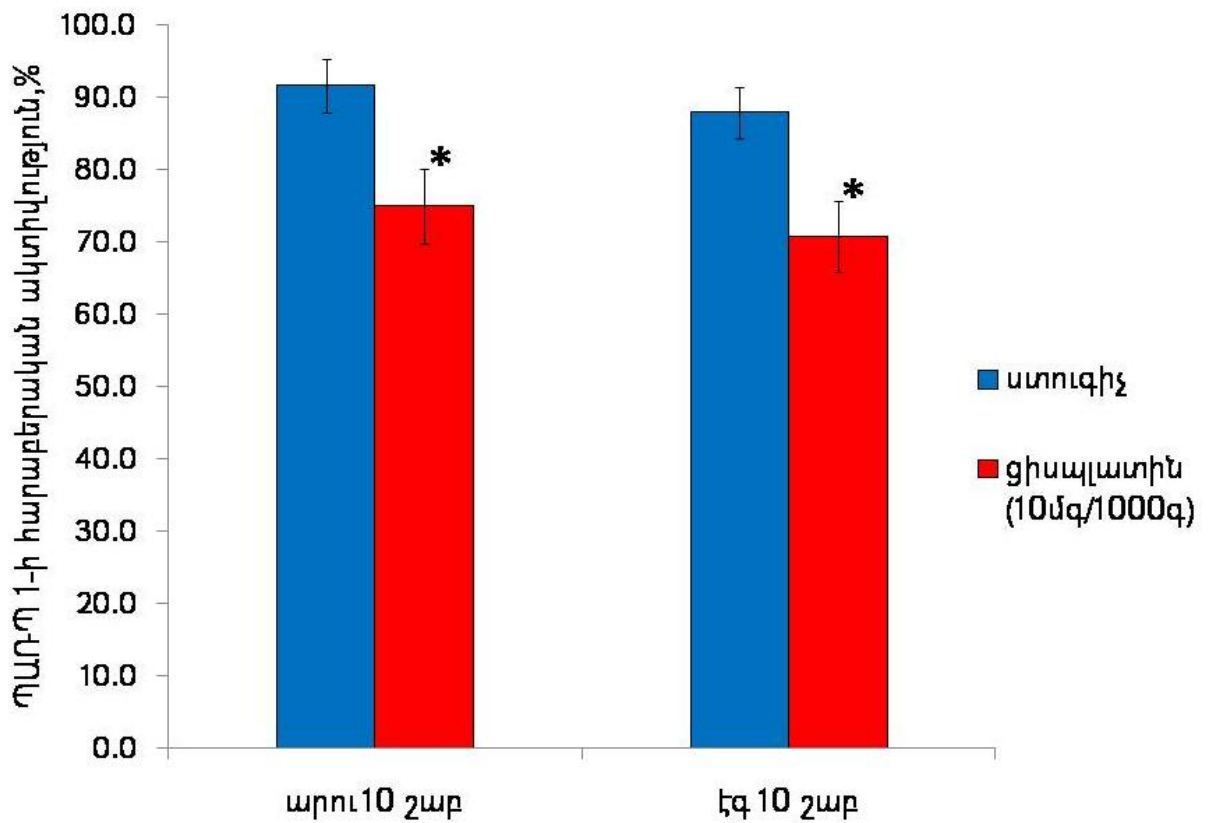
Նկար 15. 20 մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն առնետների յարդի բջջակորիզներում ցիտալատինի (10մգ/1000գ) ներարկումից 48 ժամ հետո: ԲԱՄ-ն ավելացվել է բջջակորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի, * - $p < 0.05$:

Անդրադառնալով ալոստերիկ արգելակիչ ԱԵՖ-ի ազդեցությանը լյարդի բջջակորիզների ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ցիսպլատինի *in vivo* ներգործությունից հետո, տեսնում ենք, որ ԱԵՖ-ով արգելակման արդյունավետությունն ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում չի փոխվում (նկ. 16):



Նկար 16. 1մՄ ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիսպլատինի (10մգ/1000գ) ներարկումից 48 ժամ հետո: ԱԵՖ-ն ավելացվել է բջջակորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԱԵՖ-ի:

Սակայն ցիսպլատինի ներարկումից հետո սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում 1մՄ ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցությունը մեծանում է (նկ. 17):



Նկար 17. 1մՄ ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն առնետների յարդի բջջակորիզներում ցիսպլատինի (10մգ/1000գ) ներարկումից 48 ժամ հետո: ԱԵՖ-ն ավելացվել է բջջակորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԱԵՖ-ի, * - $p < 0.05$:

ԱԵՖ-ի արգելակող արդյունավետության նման աճը կարող է պայմանավորված լինել նրանով, որ ցիսպլատինն էլ ավելի է մեծացնում ՊԱՌՊ 1-ի ինքնառիթմից ակտիվացման գերակայությունը տրանսռիթմից ակտիվության հանդեպ: ԱԵՖ-ի ավելի բարձր կոնցենտրացիան լիովին ճնշում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը:

3.3. Ցիսպլատինի ազդեցությունը քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման բնույթի վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների յարդի բջջակորիզներում

Ինչպես հայտնի է, ՊԱՌՊ 1-ն ակտիվորեն մասնակցում է քրոմատինի կառուցվածքի ձևավորմանը, և նրա ակտիվության փոփոխությունն ազդում է ոչ միայն

վերականգնողական գործընթացների ակտիվության վրա, այլ նաև քրոմատինի կոնդենսավորման աստիճանի վրա [Kraus, 2008, Thomas, Tulin, 2013]: Ցիսպլատինի ներգործությունից հետո ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալները կապում են ՊԱՌՊ 1-ի մոլեկուլները, որոնք կարծես հայտնվում են «ծուղակի» մեջ [Murai et al., 2015, Shen et al., 2015]: Քանի որ ԱԵՖ-ը, միանալով ՊԱՌՊ 1-ի ինքնառիբոզիլացման կայքում, խոչընդոտում է ֆերմենտի դիսոցմանը ԴՆԹ-ից, այն վերարտադրում է ՊԱՌՊ 1-ի ծուղակավորման երևույթը [Kun et al., 2004], փոխելով քրոմատինի զգայունությունը ճեղքավորող ֆերմենտների հանդեպ [Kim et al., 2004]: Հայտնի է, որ քրոմատինի էնդոնուկլեոլիտիկ ճեղքավորման ինտենսիվությունն և որակը հանդիսանում են քրոմատինի կոնդենսավորման կենսաքիմիական չափանիշներ [Hughes, Cidlowsky, 2000], և ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումն ապոպտիկ էնդոնուկլեազներով բնութագրում է քրոմատինի փաթեթավորման առանձնահատկությունները բջջակորիզներում [Yakovlev et al., 1999; Widlak et al., 2000]: Հակաքաղցկեղային թերապիայում ՊԱՌՊ-ի արգելակիչների արդյունավետության գնահատման ժամանակ պետք է հաշվի առնել ցիսպլատինի ազդեցությամբ պայմանավորված քրոմատինի կառուցվածքային փոփոխություններն, որոնք որոշիչ դեր են կատարում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության և ֆերմենտի հիմնական ֆունկցիաների գործարկման մեջ:

Մենք նպատակ դրեցինք ուսումնասիրել ցիսպլատինի և ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների ազդեցությունը քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա առնետների լյարդի բջջակորիզներում:

Այդ նպատակով մենք արհեստականորեն ակտիվացրեցինք ներկորիզային ապոպտիկ Mg^{2+} -կախյալ և Ca^{2+}/Mg^{2+} -կախյալ էնդոնուկլեազները, որոնք պատասխանատու են ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման համար: Ցույց է տրված, որ Mg^{2+} -կախյալ էնդոնուկլեազները ներգրավված են կորիզներում ԴՆԹ –ի առաջնային ճեղքավորման գործընթացում, որտեղ դրանք իրականացնում են ԴՆԹ –ի ճեղքավորումը մեծ հատվածների (ԴՆԹ –ի ֆրագմենտների երկարությունը գերազանցում է 1000 գ.ն.), մինչդեռ Ca^{2+}/Mg^{2+} -կախյալ էնդոնուկլեազները պատասխանատու են գլխավորապես ԴՆԹ –ի օլիգոնուկլեոսոմային ճեղքավորման համար (1000-200 գ.ն. երկարությամբ ֆրագմենտներ) [Yakovlev et al., 1999, Widlak et

al., 2000]: Փորձերի արդյունքները ցույց տվեցին, որ քրոմատինի օլիգոնուկլեոտոմային ճեղքավորման ուժգնությունն և որակը կախված չեն առնետների սեռից: Ելնելով դրանից հետագա ուսումնասիրությունները կատարվեցին արու առնետների վրա:

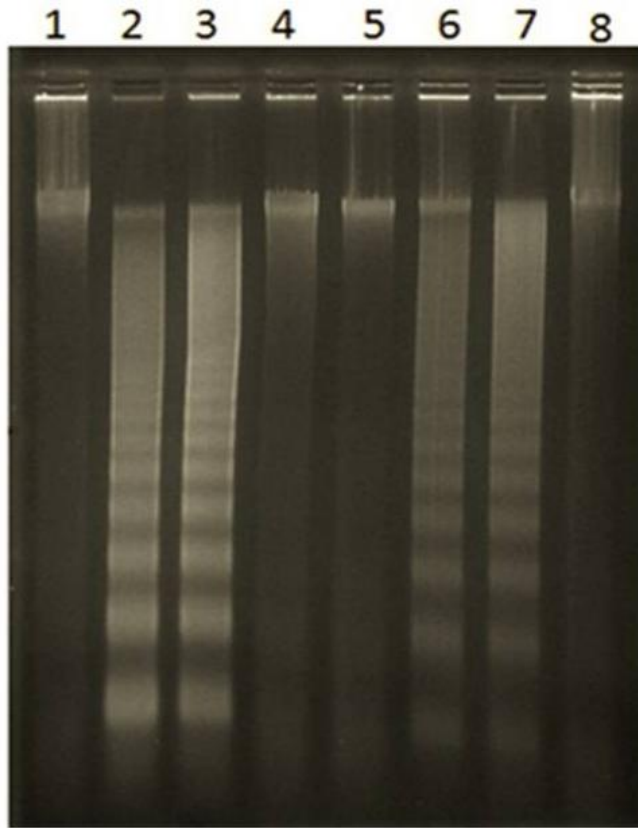
Նկար 18 և 19-ում բերված են ոչ սեռահասուն և սեռահասուն առնետների լյարդի բջիջների կորիզային ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեգրամները: Ցիսպլատինի ներարկումը մեծացնում է ԴՆԹ –ի մեծ մոլեկուլային զանգված ունեցող ֆրագմենտների պարունակությունն ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում 28%-ով, մինչդեռ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ԴՆԹ –ի ճեղքավորման ինտենսիվությունն աճում է մոտ 2 անգամ, այսինքն բարձր մոլեկուլային ԴՆԹ-ֆրագմենտների տոկոսային պարունակությունը փոքրանում է գրեթե 2 անգամ (աղ. 1): Ստացված արդյունքները վկայում են, որ առնետներին ցիսպլատին ներարկելուց հետո դիտվում է քրոմատինի կոնդենսացում ոչ սեռահասուն և դեկոնդենսացում՝ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Այս տվյալները վկայում են այն մասին, որ ցիսպլատինի ազդեցությունը լյարդի բջջակորիզների քրոմատինի կոնդենսավորման վրա կախված է առնետների հասակից:

Հայտնի է, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը հանգեցնում է քրոմատինի սպիտակուցների պոլի(ԱԿՖ-ոհիբոզ)ացմանը, ինչի հետևանքով կարող է տեղի ունենալ քրոմատինի ապակոնդենսացում [Thomas, Tulin, 2013, Wacker et al., 2007]:

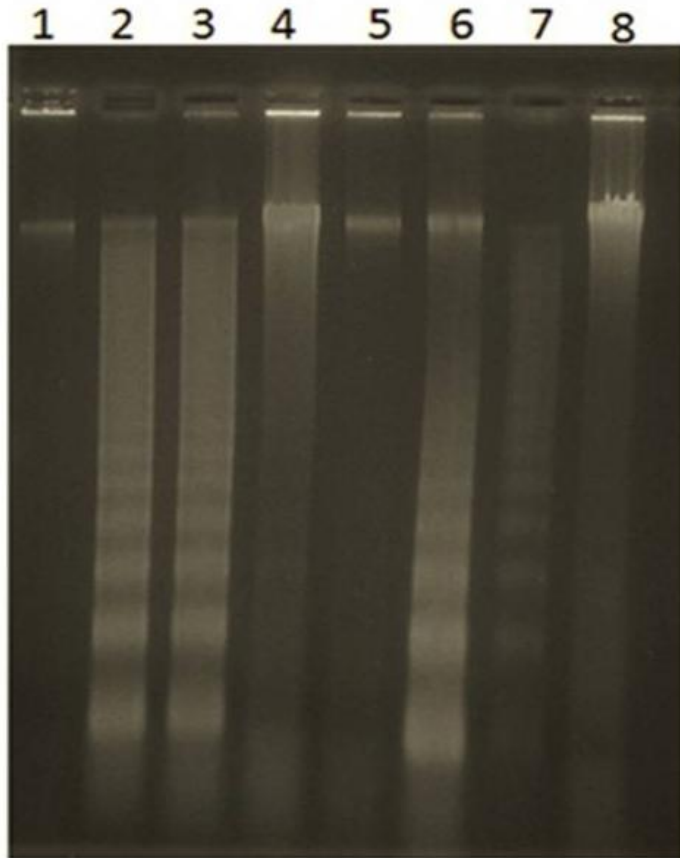
ԴՆԹ – ցիսպլատին ածանցյալներն իրենց հերթին առաջ են բերում ԴՆԹ-ի համապատասխան հատվածների ապապարուրում, ինչը նույնպես հանգեցնում է քրոմատինի ապակոնդենսավորմանը [Bellon et al., 1991]: Այսպիսով, մեր կողմից ստացված արդյունքները հաստատում են, որ թե՛ ցիսպլատինն ինքնին, թե՛ նրա կողմից մակաձված ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը հանգեցնում են քրոմատինի ճեղքավորման ինտենսիվության մեծացմանը, ինչը բնորոշ է ապակոնդենսացված քրոմատինին:

Քանի որ քրոմատինի կոնդենսացման աստիճանը պայմանավորում է նրա ֆունկցիոնալ ակտիվությունը, իսկ վերջինս իր հերթին կախված է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունից, մենք խնդիր դրեցինք ուսումնասիրել ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման ազդեցությունը քրոմատինի փաթեթավորման վրա: Այդ նպատակով մենք

ուսումնասիրեցինք ԲԱՄ-ի և ԱԵՖ-ի ազդեցությունը քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա լյարդի բջջակորիզներում առնետներին ցիսպլատին ներարկելուց հետո:



Նկար 18. ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ստուգիչում (1-4) և ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո (5-8): 1,5- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 60 ր ինկուբացումից հետո: 2,6- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ պարունակող միջավայրում 60 ր ինկուբացումից հետո: 3,7- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 1մՄ ԱԵՖ պարունակող միջավայրում 15ր և $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 60 ր ինկուբացումից հետո: 4,8 - ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 5մՄ ԱԵՖ պարունակող միջավայրում 15ր և $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 60 ր ինկուբացումից հետո:



Նկար 19. ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ստուգիչում (1-4) և ցիտոպլազմային ազդեցությունից հետո (5-8): 1,5- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 60 ր ինկուբացումից հետո: 2,6- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների Ca^{2+}/Mg^{2+} պարունակող միջավայրում 60 ր ինկուբացումից հետո: 3,7- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 1մՄ ԱԵՖ պարունակող միջավայրում 15ր և Ca^{2+}/Mg^{2+} 60 ր ինկուբացումից հետո: 4,8 - ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզներից 5մՄ ԱԵՖ պարունակող միջավայրում 15ր և Ca^{2+}/Mg^{2+} 60 ր ինկուբացումից հետո:

Աղյուսակ 1-ում ներկայացված է ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտների հարաբերական պարունակությունն (%) ԱԵՖ պարունակող միջավայրում ինկուբացված լյարդի բջջակորիզներում:

Աղյուսակ 1. ԱԵՖ պարունակող միջավայրում ինկուբացված լյարդի բջջակորիզներում ԴՆԹ –ի ֆրագմենտների քանակական պարունակությունը (%): Առնետների հասակը 6 և 10 շաբաթական, * - $p < 0.05$:

Առնետների հասակը	ԴՆԹ –ի ֆրագմենտների երկարությունը	ստուգիչ		ցիսպլատին	
		$60\mu\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15ր 1մՄ ԱԵՖ + $60\mu\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	$60\mu\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15ր 1 մՄ ԱԵՖ + $60\mu\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
6 շաբ.	>1000 գ.ն.	25.3±1.51	30.2±1,8	32,5±1,62*	45,2±3,16*
	1000-200 գ.ն.	62,3.±4,75	63,1±3,8	65,1±4,94	53,5±4,81
	<200 գ.ն.	12,4±0,62	6,7±0,53	2,4±0,12	1,3±0.060
10 շաբ.	>1000 գ.ն.	30,4±1,18	31,4±2,19	13,8±1,1*	40,4±2,40*
	1000-200 գ.ն.	61,0±4,90	56,8±2,84	71,4±6,42	54,7±3,28*
	<200 գ.ն.	8,6±0,90	11,8±0,70	14,8±1,01	4,9±0,34

1մՄ ԱԵՖ-ն էականորեն չի ճնշում ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվությունն ոչ սեռահասուն և սեռահասուն ստուգիչ խմբի առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Սակայն, երբ ԱԵՖ-ի կոնցենտրացիան բջջակորիզների ինկուբացման միջավայրում կազմում է 5 մՄ, լիովին ճնշվում է ոչ միայն ՊԱԴՊ 1-ի ակտիվությունն, այլև ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորումն ուսումնասիրված հասակային խմբերում: Մեր կողմից ստացված արդյունքները վկայում են, որ ցիսպլատինի ներարկումից հետո քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումն ավելի զգայուն է դառնում 1 մՄ ԱԵՖ –ի արգելակիչ ազդեցության նկատմամբ: ԱԵՖ-ի ներկայությամբ ինկուբացված սեռահասուն կենդանիների լյարդի մեկուսացված բջջակորիզներում խոշոր ֆրագմենտների (>1000 գ.ն.) պարունակությունը մեծանում է մոտ 3 անգամ: Ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ԴՆԹ –ի խոշոր ֆրագմենտների

պարունակությունն աճում է ընդամենը 40%-ով: 5 մՄ ԱԵՖ –ն ամբողջովին ճնշում է ԴՆԹ –ի ճեղքավորումը ցիսպլատին ներարկված առնետների լյարդի բջջակորիզներում :

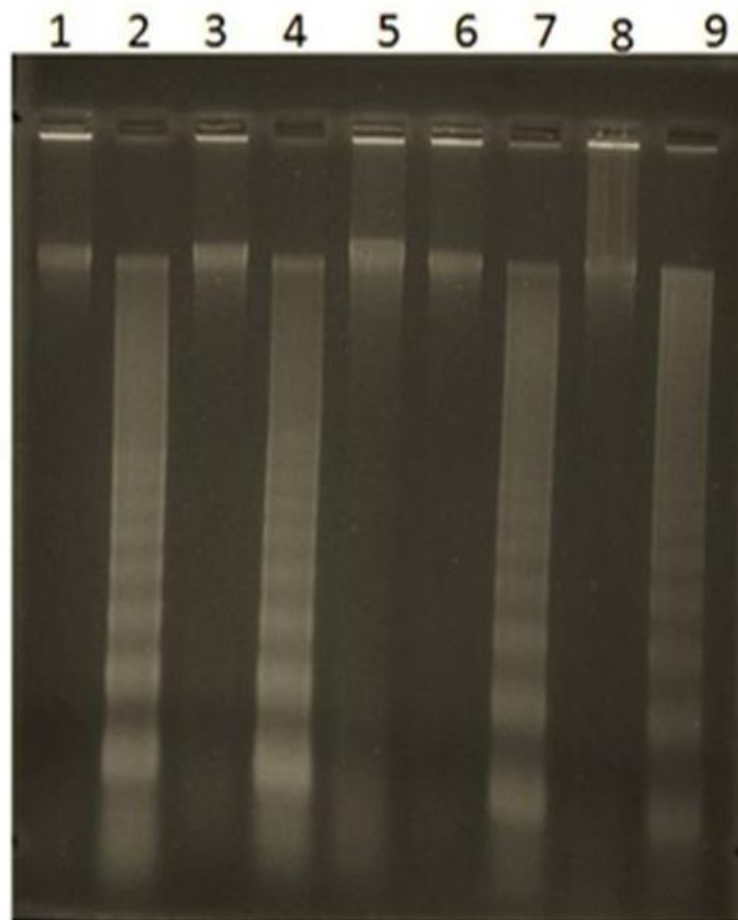
ԱԵՖ –ի կողմից ՊԱՌՊ 1-ի ինքնառիթոզիլացման արգելակման արդյունքում ֆերմենտի ամուր կապի (ծուղակավորման) շնորհիվ ՊԱՌՊ 1-ի մոլեկուլը քողարկում է ԴՆԹ –ի լինկերային ինտերնուկլեոսոմային հատվածները Mg^{2+} -կախյալ և Ca^{2+}/Mg^{2+} -կախյալ էնդոնուկլեազներից, ինչի արդյունքում ճնշվում է քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը [Lonskaya et al., 2005, Wacker et al., 2007]:

Այսպիսով, մեր կողմից ստացված արդյունքները վկայում են, որ ԱԵՖ-ը, լինելով էներգետիկ նյութափոխանակության կենտրոնական մոլեկուլ, միաժամանակ կարևոր դեր է կատարում նաև քրոմատինի կառուցվածքի կարգավորման մեջ՝ վերահսկելով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը:

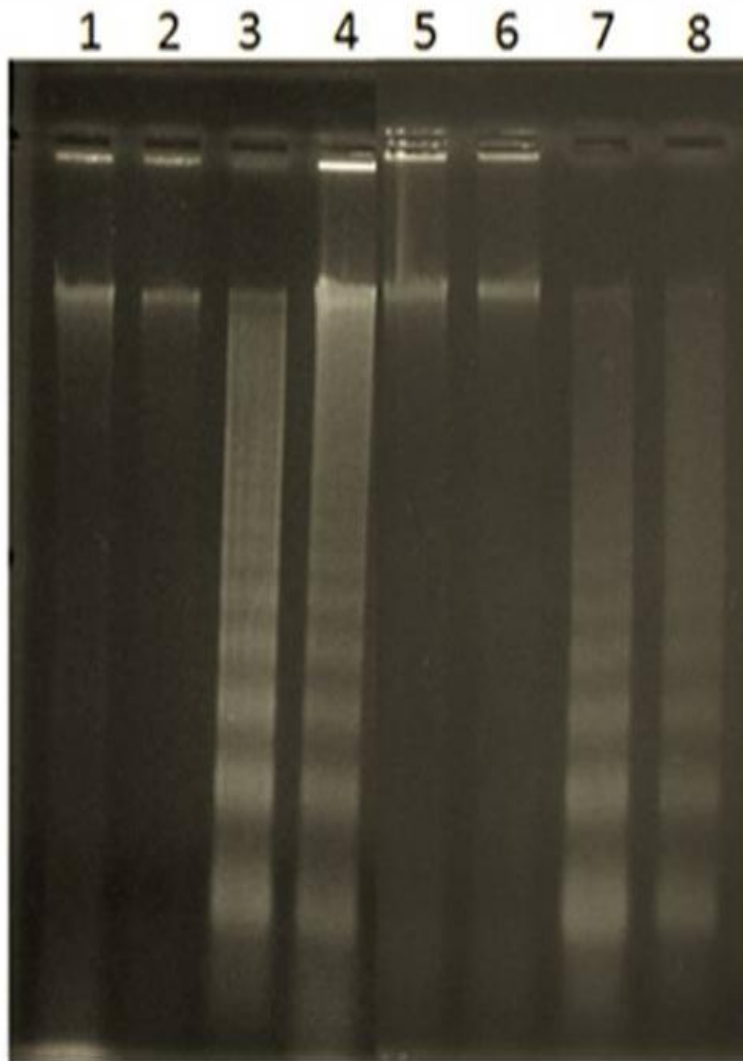
Մեր արդյունքները վկայում են, որ ցիսպլատինի ներարկումից հետո քրոմատինի ապափաթեթավորումը սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում կարող է հանդիսանալ երկու կենսաքիմիական իրադարձությունների հետևանք՝ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացման և ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալների կողմից ԴՆԹ –ի ապապարուրման: Ցիսպլատինի ներարկումից հետո ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորումը լյարդի բջջակորիզներում ավելի զգայուն է դառնում ԱԵՖ-ի ցածր կոնցենտրացիաների ճնշող ազդեցության նկատմամբ: Այսպիսով, ԱԵՖ-ը կարող է ճնշել ապոպտոզի ամենաբնորոշ փուլը՝ ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը և որոշիչ դեր կատարել ցիսպլատինով մակածված բջիջների ապոպտիկ մահվան գործընթացներում:

Ստացված արդյունքները (նկար 20, 21 և աղյուսակ 2) ցույց են տալիս, որ 20 մՄ ԲԱՄ-ի ներմուծումը կորիզների ինկուբացման միջավայր մոտ 2 անգամ ճնշում է ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Դրա մասին են վկայում 1000 գ.ն. գերազանցող ֆրագմենտների քանակի ավելացումն և օլիգոնուկլեոսոմային ֆրագմենտների (1000-200 գ.ն.) ավելի փոքր պարունակությունը (աղ. 2): Այսպիսով, սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության արգելակումը ԲԱՄ-ով համընկնում է ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվության նվազման հետ: Ոչ

սեռահասուն առնետների լյարդի մեկուսացված բջջակորիզներում 20 մՄ ԲԱՄ-ը չի ազդում ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվության վրա:



Նկար 20. Բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ստուգիչում (1-4) և ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո (5-9): 1,6- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 60 ր ինկուբացումից հետո: 2,7- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների Ca^{2+}/Mg^{2+} պարունակող միջավայրում 60 ր ինկուբացումից հետո: 3,8- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 20մՄ ԲԱՄ պարունակող միջավայրում 60 ր ինկուբացումից հետո: 4,9 - ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 20մՄ ԲԱՄ պարունակող միջավայրում 15ր և Ca^{2+}/Mg^{2+} 60 ր ինկուբացումից հետո: 5- ԴՆԹ-ն անջատվել է կորիզների անջատումից անմիջապես հետո:



Նկար 21. Բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ստուգիչում (1-4) և ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո (5-8): 1,5- ԴՆԹ-ն անջատվել է կորիզների մեկուսացումից անմիջապես հետո: 2,6- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 60 ր ինկուբացումից հետո, 3,7- ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների Ca^{2+}/Mg^{2+} պարունակող միջավայրում 60 ր ինկուբացումից հետո: 4,8 - ԴՆԹ-ն անջատվել է մեկուսացված կորիզների 20մՄ ԲԱՄ պարունակող միջավայրում 15ր և Ca^{2+}/Mg^{2+} 60 ր ինկուբացումից հետո:

Աղյուսակ 2. Բենզամիդ (ԲԱՄ) պարունակող միջավայրում ինկուբացված լյարդի բջջակորիզներում ԴՆԹ –ի ֆրագմենտների քանակական պարունակությունը (%): Առնետների հասակը 6 և 10 շաբաթական, * - $p < 0.05$:

Առնետների հասակը	ԴՆԹ –ի ֆրագմենտների երկարությունը	ստուգիչ		ցիսպլատին	
		60ր Ca^{2+}/Mg^{2+}	15ր 20մՄ ԲԱՄ + 60ր Ca^{2+}/Mg^{2+}	60ր Ca^{2+}/Mg^{2+}	15ր 20մՄ ԲԱՄ + 60ր Ca^{2+}/Mg^{2+}
6 շաբ.	>1000 գ.ն.	25.3±0.98	20,5±1,63	32,5±1,62*	38,1±2,28
	1000-200 գ.ն.	62,3.±4,75	56,2±3,93	65,1±4,94	54,7±2,18
	<200 գ.ն.	12,4±0,62	23,3±1,16	2,4±0,12	7,2±0,21
10 շաբ.	>1000 գ.ն.	30,4±1,18	60,4±4,80*	13,8±1,10*	28,7±2,01*
	1000-200 գ.ն.	60,6±4,90	31,1±1,86	71,4±6,42	62,5±5,62
	<200 գ.ն.	9,0±0,90	8,6±0,60	14,8±1,01	8,8±0,26

Այսպիսով, մեր ուսումնասիրությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո, անկախ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակչի բնույթից (մրցակցային թե ալոստերիկ), ֆերմենտի ակտիվության ճնշումը հանգեցնում է քրոմատինի կոնդենսացման: Այս եզրակացությունն ունի մեծ նշանակություն, քանի որ հակաքաղցկեղային դեղամիջոցների մի սովոր խումբ ներկայացված է ԱԵՖ-նմանակներով (ԱԵՖ-միմետիկներ):

3.4. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում

Ուրցագեղձը, լյարդի ու կարմիր ոսկրածուծի հետ համատեղ, իրենից ներկայացնում է ողնաշարավորների օրգանիզմի իմունային համակարգի հիմնական օրգան: Ցույց է տրվել, որ ուրցագեղձում ցիսպլատինն անմիջականորեն ազդում է T բջիջների տարբերակման (դիֆերենցման) վրա, որի հիմքում ընկած են ապոպտիկ գործընթացները [Perry et al., 1994]: Հայտնի է, որ ցիսպլատինի ազդեցության վնասակար հետևանքներից մեկը լեյկոպենիան է, որը պայմանավորված է T

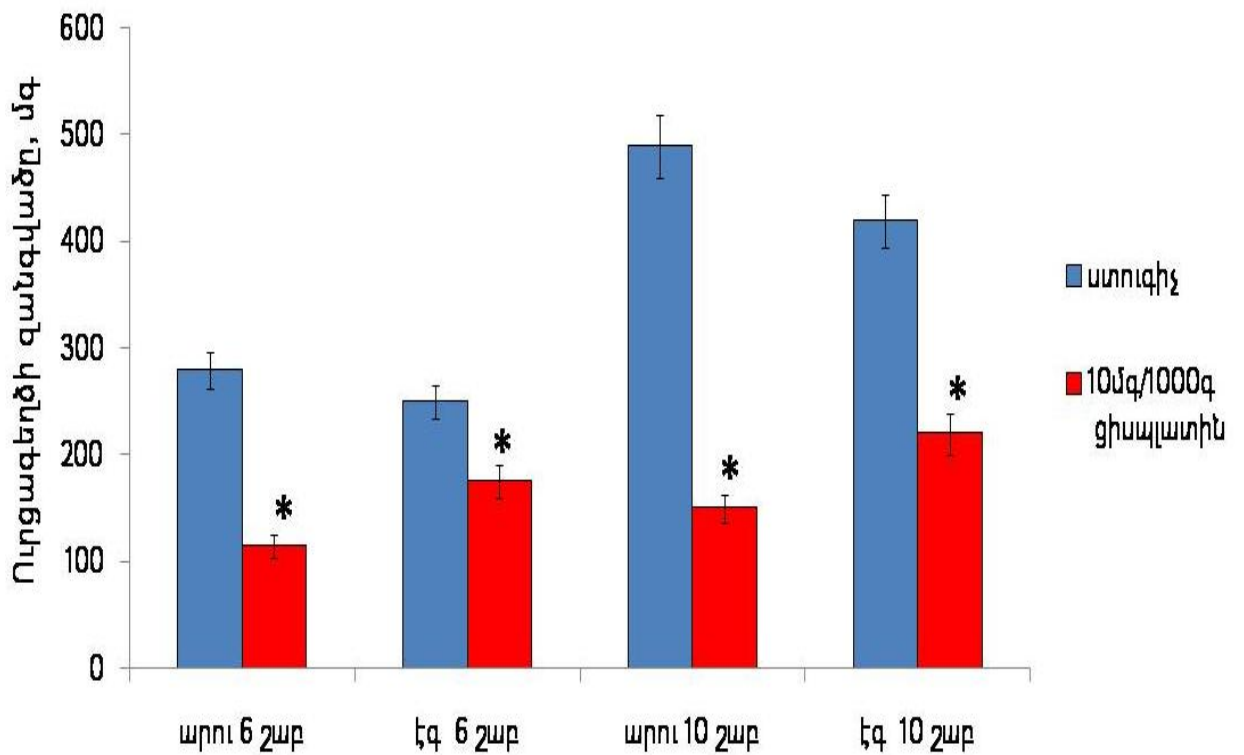
լիմֆոցիտների (թիմոցիտների) բազմացման և տարբերակման գործառույթների խաթարումով: Ուրցագեղձում իմունակումպետենտ թիմոցիտների ձևավորումը բազմափուլ գործընթաց է: Այն ներառում է բջիջների մահվան, գոյատևման և բաժանման (բազմացման) գործառույթներն, որոնցում ՊԱՌՊ 1-ը կատարում է առաջնային կարևոր դեր [Lou, Kraus, 2012]: Ելնելով ֆերմենտի նշանակությունից լեյկոցիտոգենեզի նորմալ ընթացքի վրա, մենք հետազոտեցինք ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման վրա առնետների թիմոցիտների մեկուսացված կորիզներում:

Ուրցագեղձին բնորոշ է յուրահատուկ տարիքային հետաճ, որը շատ ավելի վաղ է սկսվում, քան օրգանիզմի ծերացման գործընթացները: Ուրցագեղձի հասակային հետաճի հետ կապված կենսաքիմիական փոփոխություններից խուսափելու համար [Gui et al., 2012, Soldin et al., 2011], մենք ուսումնասիրել ենք ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը տարբեր սեռի ոչ սեռահասուն և երիտասարդ սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում:

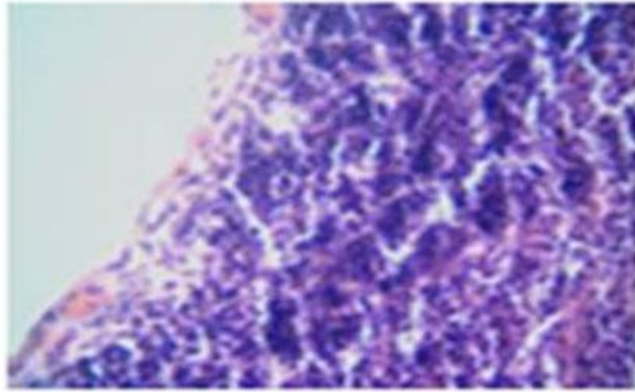
Թեև ՊԱՌՊ 1-ն ունի առանցքային դեր թիմոցիտների ձևավորման բոլոր գործընթացներում, տեղեկությունները ֆերմենտի ակտիվության մասին ուրցագեղձի հասակային փոփոխությունների ժամանակ բացակայում են: Ելնելով ցիսպլատինի ցիտոտոքսիկ ազդեցությունից, հետաքրքիր էր ուսումնասիրել, թե ինչպես է դեղամիջոցն ազդում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի երիտասարդ առնետների թիմոցիտներում: Փորձերի առաջին փուլում ուսումնասիրվեց ցիսպլատինի ազդեցությունն առնետների ուրցագեղձի զանգվածի և ձևաբանության վրա:

Ներկայացվող տվյալները ցույց են տալիս, որ ոչ սեռահասուն առնետների ուրցագեղձի զանգվածն էգ և արու կենդանիների մոտ գրեթե չեն տարբերվում: Կենդանիների աճին զուգընթաց սեռահասուն առնետների ուրցագեղձի զանգվածը մեծանում է մոտ 70%-ով (նկ. 22): Այսպիսով, ուրցագեղձի զանգվածն և դրա հասակային աճը կախված չեն կենդանիների սեռից: Ցիսպլատինի ներարկումից 48 ժ անց ոչ սեռահասուն արու առնետների ուրցագեղձի զանգվածը նվազում է 60%-ով, մինչդեռ էգ առնետների մոտ զանգվածը փոքրանում է ընդամենը 30%-ով: Սեռահասուն

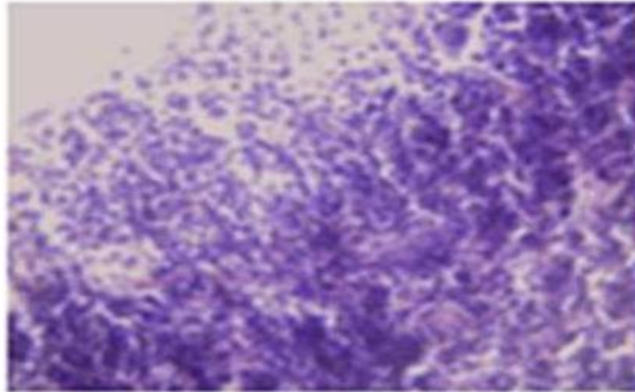
առնետների մոտ ուրցագեղձի զանգվածը փոքրանում է 70%-ով արու և 50 % -ով էգ կենդանիների մոտ (նկ. 22): Թեև ուրցագեղձի զանգվածը, համաձայն ստացված արդյունքների, սեռից կախված չէ, ցիսպլատինի ներգործությունից հետո երևան է գալիս զանգվածի փոփոխության սեռական դիմորֆիզմը: Ցիսպլատինի ներարկումից հետո առնետների ուրցագեղձում ի հայտ են գալիս գեղձի տոքսիկ ատրոֆիկ ձևափոխությանը հատուկ ձևաբանական փոփոխություններ (նկ. 23): Ոչ սեռահասուն առնետների հեմատոքսիլին-էոզին մշակված ուրցագեղձի պարաֆինային կտրվածքներում դիտվում է հստակ մուգ ներկված կեղևային շերտ (նկ. 23, ստուգիչ): Ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո գեղձի կեղևի հաստությունը փոքրանում է փոքր լիմֆոցիտների քանակի նվազման հաշվին, գեղձի միջուկային հատվածին հարող կեղևի ներքին մակերեսը դառնում է անհամասեռ և խախտվում է միջուկ-կեղև տարանջատման սահմանային գծի հստակությունը (նկ.23):



Նկար 22. Տարբեր սեռի առնետների ուրցագեղձի զանգվածը ստուգիչ և ցիսպլատին-ներարկված (10մգ/1000գ) խմբերում, * - $p < 0.05$:



ստուգիչ

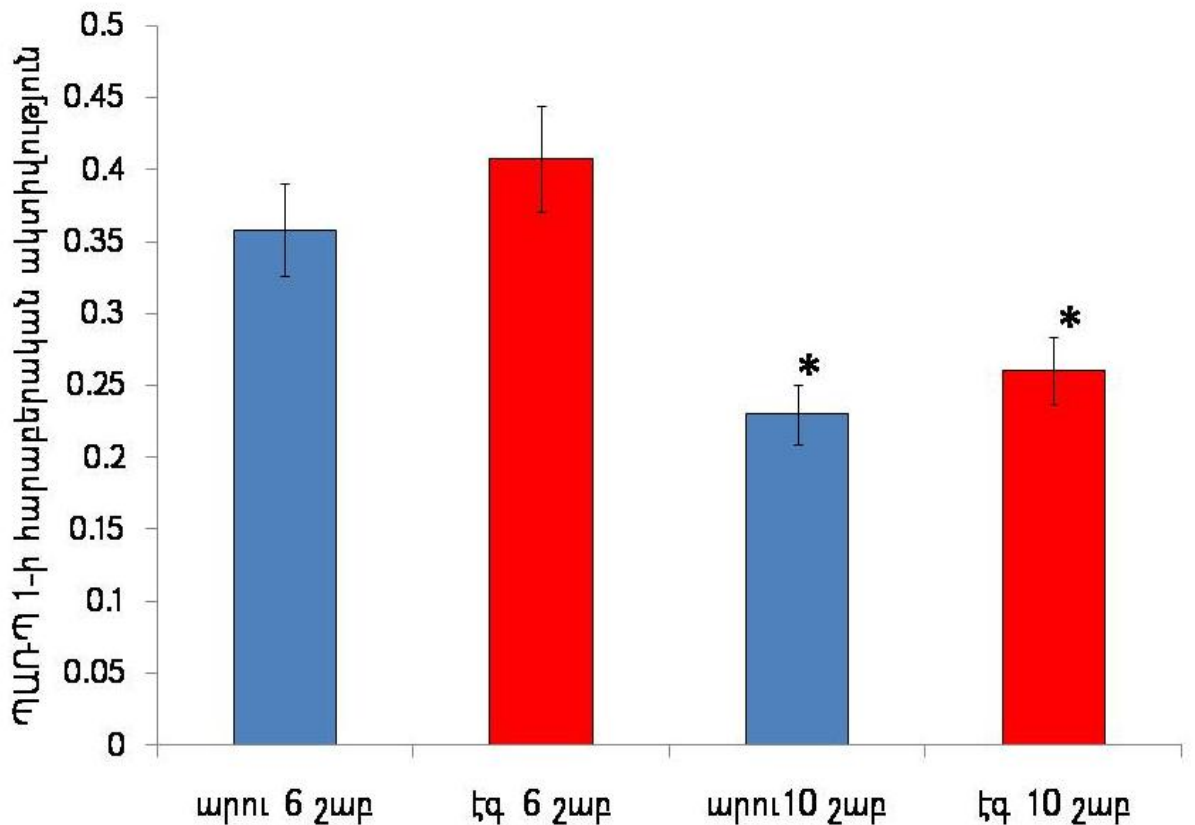


ցիսպլատին

Նկար 23. Ցիսպլատինի ազդեցությունն առնետների ուրցագեղձի ձևաբանության վրա: Յուրաքանչյուր հյուսվածաբանական հատված ներկայացված է կենդանիների մեկ խմբով (n=6), խոշորացում x400:

Ինչպես ցույց են տալիս մեր արդյունքները (նկ. 24), գեղձի հասակային աճը զուգորդվում է թիմոցիտների մեկուսացված կորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության նվազմամբ: Սեռահասուն առնետների թիմոցիտներում ֆերմենտի ակտիվությունն ավելի քան 35%-ով փոքր է ոչ սեռահասուն կենդանիների մոտ դիտվող ակտիվությունից, ընդ որում արու և էգ կենդանիների թիմոցիտներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը ցուցաբերում է գրեթե նույն արժեքները յուրաքանչյուր հասակային խմբում:

Նախկինում ցույց է տրվել, որ էստրոգենները կարևոր դեր են խաղում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորման գործում՝ ճնշելով վերջինիս ակտիվությունը [Jog, Caricchio, 2013, Mabley et al., 2005, Malanga et al., 2005]:



Նկար 24. ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունն ոչ սեռահասուն և սեռահասուն արու և էգ ստուգիչ խմբի առնետների թմոնցիտների կորիզներում, * - $p < 0.05$:

Մեր արդյունքները ցույց են տալիս, որ սեռահասուն կենդանիների թմոնցիտներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռական դիմորֆիզմ չի դիտվում: Այսպիսով, դրանք գալիս են հաստատելու այն վարկածն, որ սեռահասուն էգերի օրգանիզմում ֆերմենտի ակտիվության անկումը, հավանաբար, պայմանավորված է էստրադիոլի աճող քանակությամբ, իսկ արուների մոտ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորման մեջ որոշիչ դերը պատկանում է աճի հորմոնին [Waxman, Holloway, 2009, Wauthier, Waxman, 2008]:

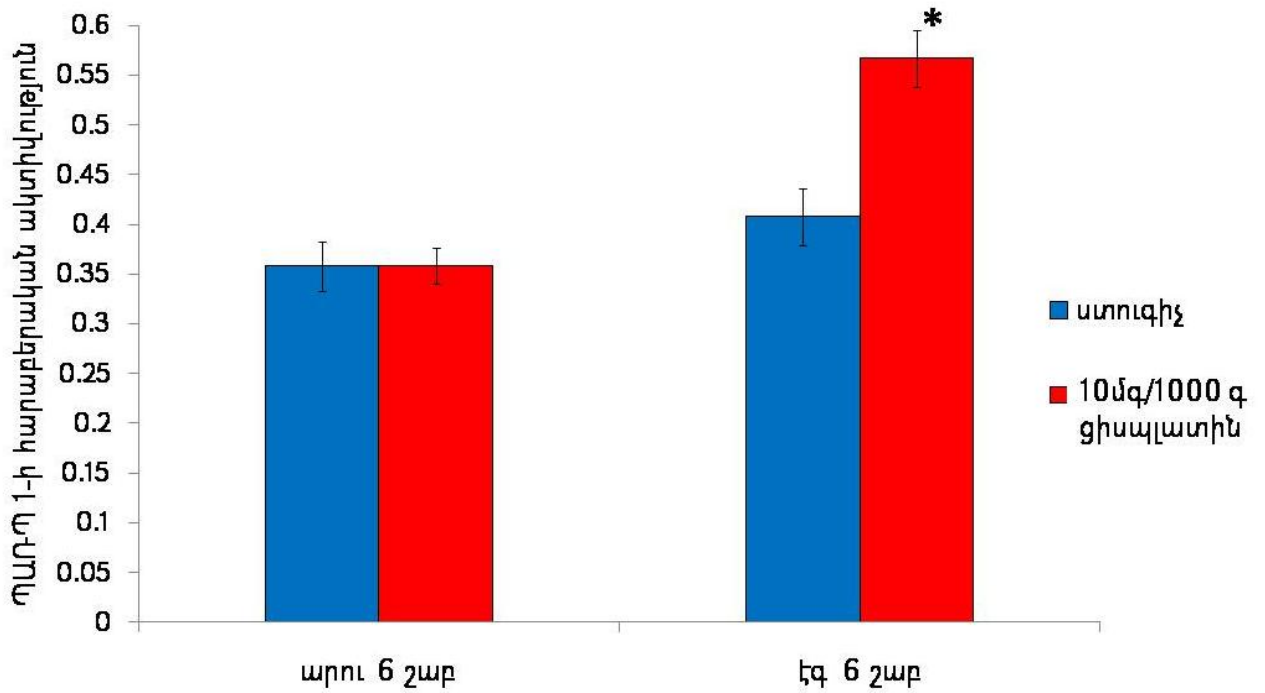
Ինչպես ցույց են տալիս թե՛ կլինիկական հետազոտությունների արդյունքները, թե՛ փորձարարական տվյալները, դեղամիջոցների ազդեցության սեռից կախված տարբերությունները դրսևորվում են ֆարմակոկինետիկ բոլոր հիմնական գործընթացներում՝ ադսորբցիա, բաշխում, մեթաբոլիզմ և արտաթորություն [Soldin et al., 2011]:

Ազդեցության սեռական առանձնահատկությունները կարևորվում են նեղ

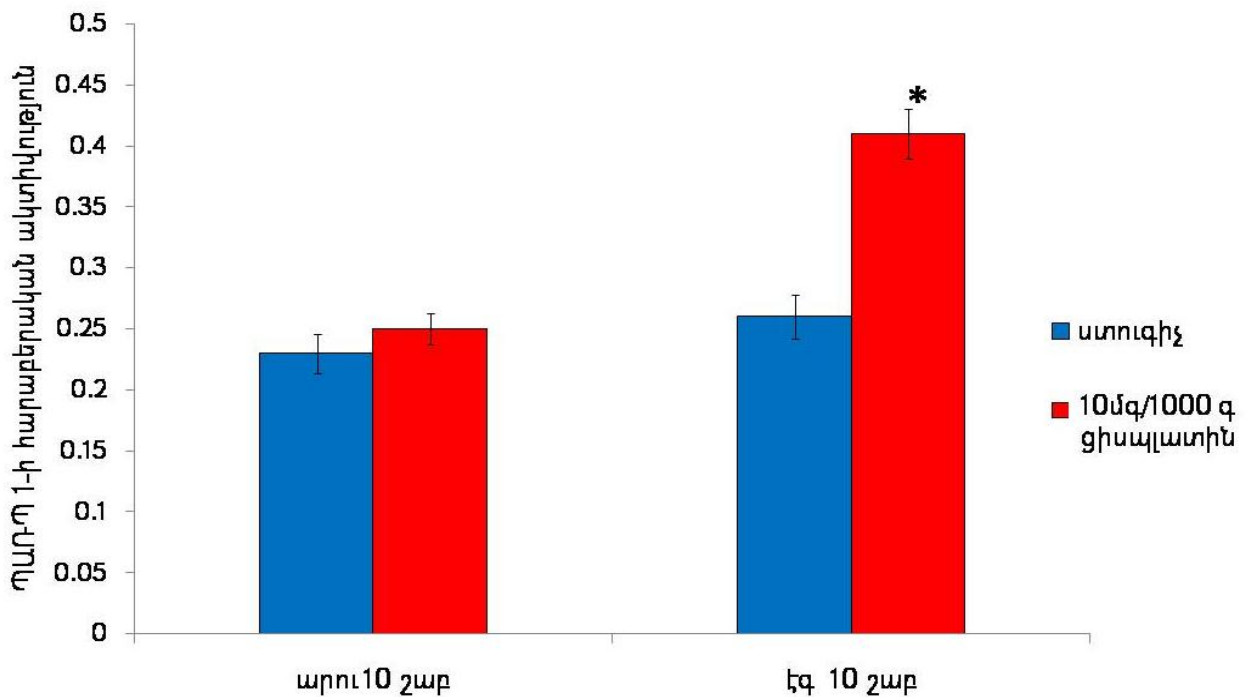
թերապևտիկ պատուհան ունեցող, մասնավորապես, հակաուռուցքային դեղամիջոցների համար: Նշված դեղամիջոցներին հատուկ է բարձր տոքսիկություն (թունավոր ազդեցություն) և խիստ վնասաբեր կողմնակի ազդեցություններ: Իրավիճակն էլ ավելի է բարդանում նրանով, որ հակաուռուցքային դեղամիջոցների բուժիչ չափաբաժինները մոտ են տոքսիկ քանակներին:

Թիմոցիտները հիմնական իմունակոմպետենտ բջիջներից են, և ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորումը դրանցում ունի հատուկ նշանակություն այն պարագայում, երբ օրգանիզմ են թափանցում տոքսիկ քսենոբիոտիկներ: Մեր կողմից ստացված տվյալների համաձայն ցիսպլատինի ներարկումից հետո ոչ սեռահասուն արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը չի փոխվում, մինչդեռ ֆերմենտի ակտիվությունը շուրջ 40% -ով աճում է էգ կենդանիների թիմոցիտների կորիզներում (նկ. 25): Նմանատիպ արդյունք նկատվում է մեծ հասակային խմբում (10 շաբաթական), ուր ցիսպլատինի ազդեցությունն էգ առնետների թիմոցիտների կորիզների ՊԱՌՊ 1 –ի ակտիվության վրա ավելի ուժգին է (ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը մեծանում է 60%-ով) (նկ. 26):

Հայտնի է, որ ցիսպլատինն ունի ոչ միայն ցիտոտոքսիկ, այլև գենոտոքսիկ ազդեցություն, առաջացնելով ցիսպլատին-ԴՆԹ ածանցյալներ, որոնք խաթարում են բջջակորիզային ժառանգական ինֆորմացիայի ճիշտ գործարկումը: Դրա հետևանքով խախտվում են հիմնարար բջջային գործառույթներն, ի վերջո, հանգեցնելով բջջի մահվան [Zhu, Chang, 2011]: Հաշվի առնելով ՊԱՌՊ 1-ի մասնակցությունը խաթարված ԴՆԹ-ի հատվածների ճանաչման և վնասվածքի կայքում ԴՆԹ-ի վերականգնման բազմաֆերմենտային համալիրի հավաքագրման մեջ, մեր տվյալները կարող են վկայել այն մասին, որ էգերի օրգանիզմում ՊԱՌՊ 1-ով միջնորդավորված վերականգնողական մեխանիզմներն ավելի արդյունավետ են, ինչը կարող է պայմանավորված լինել իգական հորմոնների պաշտպանական ազդեցությամբ [Mabley et al., 2005, Jog, Carichio 2013]:



Նկար 25. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն արու և էգ առնետների թիմոցիտների կորիզներում, * - $p < 0.05$:



Նկար 26. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն արու և էգ առնետների թիմոցիտների կորիզներում, * - $p < 0.05$:

3.5. ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները և մրցակցային արգելակիչների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսպլատինի ներարկումից հետո

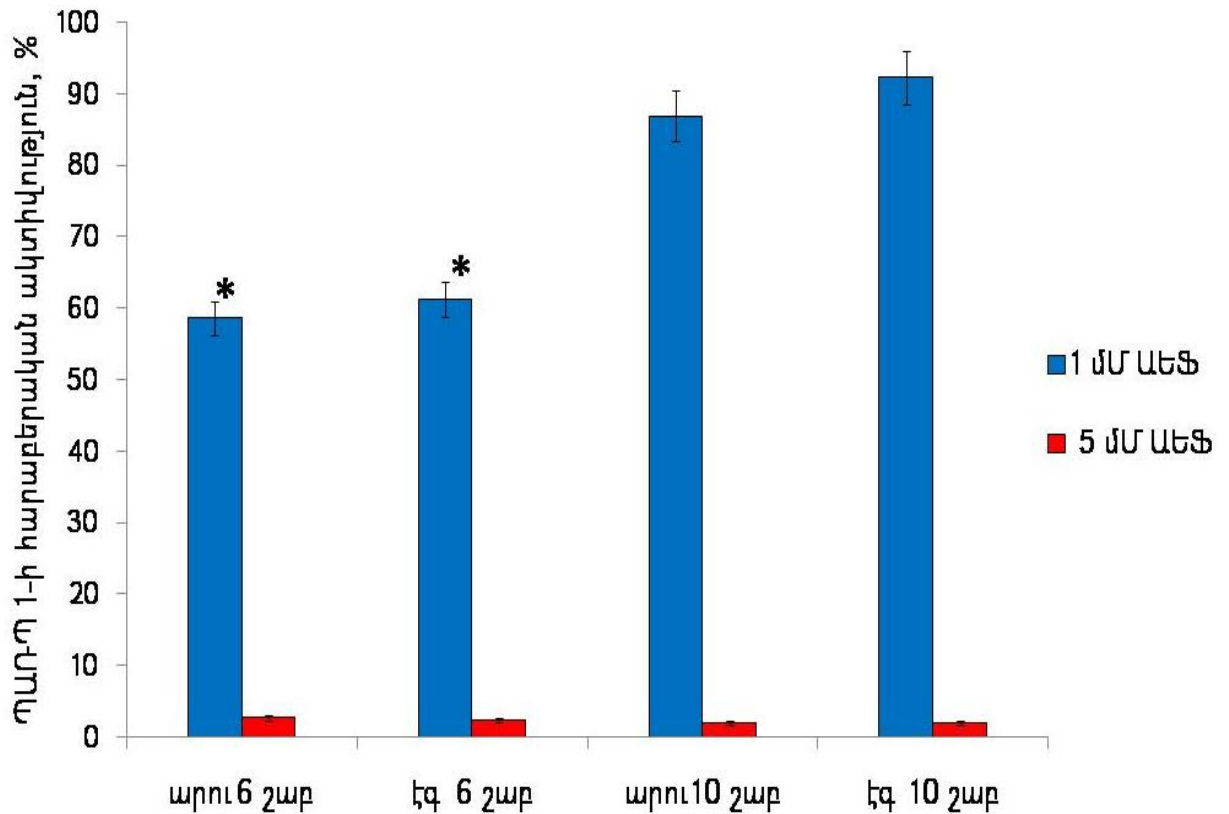
Ներկայումս ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները կիրառվում են կլինիկական փորձարկումներում ԴՆԹ-վնասող դեղամիջոցների հետ համատեղ դրանց բուժիչ ազդեցությունը մեծացնելու նպատակով [Curtin, 2013, Horton, Wilson, 2013, Shen et al., 2015]: ԴՆԹ-ի վնասվածքներ պարունակող բջիջներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության արգելակման բուժիչ ազդեցությունը պայմանավորված է ԴՆԹ –ի վերականգնման գործընթացների խանգարումով և դրա հետ կապված բջջային մահվան խթանումով: Ելնելով նրանից, որ թիմոցիտների մասնագիտացումն ուրցագեղձում կապված է բջիջների շարունակական բազմացման և ապոպտիկ գործընթացների հետ, որոնք կարգավորվում են ՊԱՌՊ 1-ով, հետազոտությունների հաջորդ փուլում մեր առջև խնդիր դրվեց պարզել ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա տարբեր հասակի և սեռի առնետների թիմոցիտների կորիզներում:

Բենզամիդի և ԱԵՖ-ի ոչ սպեցիֆիկ ազդեցությունները գլյուկոզի փոխանակության վրա [Burkle, 2005], ինչպես նաև ցիսպլատինի ներգործությունները բջջաթաղանթային գործընթացների վրա [Davar et al., 2012] բացառելու նպատակով, մենք ուսումնասիրել ենք արգելակիչների ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա մեկուսացված կորիզներում, ենթադրելով, որ նման փորձարարական մոդելը *in vivo* համակարգի ամենափրատեսական դրսևորումն է:

Մենք հետազոտեցինք ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա տարբեր սեռի և հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում:

Ցույց է տրվել, որ ԱԵՖ-ի 5 մՄ կոնցենտրացիան, որը մոտ է ներբջջային ֆիզիոլոգիական մակարդակին [Kim et al., 2004], գրեթե ամբողջովին արգելակում է ֆերմենտի ակտիվությունը բոլոր փորձարարական խմբերի կենդանիների մոտ և կախված չէ կենդանիների սեռից և հասակից: 1 մՄ ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցությունը

կախված չէ կենդանիների սեռից, սակայն արգելակման մեծությունը նվազում է հասակի հետ: Ոչ սեռահասուն կենդանիների թիմոցիտներում 1 մՄ ԱԵՖ-ը ճնշում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը 35-40%-ով, իսկ սեռահասուն առնետների թիմոցիտներում ֆերմենտի ակտիվությունը նվազում է ընդամենը 10-15%-ով (նկ. 27):



Նկար 27. ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն և սեռահասուն էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում: ԱԵՖ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԱԵՖ-ի, * - $p < 0.05$:

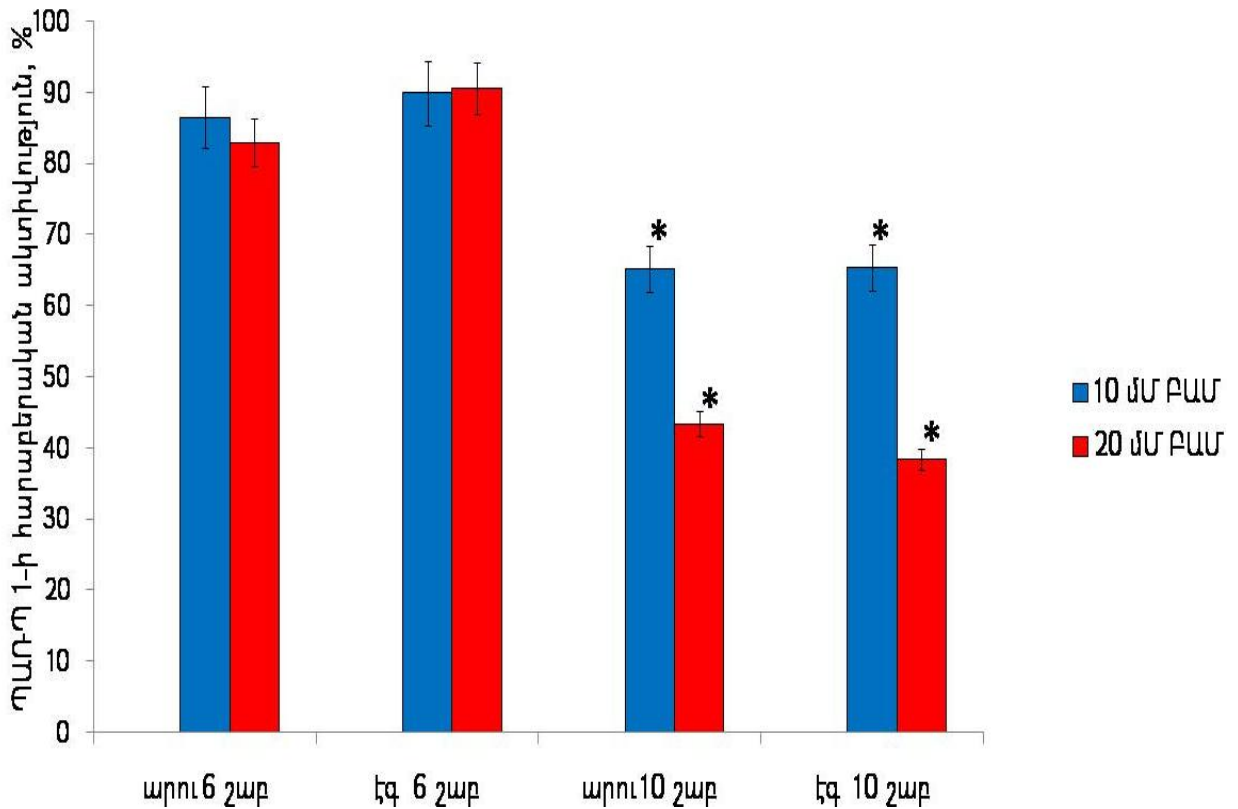
Այսպիսով, համաձայն ստացված արդյունքների, ԱԵՖ -ի արգելակիչ ազդեցությունը սեռական դիմորֆիզմ չի դրսևորում և կախված է կենդանու հասակից:

Հայտնի է, որ ՆԱԴ⁺-ի և ԱԵՖ -ի փոխանակությունն որոշիչ դեր է կատարում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորման մեջ [Braidy, 2011]: Հաշվի առնելով այն, որ բաժանվող բջիջները դրսևորում են միայն ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող ակտիվություն [Kun et al., 2006], իսկ սեռահասուն առնետների մոտ դանդաղում է թիմոցիտների բաժանումը և բազմացումը [Franckaert et al., 2015, Gui et al., 2012], մենք

ենթադրեցինք, որ այս հասակային խմբի կենդանիների թիմոցիտների կորիզներում փոխվում է ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող և տրանսպոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող ակտիվությունների հավասարակշռությունը դեպի տրանս-ակտիվությունը, որը չի արգելակվում ԱԵՖ –ի կողմից [Kun et al., 2008, Kun et al., 2004]: Մեր հետազոտությունների արդյունքների վերլուծությունը հաստատեց այս ենթադրության իրավացիությունը:

Բորբոքային և իշեմիկ կացությունների հետ կապված հիվանդածին վիճակներում ՊԱՌՊ 1-ի դեղորայքային արգելակումն ունի նպաստավոր բուժիչ ազդեցություն: Ելնելով հարցի գործնական նշանակությունից, մենք խնդիր դրեցինք ուսումնասիրել ՊԱՌՊ 1-ի առաջին սերնդի արգելակիչ բենզամիդի ազդեցությունը թիմոցիտների կորիզների ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա: ՆԱԴ⁺ - մրցակցային արգելակիչ բենզամիդն արգելակում է ֆերմենտի և՛ ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող, և՛ տրանսպոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացնող ակտիվություններն, և հանդիսանում է ներկայումս կլինիկայում կիրառվող բենզամիդի ածանցյալ հանդիսացող արգելակիչների լայն սպեկտրի ներկայացուցիչ [Krishnakumar, Kraus, 2010]:

Ստացված արդյունքները վկայում են, որ բենզամիդը չի արգելակում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունն ոչ սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում: Սեռահասուն կենդանիների թիմոցիտներն ավելի զգայուն են դառնում բենզամիդի արգելակող ազդեցության հանդեպ (նկ. 28):



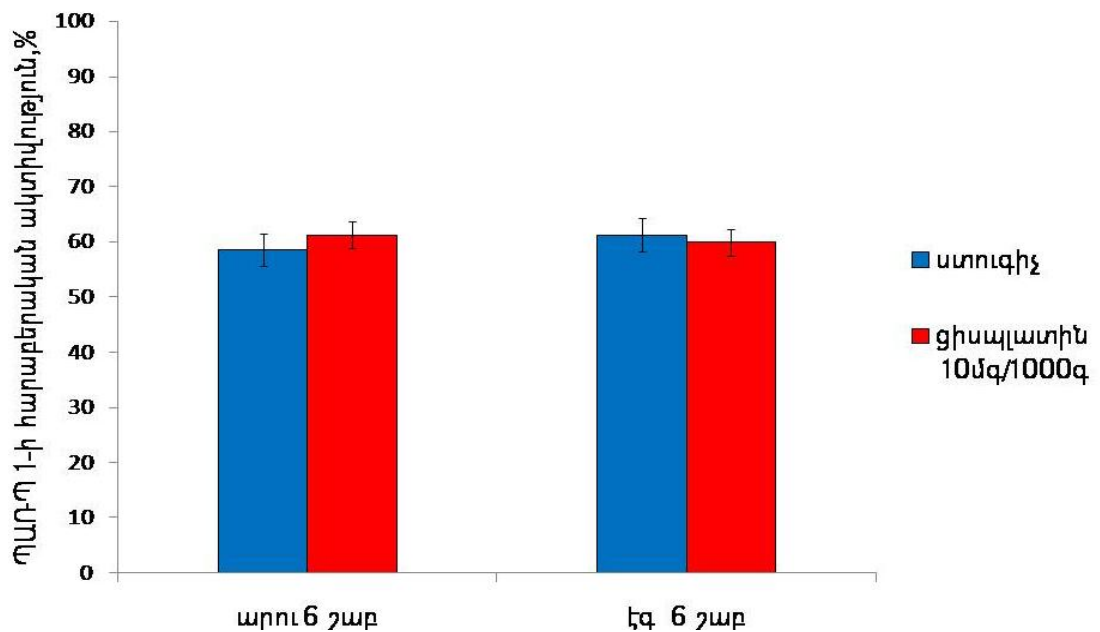
Նկար 28. Բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն և ոչ սեռահասուն էգ և արու առնետների թմոցիտների կորիզներում: ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի, * - $p < 0.05$:

Այսպիսով, ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունները յուրաքանչյուր հասակային խմբի սահմանում չեն տարբերվում արուների և էգերի մոտ, սակայն ՊԱՌՊ 1-ի արգելակումը մրցակցային արգելակիչ ԲԱՄ-ով կախված է կենդանիների հասակից:

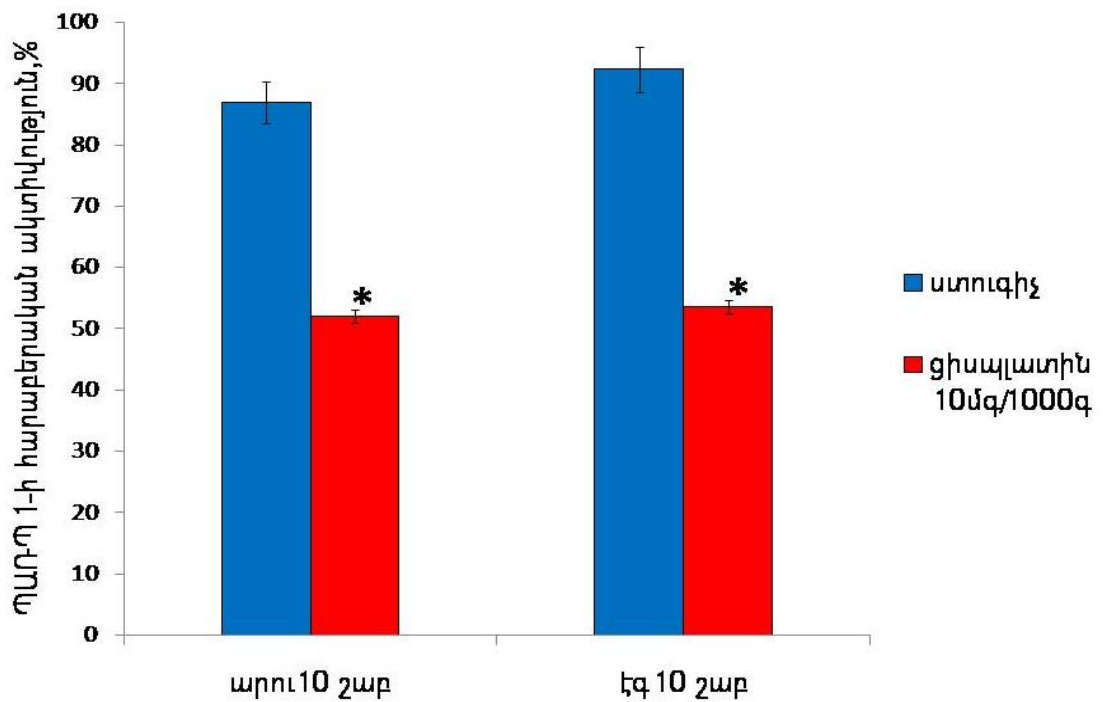
Դեղամիջոցների ֆարմակոկինետիկայի և ֆարմակոդինամիկայի սեռի և հասակի հետ կապված տարբերությունները քաջ հայտնի են, սակայն, դրանց համադրված կիրառության ժամանակ այս գործոնների ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների արդյունավետության վրա քիչ է հետազոտված [Curtin, Szabo, 2013, Eastman, Perez, 2006, Szabo et al., 2006]: Քաղցկեղային թերապիայում ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները հաճախ կիրառվում են ցիսպլատինի հետ համատեղ, ինչը առաջ է

քաշում դեղամիջոցների փոխազդեցության ուսումնասիրության անհրաժեշտությունը: Հաշվի առնելով թիմոցիտների որոշիչ դերը թունավոր քսենոբիոտիկներից օրգանիզմը պաշտպանելու գործընթացում, ներկա աշխատանքում նպատակ է դրվել պարզել, թե արդյոք ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցության սեռից և հասակից կախված առանձնահատկություններն ազդում են թիմոցիտների կորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների արդյունավետության վրա:

Ցիսպլատինի ներարկումից 48ժ հետո ոչ սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզների զգայունությունը 1 մՄ ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցության նկատմամբ հավաստիորեն չի փոխվում: Սակայն, ցիսպլատինի ներարկումը էականորեն մեծացնում է արգելակչի արդյունավետությունն երկու սեռի սեռահասուն առանձնյակների մոտ. ֆերմենտի ակտիվությունը նվազում է 45-50%-ով (նկ. 29, 30):



Նկար 29. 1 մՄ ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1 ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցությունից (48 ժ) հետո: ԱԵՖ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԱԵՖ-ի, * - $p < 0.05$:



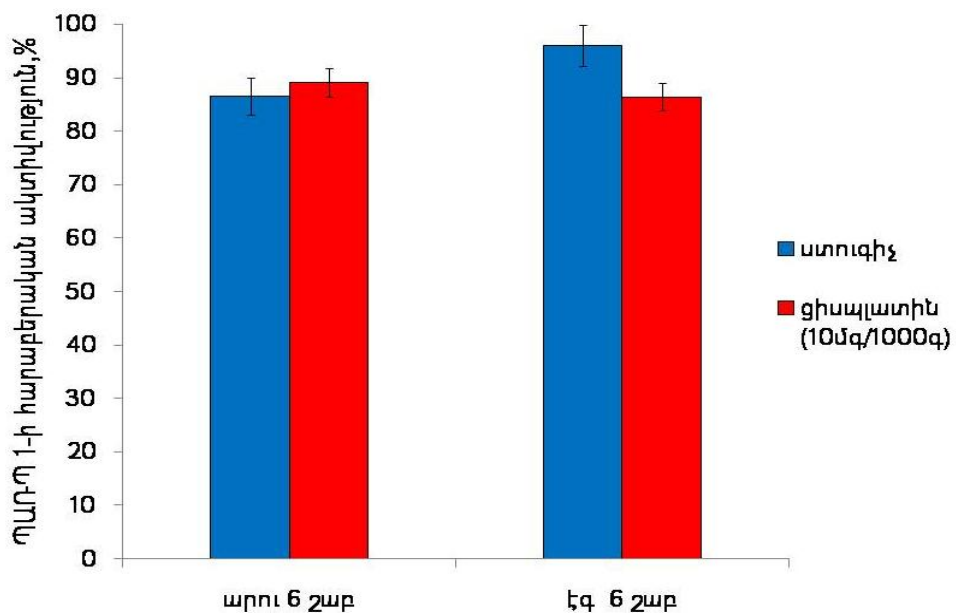
Նկար 30. 1 մՄ ԱԵՖ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսպլատինի in vivo ազդեցությունից (48 ժ) հետո: ԱԵՖ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԱԵՖ-ի, * - $p < 0.05$:

Ալոստերիկ արգելակչի ազդեցության նման փոփոխությունները վկայում են այն մասին, որ ցիսպլատինը նպաստում է ՊԱՌՊ 1-ի ինքնա- և տրանս-ռիբոզիլացնող ակտիվությունների հասակային վերաբաշխմանը:

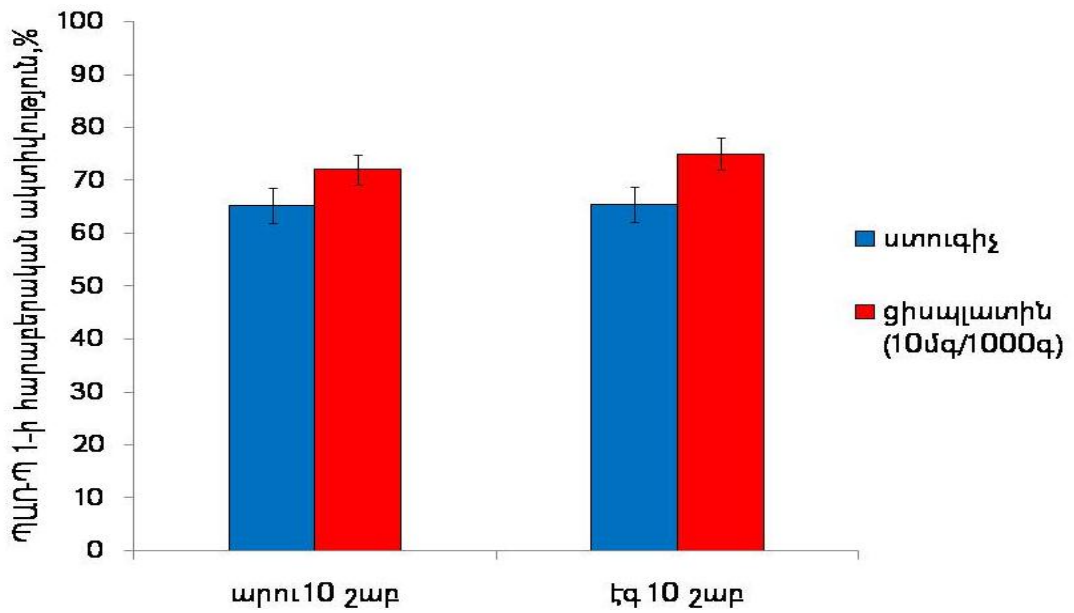
Նախկինում ցույց է տրված, որ ցիսպլատինը կարող է նվազեցնել ներբջջային ԱԵՖ –ի պարունակությունը գլիկոլիզի ֆերմենտները արգելակելու շնորհիվ [Rodriguea-Enriquez et al., 2009, Soldin et al., 2011, Shen et al., 2015]: Դիտարկելով ՊԱՌՊ 1-ը որպես կորիզային ԱԵՖ-սենսոր [Luo, Kraus, 2012], մենք ենթադրում ենք, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության հասակից կախված և ցիսպլատինով մակաձված տարբերությունները կարող են պայմանավորված լինել ներբջջային ԱԵՖ –ի պարունակության փոփոխություններով: Ենթադրվում է, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության նման փոփոխությունները կարող են պայմանավորել ԱԵՖ-նմանակ դեղամիջոցների (ԱԵՖ-միմետիկներ) վնասակար կողմնակի ազդեցությունները [Eastman, Perez, 2006]:

Ցիսապլատինի ներարկումից հետո բենզամիդի ազդեցության բնույթը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա մնում է նույնը, ինչ ստուգիչ տարբերակում: Այսինքն, արգելակչի արդյունավետությունը սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ավելի մեծ է, քան ոչ սեռահասուն առնետների թիմոցիտներում (նկ.31-34):

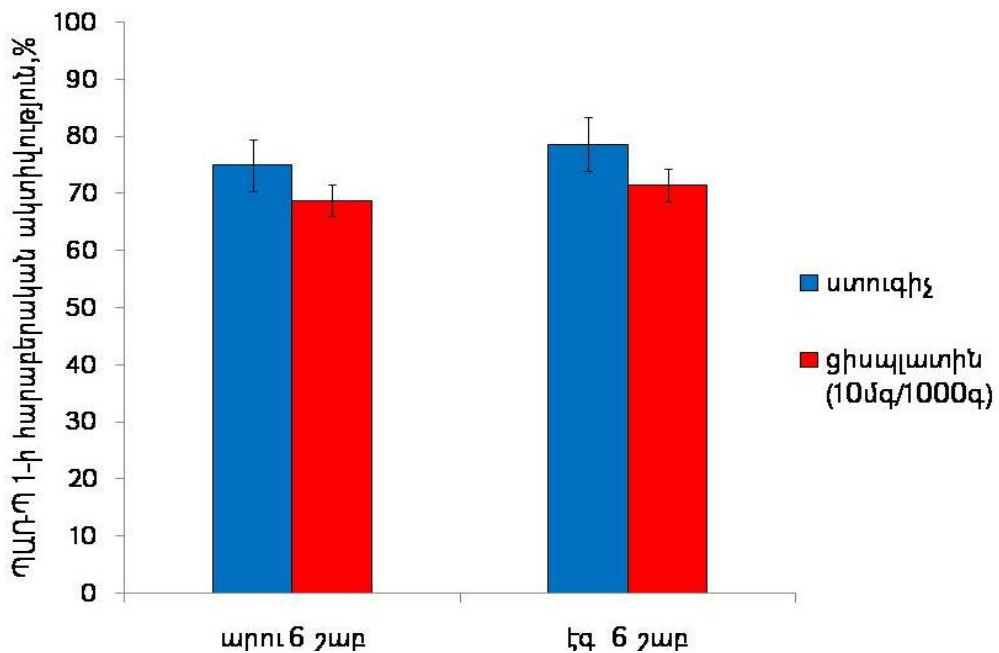
Մեր հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ ԱԵՖ-ի արգելակչի ազդեցության արդյունավետությունը ցիսապլատինի ներարկումից հետո աճում է սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում: Հավանաբար, ՊԱՌՊ 1-ի զգայունության նման մեծացումն արգելակման հանդեպ կարող է պայմանավորված լինել ֆերմենտի ինքնառիթմի լացման գերակայությամբ, քանի որ հայտնի է, որ ԴՆԹ-ցիսապլատին ածանցյալներն ընտրողաբար մեծացնում են ՊԱՌՊ 1-ի ինքնամոդիֆիկացնող ակտիվությունը [Zhu et al., 2010]: Ցիսապլատինը չի ներգործում ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման վրա բենզամիդով, քանզի վերջինս ազդում է ՊԱՌՊ 1-ի գումարային ակտիվության վրա:



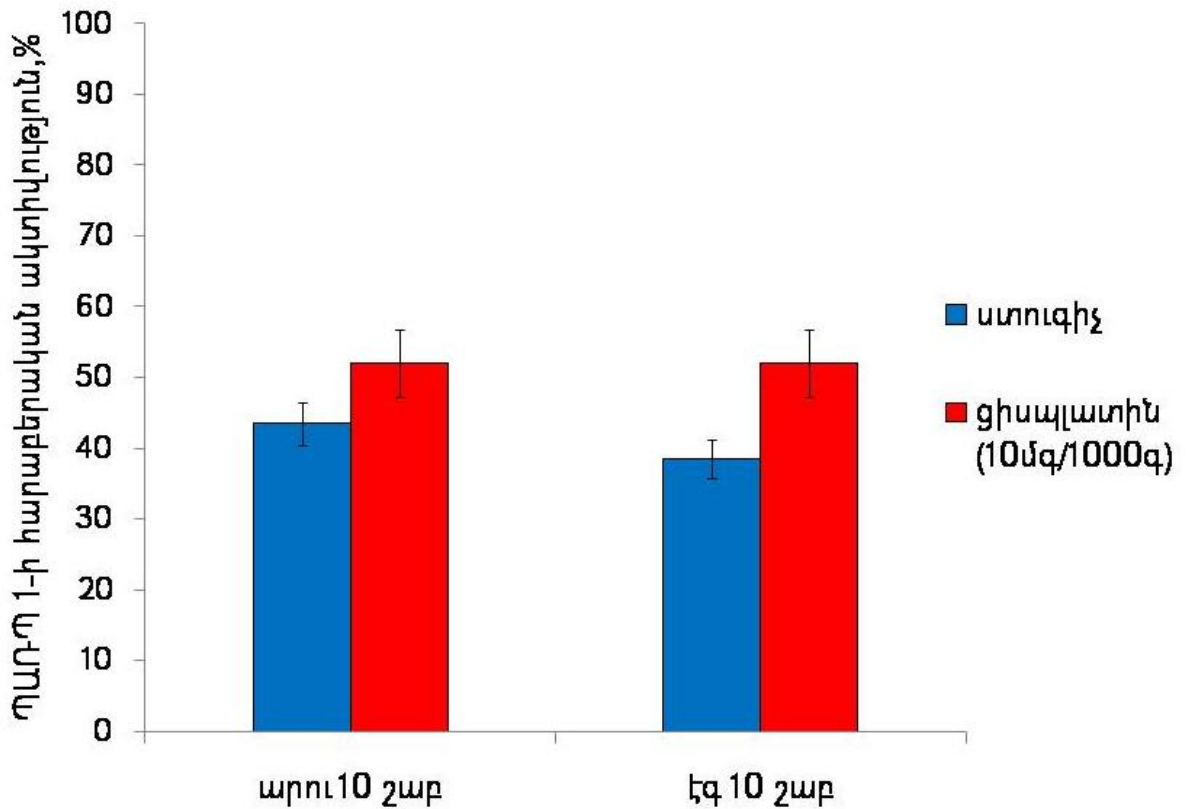
Նկար 31. 10մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսապլատինի in vivo ազդեցությունից (48 ժ) հետո: ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի:



Նկար 32. 10մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսալատինի in vivo ազդեցությունից (48 ժ) հետո: ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի:



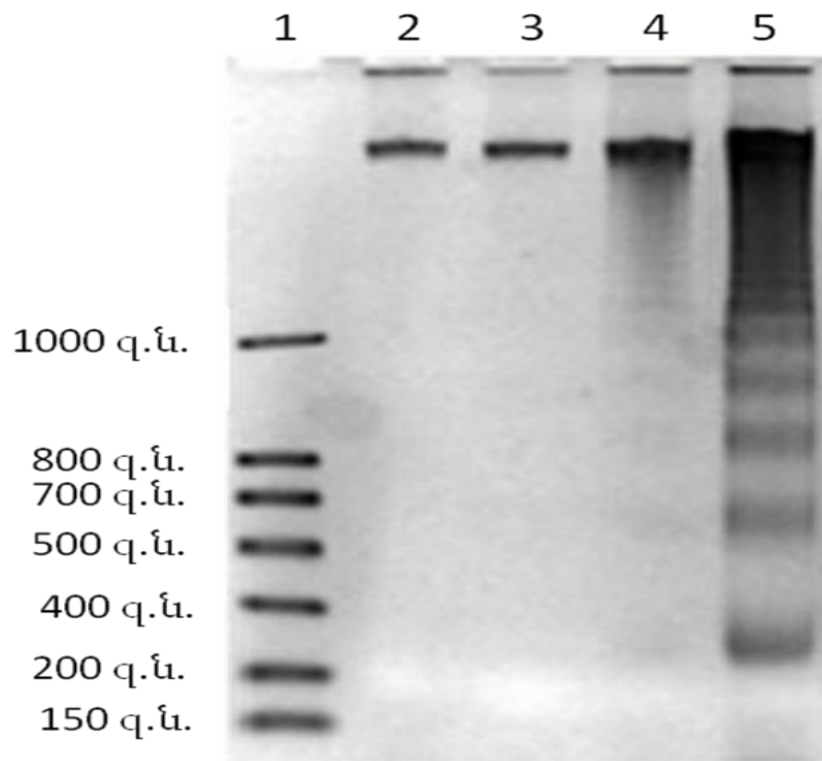
Նկար 33. 20մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսալատինի in vivo ազդեցությունից (48 ժ) հետո: ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի:



Նկար 34. 20մՄ բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ցիսպլատինի in vivo ազդեցությունից (48 ժ) հետո: ԲԱՄ-ն ավելացվել է կորիզների ինկուբացման միջավայր ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար անհրաժեշտ ռեակցիոն խառնուրդի ներմուծումից 15 րոպե առաջ: Որպես 100% ընդունված է ՊԱՌՊ 1-ի հարաբերական ակտիվությունն այն կորիզներում, որոնք ինկուբացվել են առանց ԲԱՄ-ի:

3.6. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա թիմոցիտների կորիզներում

Թիմոցիտները հանդիսանում են ապոպտոզ-հակված բջիջներ, իսկ հիդրոկորտիզոնով հարուցված ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը թիմոցիտների կորիզներում in vitro համակարգում երեք տասնամյակ է, ինչ ծառայում է որպես ապոպտոզի դասական նմուշ: Մեր հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ոչ սեռահասուն առնետների մոտ հիդրոկորտիզոնի ներարկումը 24 ժամ հետո թիմոցիտների կորիզներում մակաձում է ապոպտոզին բնորոշ ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորում: Սեռահասուն առնետների էնդոգեն կորտիկոստերոիդների քանակը այնքան մեծ է, որ ներմուծված հիդրոկորտիզոնը նման ազդեցություն չի դրսևորում (նկ. 35) [Schwartzman, Cidlowsky, 1993]:

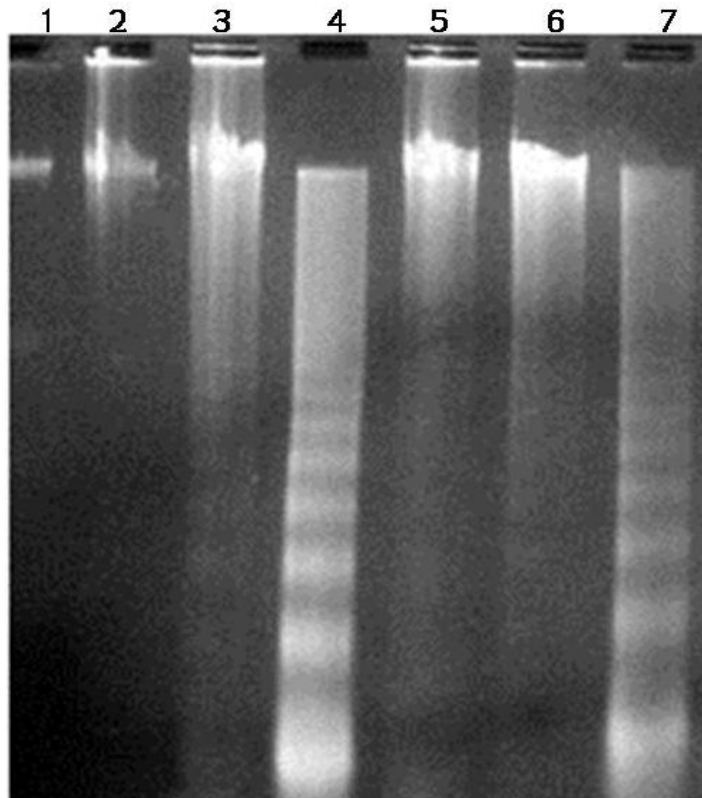


Նկար 35. Յիսպլատինի և հիդրոկորտիզոնի ազդեցությունը ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա ոչ սեռահասուն առնետների թմնոցիտների կորիզներում: ԴՆԹ –ն անջատվել է թմնոցիտների սուուզիչ (2), ցիսպլատին (10 մգ/1000գ, 48ժ) ներարկված (3), հիդրոկորտիզոն (5 մգ/1000գ, 24ժ) ներարկված (4), հիդրոկորտիզոն (10 մգ/1000գ, 24ժ) ներարկված (5) առնետների թմնոցիտների կորիզներից: 1-ին գիծը համապատասխանում է ԴՆԹ-սանդղակին:

Մեր առջև խնդիր ծառայալ ուսումնասիրել, արդյոք ցիսպլատինի ներարկումից հետո մեր կողմից դիտվող գեղձի տորքսիկ հետաճն ուղեկցվում է ապոպտոզին բնորոշ ԴՆԹ –ի օլիգոնուկլեոսոմային ճեղքավորմամբ: Փորձերի արդյունքները վկայում են, որ ցիսպլատինի ներարկումից հետո թմնոցիտների կորիզներում ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորում չի դիտվում (նկ. 35): Դա թույլ է տալիս ենթադրել, որ գեղձի տորքսիկ հետաճի հետ կապված բջիջների քանակի նվազումը պայմանավորված է ոչ թե բջիջների ապոպտոզով, այլ, ամենայն հավանականությամբ, հետևանք է նեկրոտիկ մահվան, որն ընդհանուր առմամբ բնորոշ է ախտահարված օրգաններին:

Ինչպես նշվել է, ԴՆԹ-ի ապոպտիկ ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը հեշտությամբ վերարտադրվում է լյարդի բջջակորիզներում 60 րոպե Ca^{2+} և Mg^{2+}

իոնների ներկայությամբ ինկուբացումից հետո: Թիմոցիտների մոտ երկվալենտ իոններն ավելի ուշ են մակաձուլում ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը, քանզի հայտնի է, որ թիմոցիտներում քրոմատինի կոնդենսացման աստիճանը շատ ավելի մեծ է, քան լյարդի բջջակորիզներում: Ինչպես երևում է ստացված արդյունքներից (նկ. 36), թիմոցիտների կորիզային ԴՆԹ-ն սկսում է ճեղքավորվել 6 ժամ հետո, հասնելով առավելագույն արժեքի 24 ժամ հետո:



Նկար 36. Ցիսպլատինի ազդեցությունը ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա թիմոցիտների կորիզներում՝ 1-4 – ստուգիչ, 5-7 - ցիսպլատինի ներարկումից 48 ժամ հետո:

1- ԴՆԹ –ն անջատվել է թիմոցիտների կորիզների մեկուսացումից հետո, 2 և 5 - կորիզները ինկուբացվել են 4 ժամ, 3 և 6՝ - 6 ժամ, 4 և 7՝ - 24 ժամ:

ԴՆԹ-ի ճեղքավորումը թիմոցիտների կորիզներում, ինչպես և լյարդում, կախված է կենդանիների սեռից: Ցիսպլատինի ներարկումից հետո թիմոցիտների կորիզային ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման բնույթն էապես չի փոխվում, թեև օլիգոնուկլեոսոմային հատվածներն էլեկտրաֆորեզրամում կորցնում են եզրերի հստակությունը: Դա կարող է պայմանավորված լինել նրանով, որ ԴՆԹ- ցիսպլատին ածանցյալների անկանոն բաշխվածությունը քրոմատինի լինկերային հատվածների

Երկայնքով նպաստում է տարբեր երկարության հատվածների առաջացմանն անկանոն
էնդոնուկլեոլիտիկ ճեղքավորման հետևանքով:

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Օրգանիզմում բջիջների բազմացումն ու ծերացած, վնասված բջիջների հեռացումը կարգավորող գործընթացներն ապահովում են հյուսվածքների և օրգանների բջջային հոմեոստազն և բնականոն գործունեությունը: Ուռուցքների գոյացումը պայմանավորված է կամ բջջային բազմացման գերակտիվացմամբ, կամ վնասված բջիջների հեռացման մեխանիզմների խաթարմամբ: Նշված երկու գործընթացներում էլ առանցքային դեր է կատարում ՊԱՌՊ 1 -ը [Hassa et al., 2006]: Այն մեծ նշանակություն ունի ԴՆԹ-ի վնասվածքների վերականգնման գործառույթներում և, մեծացնելով ուռուցքային բջիջների կենսունակությունը, նվազեցնում է հակաուռուցքային դեղամիջոցների արդյունավետությունը: Ներկայումս ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները կիրառվում են կրծքագեղձի քաղցկեղի բուժման ժամանակ և անցնում են կլինիկական փորձարկումներ այլ չարորակ ուռուցքների բուժման գործընթացներում: Քաղցկեղային բջիջներում ՊԱՌՊ 1 –ի ակտիվության արգելակումը զգալիորեն մեծացնում է հակաուռուցքային թերապիայի արդյունավետությունն, ինչը թույլ է տալիս նվազեցնել գենոտոքսիկ և ցիտոտոքսիկ դեղամիջոցների կիրառվող չափաբաժիններն ու դրանց վնասաբեր ազդեցությունն առողջ հյուսվածքների և օրգանների վրա: Սակայն կուտակվող տվյալներն եկան հաստատելու, որ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների բուժիչ ներգործությունը տարբեր է արական և իգական սեռերի մոտ [Szabo et al., 2006]: Սեռական դիմորֆիզմի նման դրսևորումը չափազանց կարևոր խնդիր է առաջ քաշում: Այն կայանում է նրանում, որ չարորակ ուռուցքների դեղաբուժումը պետք է մշակվի, ելնելով նաև հիվանդի սեռից:

Մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության ուսումնասիրությունը տարբեր հասակի և սեռի առնետների այն օրգանների բջջակորիզներում (յարդ, ուրցագեղձ), որոնք պատասխանատու են օրգանիզմում քսենոբիոտիկների չեզոքացման, վնասազերծման և հեռացման համար: Հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին, որ ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունը կախված է կենդանիների հասակից, ընդ որում ոչ սեռահասուն առնետների յարդի բջջակորիզներում դրսևորվում է սեռական դիմորֆիզմ: ՊԱՌՊ 1-ի

ակտիվությունն երկու հետազոտված օրգաններում նվազում է կենդանիների աճին զուգընթաց տարբեր չափով: Լյարդի բջջակորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռից կախված տարբերությունները վերանում են սեռահասուն կենդանիների մոտ՝ ֆերմենտի ակտիվության ընդհանուր կտրուկ նվազմանը զուգահեռ:

Ցիսպլատինի ներարկումից 48 ժամ հետո ոչ սեռահասուն առնետների մոտ վերանում են սեռից կախված տարբերությունները լյարդի բջջակորիզներում և դիտվում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կտրուկ նվազում: Հակառակ դրան, ցիսպլատինը թիմոցիտների կորիզներում մակաճում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռից կախված տարբերություններ թե՛ ոչ սեռահասուն, թե՛ սեռահասուն առնետների մոտ: ԲԱՄ-ի և ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում ցուցաբերում է ոչ թե սեռից, այլ հասակից կախված առանձնահատկություններ:

Ցիսպլատինի ներարկումը գործնականորեն վերացնում է բենզամիդի արգելակիչ ազդեցությունը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում, չփոխելով այն ոչ սեռահասուն առնետների մոտ: Ինչ վերաբերում է բենզամիդի (ԲԱՄ) ազդեցությանը ուրցագեղձում, ապա ցիսպլատինի ներարկումից հետո սեռահասուն առնետների թիմոցիտների կորիզներում ԲԱՄ-ը կրկին ավելի արդյունավետ է գործում: Այսպիսով, ցիսպլատինի ներգործությունը կտրուկ իջեցնում է ԲԱՄ-ի արգելակիչ ազդեցության արդյունավետությունը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում, թողնելով շատ ավելի փոքր ազդեցություն արգելակչի արդյունավետության վրա թիմոցիտների կորիզներում:

Անդրադառնալով ալոստերիկ արգելակչի (ԱԵՖ) ազդեցությանը լյարդի բջջակորիզների ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ցիսպլատինի *in vivo* ներգործությունից հետո, տեսնում ենք, որ ԱԵՖ-ով արգելակման արդյունավետությունն ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում չի փոխվում, իսկ սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում 1մՄ ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցությունը մեծանում է: Շատ ավելի կտրուկ է մեծանում ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցությունն այդ հասակի առնետների թիմոցիտների կորիզներում: Այսպիսով, ցիսպլատինի և ԱԵՖ-նմանակների (ԱԵՖ-միմետիկներ), որոնք լայնորեն կիրառվում են ուռուցքների բուժման ընթացքում,

համատեղ ազդեցության ժամանակ կարող է դիտվել ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կտրուկ նվազում թիմոցիտների կորիզներում: Դրա հետևանքով թիմոցիտները, կորցնելով կենսունակությունը, կարող են լեյկոպենիայի ախտանիշների զարգացման պատճառ հանդիսանալ:

ՊԱՌՊ 1-ը, լինելով է քրոմատին-կապված սպիտակուց, ոչ միայն պայմանավորում է քրոմատինի ֆունկցիոնալ ակտիվությունն, այլև մեծապես կարգավորում վերջինիս կոնֆորմացիան (տարածական կառուցվածքը): Ինչպես հայտնի է, ԴՆԹ - ցիսպլատին ածանցյալներն առաջ են բերում քրոմատինի տեղային ապապարուրում, ներգործելով քրոմատինի կոնֆորմացիայի վրա:

Մեր ուսումնասիրության արդյունքները ցույց տվեցին, որ քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ուժգնությունն և որակը կախված չեն առնետների սեռից: Սակայն, քանի որ ցիսպլատինի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա կախված է առնետների հասակից, ուսումնասիրությունները շարունակվեցին տարբեր հասակի արու առնետների վրա: Ստացված արդյունքները ցույց տվեցին, որ ցիսպլատինի ներարկումից հետո ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ուղեկցվում է ԴՆԹ –ի ճեղքավորման ինտենսիվության կտրուկ աճով, ինչը վկայում է քրոմատինի ապակոնդենսացման մասին: Այսպիսով, ի լրումն գրական տվյալների [Bellon et al., 1991], ցիսպլատինը կարող է ազդել քրոմատինի փաթեթավորման կամ կոնդենսացման վրա, խթանելով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը: Սա հաստատվում նրանով, որ սպիտակուցների պոլի(ԱԿՖ-ոհիբոզ)իլացումը ապակոնդենսացնում է քրոմատինը [Thomas, Tulin, 2013]: Մեր տվյալները վկայում են, որ ցիսպլատին ներարկված սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում քրոմատինի ապափաթեթավորումը կարող է հանդիսանալ երկու կենսաքիմիական իրադարձությունների հետևանք. ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացման և ԴՆԹ-ցիսպլատին ածանցյալների կողմից ԴՆԹ –ի ապապարուրման:

Քանի որ քրոմատինի կոնդենսացման աստիճանը պայմանավորում է նրա ֆունկցիոնալ ակտիվությունն, իսկ վերջինս իր հերթին կախված է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունից, ուսումնասիրվեց ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման ազդեցությունը

քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա տարբեր հասակի առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիսպլատինի in vivo ազդեցությունից հետո:

Ուսումնասիրություններից պարզվեց, որ ԱԵՖ-ի հարաբերականորեն բարձր ֆիզիոլոգիական կոնցենտրացիան (5 մՄ) ոչ միայն լիովին արգելակում է ՊԱՌՊ 1 –ն, այլև ճնշում է ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումն ոչ սեռահասուն և սեռահասուն ստուգիչ խմբի առնետների լյարդի բջջակորիզներում: 1մՄ ԱԵՖ-ի արգելակող ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա դրսևորվում է միայն ոչ սեռահասուն առնետների մոտ, սակայն դա չի ուղեկցվում ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման էական փոփոխություններով: Ցիսպլատինի ներարկումից հետո, երբ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում գրանցվում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացում, քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը կտրուկ ճնշվում է 1 մՄ ԱԵՖ-ով: Դա, հավանաբար, պայմանավորված է քրոմատինի լինկերային հատվածների քողարկումով ֆերմենտի մոլեկուլների կողմից՝ ինքնապոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)իլացման արգելակման հետևանքով, ինչը դառնում է գերակայող ցիսպլատինի ներարկումից հետո: Այսպիսով, մեր կողմից ստացված արդյունքները վկայում են, որ ԱԵՖ-ը, լինելով էներգետիկ նյութափոխանակության կենտրոնական մոլեկուլ, միաժամանակ կարևոր դեր է կատարում նաև քրոմատինի կառուցվածքի կարգավորման մեջ, վերահսկելով ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը:

Կատարված հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ 20 մՄ ԲԱՄ-ը մոտ երկու անգամ ճնշում է ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվությունը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Հետևաբար, սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության արգելակումը ԲԱՄ-ով համընկնում է ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվության նվազման հետ: Վերջինս չի կարելի պնդել ոչ սեռահասուն կենդանիների համար, քանի որ դրանց լյարդի մեկուսացված բջջակորիզներում 20 մՄ ԲԱՄ-ը չի ազդում ԴՆԹ –ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ինտենսիվության վրա:

Ուսումնասիրությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ ցիսպլատինի ազդեցությունից հետո, անկախ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակչի բնույթից (մրցակցային թե ալոստերիկ), ֆերմենտի գործունեության ճնշումը հանգեցնում է քրոմատինի

կոնդենսացմանը: Այս եզրակացությունն ունի կարևոր նշանակություն, քանի որ բացի ՊԱՌՊ 1-ի կիրառվող արգելակիչներից, հակաքաղցկեղային դեղամիջոցների մի ստվար խումբ ներկայացված է ԱԵՖ-նմանակներով:

Ինչպես նշվել է, ԴՆԹ-ի ապոպտիկ ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը հեշտությամբ վերարտադրվում է լյարդի բջջակորիզներում 60 րոպե Ca^{2+} և Mg^{2+} իոնների ներկայությամբ ինկուբացումից հետո: Ի տարբերություն նշվածի, թիմոցիտների կորիզներում, երկվալենտ իոններն ավելի ուշ են մակածում ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը: Թիմոցիտների կորիզային ԴՆԹ-ն սկսում է ճեղքավորվել 6 ժամ հետո, հասնելով առավելագույն արժեքի միայն 24 ժամում: ԴՆԹ-ի ճեղքավորումը թիմոցիտների կորիզներում, ինչպես և լյարդում, կախված չէ կենդանիների սեռից: Ցիսպլատինի ներարկումից հետո, ի տարբերություն լյարդի բջջակորիզների, թիմոցիտների կորիզային ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման բնույթն էապես չի փոխվում, թեև օլիգոնուկլեոսոմային հատվածներն էլեկտրաֆորեզրամում կորցնում են եզրերի հստակությունը: Դա կարող է պայմանավորված լինել նրանով, որ ԴՆԹ- ցիսպլատին ածանցյալների անկանոն բաշխվածությունը քրոմատինի լինկերային հատվածների երկայնքով նպաստում է տարբեր երկարության ֆրագմենտների առաջացմանն անկանոն էնդոնուկլեոլիտիկ ճեղքավորման հետևանքով:

Փորձերի արդյունքները վկայում են, որ ցիսպլատինի ներարկումից հետո թիմոցիտների կորիզներում ապոպտոզին բնորոշ ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորում, փաստորեն, չի դիտվում: Դա թույլ է տալիս ենթադրել, որ գեղձի տոքսիկ հետաճի հետ կապված դեգեներատիվ փոփոխությունները պայմանավորված են ոչ թե թիմոցիտների ապոպտոզով, այլ հետևանք են բջիջների նեկրոտիկ մահվան, ինչը ընդհանուր առմամբ բնորոշ է ախտահարված օրգաններին: Մեր հետազոտությունների արդյունքները վկայում են, որ հիվանդների մոտ ցիսպլատինով հարուցված լեյկոցիտոպենիայի պատճառը կարող է լինել ուրցագեղձի տոքսիկ հետաճը:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունը տարբերվում է էգ և արու ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Թիմոցիտների կորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռական դիմորֆիզմ չի դիտվում: Կենդանիների սեռական հասունացման շրջանում (6-10 շաբաթ) ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը լյարդի բջիջների և թիմոցիտների կորիզներում կտրուկ նվազում է, և սեռից կախված տարբերությունները վերանում են:

2. ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման արդյունավետությունը ԲԱՄ-ով և ԱԵՖ-ով լյարդի բջիջների և թիմոցիտների կորիզներում կախված է կենդանիների հասակից և արգելակման բնույթից: Սեռահասուն (10 շաբաթական) առնետների մոտ մեծանում է մրցակցային արգելակիչ ԲԱՄ-ի արդյունավետությունը, մինչդեռ ալոստերիկ արգելակիչ ԱԵՖ-ի արդյունավետությունը նվազում է: Սեռահասուն առնետների մոտ գերակայում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության տրանսմոդիֆիկացման բաղադրիչը:

3. Ցիսպլատինի ներարկումից հետո ոչ սեռահասուն և սեռահասուն կենդանիների լյարդի բջջակորիզներում դիտվում են ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռից անկախ հակամետ փոփոխություններ: Ցիսպլատինը ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունն ոչ սեռահասուն էգ և արու առնետների մոտ, կտրուկ ակտիվացնելով ՊԱՌՊ 1-ը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Ցիսպլատինի խթանող ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի հանդեպ դիտվում է միայն էգ առնետների թիմոցիտների կորիզներում:

4. Ցիսպլատինի ներգործությունը ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների ազդեցության վրա կախված է կենդանիների հասակից: Ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցությունից հետո ԱԵՖ-ի արդյունավետությունը մեծանում է սեռահասուն առնետների լյարդի բջիջների և թիմոցիտների կորիզներում, ԲԱՄ-ի արդյունավետությունը լյարդի բջջակորիզներում նվազում է, իսկ թիմոցիտների կորիզներում մնում անփոփոխ: Ոչ սեռահասուն առնետների մոտ ցիսպլատինը չի ազդում արգելակիչների արդյունավետության վրա:

5. ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվացումը սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում ցիսպլատինի in vivo ներգործությունից հետո զուգակցվում է քրոմատինի դեկոնդենսացման (ապափաթեթավորման) հետ, մինչդեռ ֆերմենտի արգելակումը ԲԱՄ-ով և ԱԵՖ-ով հանգեցնում է քրոմատինի կոնդենսացմանը:

6. Ցիսպլատինի ներարկումը ոչ սեռահասուն և սեռահասուն առնետներին հանգեցնում է ուրցագեղձի սեռից անկախ տոքսիկ հետաճի, որն իրականանում է թիմոցիտների ո՛չ թե ապոպտիկ, այլ նեկրոտիկ մահվան ուղիով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Adelfalk C, Kontou M, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Physical and functional interaction of the Werner syndrome protein with poly-ADP ribosyl transferase, *FEBS Lett*, 2003, 554(1-2), pp. 55–58.
2. Alano CC, Ying W, Swanson RA, Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition, *Journal Biol Chem*, 2004, 279(18), pp. 18895–18902.
3. Altmeyer M, Messner S, Hassa PO, Fey M, Hottiger MO, Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites, *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(11), pp. 3723-3738.
4. Anwar M, Muhammad AH, Anwar Sh, PARP inhibitors, *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2015, 13(4), doi: 10.1186/s13053-014-0024-8.
5. Basu A, Krishnamurthy S, Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage, *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 2010, Article ID 201367, <http://dx.doi.org/10.4061/2010/201367>.
6. Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ, DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II), *Biochemistry*, 1991, 30(32), pp. 8026-8035.
7. Beneke S, Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation, *Front Genet*, 2012, 3, doi: 10.3389/fgene.2012.00169.
8. Bigos KL, Pollock BG, Stankevich BA, Bies RR, Sex differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antidepressants: an update review, *Gender Medicine*, 2009, 6(4), pp. 522-543.
9. Bonicalzi ME, Haince JF, Droit A, Poirier GG, Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when, *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(7-8), pp. 739-750.

10. Boulikas T, Vougiouka M, Cisplatin and platinum drugs at the molecular level: *Oncol Rep*, 2003, 10(6), pp. 1663-1682.
11. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R, Age Related Changes in NAD⁺ Metabolism Oxidative Stress and Sirt1 Activity in Wistar Rats, *PLoS ONE*, 2011, 6(4), e19194. doi:10.1371/journal.pone.0019194.
12. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T, Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase, *Nature*, 2005, 434(7035), pp. 913–917.
13. Buchanan FF, Myles PS, Cicuttini F, Patient sex and its influence on general anaesthesia, *Anaesthesia and Intensive Care*, 2009, 37(2), pp. 207–218.
14. Burkle A, Poly(ADP-ribose) the most elaborate metabolite of NAD, *FEBS Journal*, 2005, 272(18), pp. 4576-4589.
15. Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M, Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J*, 2009, 23(3), pp. 672–678.
16. Caiafa P, Zampieri M, DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands, *J Cell Biochem*, 2005, 94(2), pp. 257–265.
17. Catalgol B, Wendt B, Grimm S, Breusing N, Ozer NK, Grune T, Chromatin repair after oxidative stress: role of PARPmediated proteasome activation. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(5), pp. 673–680.
18. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM, Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity, *Anti-Cancer Agents Med Chem*, 2007, 7(1), pp. 3-18.
19. Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme, *Biochem Biophys Res Commun*, 1963, 11, pp. 39–43.
20. Clark CC, Weitzel JN, O'Connor TR, Enhancement of Synthetic Lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro using BRCA1 and BRCA2 isogenic models, *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(9), pp. 1948-1958.
21. Clodfelter KH, Holloway MG, Hodor P, Park SH, Ray WJ, Waxmann DJ, Sex-dependent liver gene expression is extensive and largely dependent upon signal transducer

and activator of transcription 5b (STAT5b); STAT 5b-dependent activation of male genes and repression of female genes revealed by micarray analysis, *Mol Endocrinol*, 2006, 20(6), pp. 1333-1351.

22. Clodfelter KH, Miles CD, Wauthier V, Holloway MG, Zhang X, Hodor P, Ray WJ, Waxmann DJ, Role of STATS in regulation of sex-specific gene expression in female but not male mouse liver revealed by micarray analysis, *Physiol Genomics*, 2007, 31(1), pp. 63-74.

23. Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R, Bendetz-Nezer S, Yao Z, Seger R, DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation, *Mol Cell*, 2007, 25(2), pp. 297-308.

24. Curtin N, Szabo C. Therapeutic Applications of PARP Inhibitors: Anticancer Therapy and Beyond *Mol Aspects Med.*, 2013, 34(6), pp. 1217-1256, doi:10.1016/j.mam.2013.01.006.

25. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG, Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem J*, 1999, 342(2), pp. 249-268.

26. Davar D, Beumer JH, Hamieh L, Tawbi H, Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy, *Curr Med Chem*, 2012, 19(23), pp. 3907-3921.

27. de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG, Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation, *J Biol Chem*, 1986, 261(15), pp. 7011-7017.

28. Eastman A, Perez RP, New targets and challenges in the molecular therapeutics of cancer, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 62(1), pp. 5-14.

29. Electrophoresis and Blotting, Protein Blotting Guide, Bio-Rad Laboratories, Inc, USA, 2011, 43 pages, http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf

30. Electrophoresis, A Guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Detection, Bio-Rad Laboratories, Inc, 2011, 47 pages, http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

31. Endo M, Takayashi Y, Sasaki Y, Saito T, Kamutaki T, Novel gender-related regulation of CYP2C12 gene expression in rats, *Mol Endocrinol*, 2005, 19(5), pp. 1181-1190.
32. Eustermann S, Brockmann C, Mehrotra PV, Yang JC, Loakes D, West SC, Ahel I, Neuhaus D, Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose), *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(2), pp. 241–243.
33. Fahrner J, Kranaster R, Altmeyer M, Marx A, Burkle A, Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length, *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(21), e 143.
34. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A, Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy, *Nature*, 2005, 434(7035), pp. 917–921.
35. Foltinova V, Svihalkova – Sinlerowa L, Horvath V, Sova P, Hofmanova J, Janish R, Kozubik A, Mechanisms of Effects of Platinum (II) and (IV) Complexes. Comparission of cisplatin and oxaliplatin with satroplatin and LA-12, New PT(IV)-based drugs. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*, 2008, 81(2), pp. 105–116.
36. Franckaert D, Schlenner SM, Heirman N, Gill J, Skogberg G, Ekwall O, Put K, Linterman MA, Dooley J, Liston A, Premature thymic involution is independent of structural plasticity of the thymicstroma, *Eur J Immunol*, 2015, 45(5), pp. 1535-1547.
37. Fuertes MA, Alonso C, Perez JM, Biochemical modulation of cisplatin mechanism of action: enhancement of antitumour activity and circumvention of drug resistance, *Cem Rev*, 2003, 103(3), pp. 645-662.
38. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Perez JM, Cisplatin biochemical mechanisms of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways, *Curr Med Chem*, 2003, 10(3), pp. 257-266.
39. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U, The circadian PAR-domain basic leucine-zipper transcription factors DBD, TEF and HLF modulate basic and inducible xenobiotic detoxification, *Cell Metab*, 2006, 4(1), pp. 25-36.

40. General Western Blot Protocol, Guidance for running an efficient and accurate experiment, Abcam, 2013, 7 pages, <http://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol>.
41. Gottschalk AJ, Timinszky G, Kong SE, Jin J, Cai Y, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Ladurner AG, Conaway JW, Conaway RC, Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2009, 106(33), pp. 13770–13774.
42. Griguer CE, Oliva CR, Gillespie GY, Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines, *J Neuro oncol*, 2005, 74(2), pp. 123–133.
43. Gui J, Mustachio LM, Su DM, Craig RW, Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma, *Aging and Disease*, 2012, 3(3), pp. 280-290.
44. Ha HCh, Snyder SH, Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999, 96(24), pp. 13978–13982.
45. Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, Poirier GG, Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents, *J Biol Chem*, 2007, 282(22), pp. 16441-16453.
46. Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG, PARP 1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA-damage sites, *J Biol Chem*, 2008, 283(2), pp. 1197-1208.
47. Hamburg MA, Collins FS, The path rto personalized medicine, *New England Journal of Medicine*, 2010, 363(4), pp. 301-304.
48. Hassa OP, Sandra S, Haenni SS, Elser M, Michael O, Hottiger MO, Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where are We Today and Where are We Going? *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(3), pp. 789–829.
49. Hassa PO, Hottiger MO, The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders, *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(9), pp. 1534–1553.

50. He J-x, Yang C-h, Miao Z-h, Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as promising cancer therapeutics, *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010, 31, pp. 1172–1180.
51. Heeres JT, Hergenrother PJ, Poly (ADP-ribose) makes a date with death, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11(6), pp. 644-653.
52. Hewish DR, Burgoyne LA, Chromatin Substructure, The Digestion of Chromatin DNA at Regularly Spaced Sites by a Nuclear Deoxyribonuclease, *Biochemical and Biophysical Res Com*, 1973, 52(2), pp. 504-510.
53. Horton JK, Wilson SH, Strategic combination of DNA-damaging agent and PARP inhibitor results in enhanced cytotoxicity, *Frontiers in oncology*, 2013 , 3, 257, doi: 10.3389/fonc.2013.00257.
54. Hughes FM Jr, Cidlowski J, Apoptotic nuclease assays, *Methods enzymol*, 2000, 322, pp. 47-62.
55. Ingelman-Sundberg M, Sin SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C, Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects, *Pharmacol Ther*, 2007, 116(3), pp. 496-526.
56. Ji Y, Tulin AV, Poly(ADP-ribosylation) of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing, *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(11), pp. 3501–3513.
57. Jiang B-H, Tseng W-L, Li H-Y, Wang M-L, Chang Y-L, Sung Y-J, Chiou S-H, Poly(ADP-ribose) Polymerase 1: Cellular Potency, Reprogramming, and Tumorigenesis, *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7), pp. 15531-15545.
58. Jog NR, Caricchio R, Differential regulation of cell death programs in males and females by Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 and 17 β estradiol, *Cell Death and Disease*, 2013, 4(8), e758, doi: 10.1038/cddis.2013.251.
59. Jorgensen TJ, Chen K, Chasovskich S, Roy R, Dritschilo A, Uren A, Binding kinetics and activity of human poly(ADP-ribose) polymerase 1 on oligo-deoxyribonucleotide substrates, *J Mol Recognit*, 2009, 22(6), pp. 446-452.
60. Jung Y, Lippard SJ, Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage, *Chem. Rev*, 2007, 107(5), pp. 1387–1407.

61. Kanai M, Hanashiro K, Kim SH, Hanai S, Boulares AH, Miwa M, Fukasawa K, Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation), *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10), pp. 1175-1183.
62. Karasawa T, Sibrian-Vazquez M, Strongin RM, Steyger PS, Identification of Cisplatin-Binding Proteins Using Agarose Conjugates of Platinum Compounds, *PLoS ONE*, 2013, 8(6), e66220, doi:10.1371/journal.pone.0066220.
63. Karras GI, Kustatscher G, Buhecha HR, Allen MD, Pugieux C, Sait F, Bycroft M, Ladurner AG, The macro domain is an ADP-ribose binding module, *EMBO J*, 2005, 24(11), pp. 1911-1920.
64. Kauppinen TM, Swanson RA, The Role of Poly(ADP-ribose)polymerase -1 in CNS Disease, *Neuroscience*, 2007, 145(4), pp. 1267-1272.
65. Kim MY, Mauro S, Gevry N, Lis JT, Kraus WL, NAD⁺-Dependent Modulation of Chromatin Structure and Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1, *Cell*, 2004, 119(6), pp. 803-814.
66. Kraus WL, Transcriptional Control by PARP-1: Chromatin Modulation, Enhancer-binding, Coregulation and Insulation, *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(3), pp. 294–302.
67. Krishnakumar R, Kraus WL, The PARP Side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes and clinical targets, *Molecular Cell*, 2010, 39(1), pp. 8-24.
68. Kun E, Kirsten E, Mendeleyev J, Ordahl ChP, Regulation of the Enzymatic Catalysis of Poly(ADP-ribose) Polymerase by dsDNA, Polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, Histones H1 and H3, and ATP, *Biochemistry*, 2004, 43(1), pp. 210-216.
69. Kun E, Kirsten E, Bauer PI, Ordahl ChP, Quantitative Correlation Between Cellular Proliferation And Nuclear Poly (Adp-Ribose) Polymerase (Parp-1), *Int J Mol Med*, 2006, 17(2), pp. 293-300.
70. Kun E, Kirsten E, Hakam A, Bauer PI, Mendeleyev J, Identification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 as the OXPHOS-generated ATP sensor of nuclei of animal cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2), pp. 568–573.

71. Kwekel J, Desal VG, Moland CL, Branham WS, Fuscoe JC, Age and sex dependent changes in liver gene expression during the life cycle of the rat, *BMC Genomics*, 2010, 11(675), doi: 10.1186/1471-2164-11-675, <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-675>.
72. Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM, Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase-1 by human PARP 1, *Science*, 2012, 336(6082), pp. 728-732.
73. Leung M, Rosen D, Fields S, Cesano A, Budman DR, Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibition: Preclinical and Clinical Development of Synthetic Lethality, *Mol Med*, 2011, 17(7-8), pp. 854-862.
74. Li B, Navarro S, Kasahara N, Comai L, Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J. Biol. Chem*, 2004, 279(14), pp. 13659-13667.
75. Lonskaya I, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Soldatenkov VA, Regulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by DNA Structure-specific Binding, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(17), pp. 17076-17083.
76. Lu Y, Cederbaum A, The mode of cisplatin-induced cell death in CYP2E1-overexpressing HepG2 cells: modulation by ERK, ROS, glutathione and thioredoxin, *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(7), pp. 1061-1075.
77. Luo X, Kraus WL, On PAR with PARP. Cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1, *Genes and Development*, 2012, 26(5), pp. 417-432.
78. Mabley JG, Horvath EM, Murthy KG, Zsengeller Z, Vaslin A., Benko R., Kollai M, Szabo C, Gender Differences in the Endotoxin-Induced Inflammatory and Vascular Responses: Potential Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation, *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315(2), pp. 812-820.
79. Mahmood T, Yang PC, Western Blot: Technique, Theory and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(9), pp. 429-434.
80. Malanga M, Romano M, Ferone A, Petrella A, Monti G, Jones R, Limatola E, Farina B, Misregulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity and cell type-specific loss

of poly(ADP-ribose) synthesis in the cerebellum of aged rats, *J. Neurochem*, 2005, 93(4), pp. 1000–1009, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03082.x.

81. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC, Cisplatin Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Nucleus-independent Apoptotic Signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11), pp. 9100–9106.

82. Mangerich A, Bürkle A, Pleiotropic Cellular Functions of PARP1 in Longevity and Aging: Genome Maintenance Meets Inflammation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012, Article ID 321653, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/321653>.

83. Mao Z, Hine C, Tian X, VanMeter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A, Gorbunova V, SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1, *Science*, 2011, 332(6036), pp. 1443–1446.

84. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ, Smith GC, Ashworth A, Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition, *Cancer Res*, 2006, 66(16), pp. 8109–8115.

85. Megnin-Chanet F, Bollet MA, Hall J, Targeting poly(ADP-ribose) polymerase activity for cancer therapy, *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(21), pp. 3649-3662.

86. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Coyle DI, Jacobson EL, Jacobson MK, Human poly(ADP-ribose)glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments, *Exp Cell Res*, 2004, 297(2), pp. 521-532.

87. Montoni A, Robu M, Pouliot E, Shah G, Resistance to PARP-inhibitors in cancer therapy, *Frontiers in Pharmacology*, 2013, 4(18), doi:10.3389/fphar.2013.00018.

88. Murai J, Huang SN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda Sh, Pommier Y, Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors, *Cancer Res*, 2012, 72(21), pp. 5588–5599.

89. Nicolas JM, Espie P, Molimard M, Gender and Interindividual variability in pharmacokinetics, *Drug Metabolism Reviews*, 2009, 41(3), pp. 408-421.

90. Nicolson TJ, Mellor HR, Roberts RR, Gender differences in drug toxicity, *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(3), pp. 108–114.

91. Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada RA, Rodríguez M, Linares J, Ruiz de Almodóvar MB, Oliver F, PARP inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases, *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(1), pp. 13-26, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.008.
92. Perry GA, Jackson JD, Talmadge JE, Effects of a multidrug chemotherapy regimen on the thymus, *Thymus*, 1994, 23(1), pp. 39-51.
93. Petesch SJ, Lis JT, Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci, *Cell*, 2008, 134(1), pp. 74–84.
94. Pinnola A, Naumova N, Shah M, Tulin AV, Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. *J Biol Chem*, 2007, 282(44), pp. 32511–32519.
95. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR, Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins, 2000, 275(52), pp. 40974-40980.
96. Protein Electrophoresis, Technical Manual, Amersham Biosciences, USA, 80-6013-88/Rev. B0/12-99, 82 pages, [http://iris.fishersci.ca/LitRepo.nsf/0/321D6C57AB0A1A138525711C00690EB9/\\$file/HOE-001.pdf](http://iris.fishersci.ca/LitRepo.nsf/0/321D6C57AB0A1A138525711C00690EB9/$file/HOE-001.pdf)
97. Putt KS, Hergenrother PJ, An enzymatic assay for poly(ADP - ribose)polymerase - 1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD⁺: application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors, *Anal Biochem*, 2004, 326(1), pp. 78-86.
98. Quenet D, Gasser V, Fouillen L, Cammas F, Sanglier-Cianferani S, Losson R, Dantzer F, The histone subcode: poly(ADPribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. *Faseb J*, 2008, 22(11), pp. 3853–3865.
99. Reale A, Matteis GD, Galleazzi G, Zampieri M, Caiafa P, Modulation of DNMT1 activity by ADPribose polymers, *Oncogene*. 2005, 24(1), pp. 13–19.

100. Rice J, *Mathematical Statistics and Data Analysis*, Duxbury Advanced, Third Edition, 2006, 688 pages.
101. Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Gallardo-Pirez JC, Carreno-Fuentes L, Moreno-Sanchez R, Targeting of cancer energy metabolism, *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(1), pp. 29–48.
102. Rouleau M, Aubin R, Poirier GG, Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted, *Journal of Cell Science*, 2004, 117(6), pp. 815-825.
103. Ryabokon NI, Goncharova RI, Duburs G, Hancock R, Rzeszowska-Wolny J, Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining, *Mutation Research*, 2008, 637(1-2), pp. 173–181.
104. Sambrook J, Russel D, *Molecular Cloning, A laboratory manual*, , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, 3rd ed, v.1(6), p. 4-6.
105. Scandlyn MJ, Stuart EC, Rozengren RJ, Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans, *Expert Opin Drug MetabToxicol*, 2008, 4(4), pp. 413-424.
106. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G, Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(7), pp. 517–528.
107. Schwartzman RA, Cidlowski JA, Mechanism of Tissue-Specific Induction of Internucleosomal Deoxyribonucleic Acid Cleavage Activity and Apoptosis by Glucocorticoids, *Endocrinology*, 1993, 133(2), pp. 591-599.
108. Schwerdt G, Freudiner R, Schuster C, Weber F, Thews O, Gekle M, Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells, *Toxicol Sci*, 2005, 85(1), pp. 735 –742.
109. Science Lab, Image Gauge v4.0, Operation Manual, 2001, <http://www.imb.sinica.edu.tw/core/publicfacilities/pdf/Image%20Gauge%20Ver.4.0.pdf>
110. Shen Y, Aoyagi-Scharber M, Wang B, Trapping Poly(ADP-Ribose)Polymerase, *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 353(3), pp. 446-457.
111. Soldin OP, Chung SH, Mattison DR, Sex Differences in Drug Disposition, *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011, doi:10.1155/2011/187103.

112. Southan GJ, Szabo C, Poly(ADPribose)polymerase inhibitors, *Curr Med Chem*, 2003, 10(4), pp. 321-340.
113. Szabo C, Pacher P, Swanson RA, Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase, *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(12), pp. 626–630.
114. Tanuma S, Johnson GS, ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells, *J Biol Chem*, 1983, 258(7), pp. 4067–4070.
115. Thomas C, Tulin AV, Poly-ADP-Ribose Polymerase: Machinery for Nuclear Processes, *Mol Aspects Med*, 2013, 34(6), pp. 1124-1137, doi:10.1016/j.mam.2013.04.001.
116. Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M, Yokoi T, Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor, *Cancer Res*, 2004, 64(9), pp. 3119–3125.
117. Tulin A, Chinenov Y, Spradling A, Regulation of chromatin structure and gene activity by poly(ADPribose)polymerases, *Curr Top Dev Biol*, 2003, 56, pp. 55–83.
118. Tulin A, Naumova NM, Menon AK, Spradling AC, Drosophila poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates chromatin structure and SIR2-dependent silencing, *Genetics*, 2006, 172(1), pp. 363–371.
119. Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, Gabriel A, Swift S, Ross G, Griffin C, Thacker J, Ashworth A, Mutation in Brca2 stimulates error-prone homologydirected repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences, *EMBO J*, 2001, 20(17), pp. 4704–4716
120. Verdone L, La Fortezza M, Ciccarone F, Caiafa P, Zampieri M, Caserta M, Poly(ADP-ribosyl)ation affects histone acetylation and transcription, *PLOS ONE*, 2015, 10(12), doi: 10.1371/journal.pone.0144287.
121. Wacker DA, Frizzell KM, Zhang T, Kraus WL, Regulation of chromatin structure and chromatin-dependent transcription by poly(ADP-ribose) polymerase-1: possible targets for drug-based therapies, *Subcell Biochem*, 2007, 41, pp. 45-69.
122. Wacker DA, Ruhl DD, Balagamwala EH, Hope KM, Zhang T, Kraus WL, The DNA Binding and Catalytic Domains of Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 Cooperate in the Regulation of Chromatin Structure and Transcription, *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(21), pp. 7475–7485.

123. Wang D, Lippard SJ, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4, pp. 307–320, doi:10.1038/nrd1691.
124. Wang J, Huang Y, Pharmacogenomics of sex difference in chemotherapeutic toxicity, *Curr Drug Discov Technol*, 2007, 4(1), pp. 59-68.
125. Wang XZ, Weaver DT, The ups and downs of DNA repair biomarkers for PARP inhibitor therapies, *Am J Cancer Res*, 2011, 1(3), pp. 301-327.
126. Warburg O, On the origin of cancer cells, *Science*, 1956, 123(3191), pp. 309–314.
127. Wauthier V, Waxman DJ, Sex-specific early growth hormone response genes in rat liver, *Mol Endocrinol*, 2008, 22(8), pp. 1962-1974.
128. Waxman DJ, Holloway MG, Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes, *Mol Pharmacol*, 2009, 76(2), pp. 215-228.
129. Weinstock DM, Elliott B, Jasin M, A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair, *Blood*, 2006, 107(2), pp. 777–780.
130. Widlak P, Li P, Wang X, Garrard WT, Cleavage Preferences of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease) on Naked DNA and Chromatin Substrates, *J Biol Chem*, 2000, 275(11), 2000, pp. 8226–8232.
131. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P, Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia, *Cancer Res*, 2005, 65(2), pp. 613–621.
132. Yakovlev AG, Wang G, Stoica BA, Simbulan-Rosenthal CM, Yoshihara K, Smulson ME, Role of DNASIL3 in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -dependent cleavage of DNA into oligonucleosomal and high molecular mass fragments, *Nucleic Acids Res*, 1999, 27, pp. 1999-2005.
133. Yelamos J, Farres J, Llacuna L, Ampurdanes C, Martin-Caballero J, PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development, *Am J Cancer Res*, 2011, 1(3), pp. 328–346.

134. Ying W, Alano CC, Garnier P, Swanson RA, NAD⁺ as a metabolic link between dna damage and cell death, *J Neurosci Res*, 2005, 79(1-2), pp. 216-223.
135. Yuan Y, Liao Yu-M, Hsueh Ch-T, Mirshahidi HR, Novel targeted therapeutics inhibitors of MDM2, ALK and PARP, *J Hematol Oncol*, 2011, 4, pp. 16-29.
136. Zampieri M, Passananti C, Calabrese R, Perilli M, Corbi N, De Cave F, Guastafierro T, Bacalini MG, Reale A, Amicosante G, Calabrese L, Zlatanova J, Caiafa P, Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity, *PLoS One*, 2009, 4(3), e4717, doi: 10.1371/journal.pone.0004717.
137. Zaremba T, Thomas HD, Cole M, Coulthard SA, Plummer ER, Curtin NJ, Poly(ADP-ribose)polymerase -1 (PARP-1) pharmacogenetics activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers, *Bichem J*, 2011, 436(3), pp. 671-679.
138. Zhang S, Lin Y, Kim YS, Hande MP, Liu ZG, Shen HM, c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, *Cell Death Differ*, 2007, 14(5), pp. 1001-1010.
139. Zhang T, Berrocal JG, Frezzell KM, Gamble MJ, DuMont ME, Krishnakumar R, Young T, Sauve AA, Kraus WL, Enzymes in the NAD⁺ salvage pathway regulate SIRT 1 activity at target gene promoters, *J Biol Chem*, 2009, 284(30), pp. 20408-20417.
140. Zhou R, Vander Heiden M, Rudin CM, Genotoxic exposure is associated with alterations in glucose uptake and metabolism, *Cancer Res*, 2002, 62(12), pp. 3515-3520.
141. Zhu G, Chang P, Lippard SJ, Recognition of Platinum-DNA Damage by Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1, *Biochemistry*, 2010, 49(29), pp. 6177-6183, doi: 10.1021/bi100775t.