

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՍԱՏՐՅԱՆ ԱՆՈՒՇ ԼԵՎՈՆԻ

ՑԻՍՊԼԱՏԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊՈԼԻ(ԱԿՖ-ՌԻԲՈԶ)ՊՈԼԻՄԵՐԱԶ
1-Ի ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՎՐԱ ՏԱՐԲԵՐ ՀԱՍԱԿԻ ԵՎ ՍԵՌԻ
ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ԵՎ ՈՒՐՑԱԳԵՂՁԻ ԲՋՋԱԿՈՐԻՉՆԵՐՈՒՄ

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

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան 2016

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АСАТРЯН АНУՍԼԵՎՈՆՈՎՆԱ

ДЕЙСТВИЕ ЦИСПЛАТИНА НА РЕГУЛЯЦИЮ АКТИВНОСТИ ПОЛИ(АДФ-
РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ТИМУСА КРЫС
РАЗНОГО ВОЗРАСТА И ПОЛА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – Биохимия

ЕРЕВАН 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում
Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կենս. գիտ.

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Է.Ս. Գևորգյան
Գ.Ս. Վարդանյան
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ
Հ.Լ. Հայրապետյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) համալսարան
Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. դեկտեմբերի 16-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2016թ. նոյեմբերի 15-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ՝ Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете
Научный руководитель: член-корреспондент НАН РА,
доктор биол. наук, профессор Э.С. Геворкян
Официальные оппоненты: доктор биол. наук, профессор
Г.С. Варданян
кандидат биол. наук, доцент
Р.Л. Айрапетян

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский) университет

Защита диссертации состоится 16-го декабря 2016г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 051 по биофизике при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 15-го ноября 2016г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051
кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В основе опухолеобразования лежит бесконтрольный рост той или иной клеточной популяции. Относительное постоянство количества клеток (клеточный гомеостаз) в тканях и органах обеспечивается двумя разнонаправленными процессами-размножением и гибелью старых и поврежденных клеток. Сбалансированность этих процессов обеспечивает нормальную жизнедеятельность тканей и органов. Опухолообразование обусловлено гиперактивацией клеточной пролиферации или нарушением механизмов, ответственных за элиминацию клеток. Известно, что в процессах размножения и гибели клеток ключевую роль играет ядерный фермент поли(АДФ-рибозо)полимераза 1 (ПАРП 1) (ЕС 2.4.2.30) [Hassa et al., 2006]. ПАРП 1, будучи активным участником основных ядерных процессов, связанных с хроматином, играет ведущую роль в злокачественном перерождении клеток и их элиминации. Фермент принимает активное участие в репарации ДНК и, повышая жизнеспособность опухолевых клеток, уменьшает эффективность противоопухолевых препаратов. С другой стороны, фермент задействован практически во всех механизмах реализации клеточной гибели (апоптоз, некроз, программированный некроз, аутофагия). Регуляция активности ПАРП 1 имеет большое значение при патологиях, связанных с нарушениями клеточного гомеостаза (воспалительные процессы, опухолеобразование, нейродегенеративные изменения, инфаркт миокарда и инсульты головного мозга). Этим обусловлено пристальное внимание исследователей к ингибиторам ПАРП 1, которые повышают эффективность лечения вышеуказанных заболеваний.

Лекарственные препараты, используемые при лечении злокачественных новообразований, как правило, цитотоксичны, и их эффективность ограничивается тем обстоятельством, что наряду с опухолевыми клетками поражаются также здоровые клетки организма. В связи с этим, особое значение приобретает разработка препаратов, направленных на более эффективное избирательное поражение раковых клеток. Одним из актуальных подходов является комбинированное использование ДНК-повреждающих препаратов и ингибиторов ПАРП 1 [Curtin, Szabo, 2013]. В настоящее время многие ингибиторы ПАРП 1 после успешных испытаний используются в клиниках при лечении злокачественных новообразований [Megnin-Chanet F. et al., 2010].

Цисплатин является одним из самых мощных и широко используемых противоопухолевых препаратов. Известно, что, взаимодействуя с ядерной ДНК, цисплатин нарушает все связанные с хроматином ядерные функции, обрекая клетку на гибель [Clark et al., 2012].

Образование цисплатин-ДНК производных приводит к активации ПАРП 1, что способствует репарации ДНК. Ингибиторы ПАРП 1 не только подавляют репарационные процессы с участием ПАРП 1, но и угнетают расщепление глюкозы, проявляя в опухолевых клетках эффект, присущий анти-метаболическим антиопухолевым препаратам. Результаты пре- и клинических испытаний ингибиторов ПАРП 1 показали, что лечебное действие ингибиции ПАРП 1 зависит от пола пациентов [Peralta-Leal et al., 2009]. Возрастные особенности действия лекарственных препаратов и половой диморфизм ингибиторов ПАРП 1 делают актуальной разработку химиотерапевтических схем лечения с учетом возраста и пола пациента.

Цитотоксическое действие цисплатина проявляется не только в опухолевых, но и здоровых клетках. В результате наблюдаются побочные действия препарата

(тошнота, рвота, облысение, анемия, почечная и печеночная недостаточность, нейротоксичность и др.).

В организме млекопитающих основными органами, ответственными за детоксикацию ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов, являются печень и тимус.

Исходя из актуальности проблемы, представленная диссертационная работа посвящена исследованию действия ингибиторов ПАРП 1 на активность фермента в ядрах клеток печени и тимуса самок и самцов крыс разного возраста после введения животным цисплатина.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является исследование особенностей регуляции активности ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимуса крыс разного пола и возраста. Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимуса половозрелых и неполовозрелых самок и самцов крыс
- исследовать действие аллостерического (АТФ) и конкурентного (бензамид) ингибиторов ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимуса крыс разного пола и возраста
- исследовать *in vivo* действие цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимуса крыс разного пола и возраста
- исследовать эффективность ингибиторов ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимуса половозрелых и неполовозрелых самок и самцов крыс после введения животным цисплатина
- исследовать действие цисплатина на интенсивность интернуклеосомальной фрагментации ДНК в ядрах клеток печени крыс

Научное значение и новизна работы. В представленной работе показано, что активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс зависит от пола животного, при этом в ядрах тимоцитов половой диморфизм не проявляется. В процессе полового созревания происходит резкое снижение активности фермента в ядрах клеток печени, одновременно исчезают ранее наблюдаемые половые различия активности ПАРП 1. Впервые показано, что подавление активности фермента конкурентным (бензамид) и аллостерическим (АТФ) ингибиторами в ядрах клеток печени не зависит от пола крыс, однако проявляется четкая зависимость от возраста животных. Конкурентный ингибитор более эффективен в ядрах клеток печени и тимуса половозрелых, а аллостерический ингибитор - неполовозрелых крыс. После введения цисплатина в ядрах клеток печени неполовозрелых и половозрелых крыс наблюдаются не зависящие от пола разнонаправленные изменения активности ПАРП 1. Активность фермента подавляется в ядрах клеток печени неполовозрелых и увеличивается у половозрелых крыс. Характерно, что после введения цисплатина активность ПАРП 1 увеличивается только в ядрах клеток тимоцитов половозрелых самок, тем самым проявляя половой диморфизм.

Впервые показано, что после введения цисплатина животным разного возраста наблюдается разнонаправленное изменение эффективности ингибиторов ПАРП 1. Цисплатин не действует на эффективность ингибиторов у неполовозрелых крыс, в то время как у половозрелых крыс эффективность аллостерического ингибитора АТФ возрастает как в ядрах клеток печени, так и тимуса, а эффективность конкурентного ингибитора бензамида уменьшается в ядрах клеток

печени. Эффективность бензамида не меняется в ядрах тимоцитов половозрелых животных.

В работе показано, что значения транс-модификационной и авто-модификационной активностей ПАРП 1 меняются в зависимости от возраста крыс и воздействия цисплатина и, по всей вероятности, у половозрелых крыс начинает превалировать транс-модификационная составляющая активности ПАРП 1.

В работе впервые показано, что цисплатин-индуцированная активация ПАРП 1 в ядрах клеток печени половозрелых крыс сопровождается резким ростом интенсивности интернуклеосомальной фрагментации ДНК, что является показателем деконденсации хроматина. Заключается, что наблюдаемая деконденсация может быть следствием двух биохимических процессов-активации ПАРП 1 и деспирализации ДНК, вызванной формированием в клеточном ядре цисплатин-ДНК производных. В противоположность действию цисплатина исследованные ингибиторы ПАРП 1 уменьшают интенсивность интернуклеосомальной фрагментации ДНК, что характерно для конденсированного хроматина.

Показано также, что после введения цисплатина в ядрах тимоцитов крыс не наблюдается характерного для апоптоза интернуклеосомального расщепления ДНК. Заключается, что связанные с токсической инволюцией тимуса дегенеративные изменения обусловлены не апоптической, а некротической формой гибели клеток.

Практическая ценность работы. Известно, что ингибирование ПАРП 1 повышает эффективность лечения таких тяжелых заболеваний, как инфаркт миокарда, инсульты головного мозга, бактериальный токсический шок, болезни Альцгеймера и Паркинсона и злокачественные новообразования [Anwar et al., 2015].

В настоящее время исследование механизмов ингибирования ПАРП 1 и разработка новых ингибиторов является важной практической задачей. Ингибиторы ПАРП 1 применяются при лечении злокачественных новообразований для повышения эффективности цитотоксического действия цисплатина [Curtin, Szabo, 2013]. При комбинированном применении лекарственные препараты могут вступать в синергическое, аддитивное и антогонистическое взаимодействие. Более того, действие лекарственных препаратов зависит от возраста и пола пациента. В настоящее время становится очевидной необходимость персонализированных подходов при разработке лекарственных схем, что позволит повысить эффективность лечения и минимизировать нежелательные действия препаратов на клетки здоровых тканей. Исходя из вышесказанного, данные, полученные в ходе исследования совместного действия цисплатина и ингибиторов ПАРП 1 на активность фермента и структуру хроматина в ядрах клеток органов-мишеней крыс разного возраста и пола, имеют большое практическое значение. Результаты данной работы могут быть использованы при разработке эффективных схем лекарственного лечения.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: New Aspects in Molecular Biotechnology and Biochemistry, Yerevan, 2013; International Conference “Physical Concepts Of Nucleic-Acid Structure And Behavior”, Yerevan, 2013; Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանությունը գիտությունների հեռանկարներ-4”, Երևան, 2013; Юбилейная Десятая Годичная Научная Конференция Российско-Армянского (Славянского) университета, Ереван, 2015; Международная Пущинская Школа-Конференция Молодых Ученых «Биология - Наука XXI Века», Пущино, 2012, 2015, 2016. Работа апробирована на заседании кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета Ереванского государственного университета.

Публикации. Основные результаты исследования представлены в 15 научных публикациях, в том числе 8 научных статьях и 7 научных тезисах.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы, насчитывающего 141 наименование. Диссертация изложена на 109 страницах и включает 36 рисунков и 2 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы ее цель и основные задачи, представлены научная новизна, теоретическое и практическое значение работы.

Первая глава посвящена обзору литературных данных о строении, функции ПАРП 1, биологической роли ингибиторов фермента, механизмах действия цисплатина, а также особенностях действия лекарственных препаратов, зависящих от возраста и пола больных.

Краткое содержание остальных глав приводится ниже.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на неполовозрелых (6 недель, 100г) и половозрелых (10 недель, 150г) самках и самцах белых беспородных крыс. В каждом эксперименте использовали 4 животных. В работе использовали реактивы фирмы “Sigma”, США. Водный раствор цисплатина вводили внутривентриально (10мг/1000г массы животного). Крыс декапитировали через 48ч после введения цисплатина в условиях легкой эфирной анестезии (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г).

Выделение ядер клеток печени и тимуса крыс проводили по методу [Hewish, Burgoune, 1973].

Выделение ДНК из изолированных ядер проводили согласно стандартному протоколу [Sambroock, Russel, 2001].

Интернуклеосомальное расщепление ДНК в ядрах печени проводили посредством активации эндогенных ядерных Mg^{2+} , Mg^{2+}/Ca^{2+} зависимых эндонуклеаз. Эндонуклеазы активировали добавлением двухвалентных ионов в среду инкубации изолированных ядер.

Электрофоретическое разделение образцов ДНК проводили в 1,8% агарозном геле. ДНК окрашивали бромидом этидия (0,5 мкг/мл) [Sambroock, Russel, 2001].

Относительное содержание ДНК в полосах электрофоретического разделения определяли с помощью денситометрирования негативных снимков электрофореграмм и их последующей обработки компьютерной программой (FUJI FILM, Sci.Lab, Image Gauge V4.0) [Science Lab, Image Gauge v4.0 Operation Manual, 2001].

Активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимуса определяли по методу [Putt, Hergenrother, 2004].

Идентификацию ПАРП 1 проводили иммунологическим методом “Western blotting”-а по протоколу [Electrophoresis and Blotting, Bio-Rad, 2011].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по Стьюденту [Rice, 2006].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени крыс разного пола и возраста. Исследования последних лет показали многогранность и сложность механизмов действия ПАРП 1. Выявлено, что активация фермента наблюдается при развитии многих патологических состояний, а лечебный эффект ингибирования фермента зависит от пола пациента [Szabo et al., 2006]. Исходя из этого, нами была поставлена задача изучить исходную активность ПАРП 1 в ядрах печени самок и самцов неполовозрелых (6 недель) и половозрелых (10 недель) крыс. Полученные данные представлены на рисунке 1. Как видно из рисунка, исходная активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени самцов неполовозрелых крыс превышает активность фермента в ядрах клеток печени самок на 25%, что указывает на половой диморфизм активности ПАРП 1 у неполовозрелых крыс. Эти различия активности фермента не наблюдаются в ядрах печени половозрелых животных.

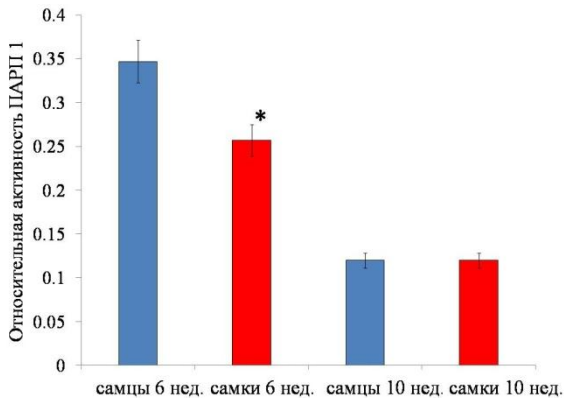


Рис. 1. Исходная активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых (6 недель) и половозрелых (10 недель) самцов и самок крыс. * - $p < 0.05$

Полученные нами результаты свидетельствуют о резком уменьшении активности ПАРП 1 (2,5-3 раза) в ядрах клеток печени половозрелых 10-и недельных крыс, что согласуется с литературными данными [Mangerich, Burkle, 2012]. Мы предположили, что уменьшение активности ПАРП 1 в ядрах клеток печени 10-и недельных крыс может быть обусловлено возрастным снижением пролиферативной активности клеток печени и связанным с этим переключением ауто-модифицирующей активности фермента на меньшую транс-модифицирующую активность ПАРП 1 [Kun et al., 2006]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что через 48 часов после введения цисплатина животным активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс уменьшается в 2,5-3,5 раза у самок и самцов, соответственно (рис. 2). Методом Вестерн-блоттинга было установлено, что подобная резкая инактивация ПАРП 1 не связана с деградацией ферментного белка и может быть следствием ингибирования фермента (рис. 3).

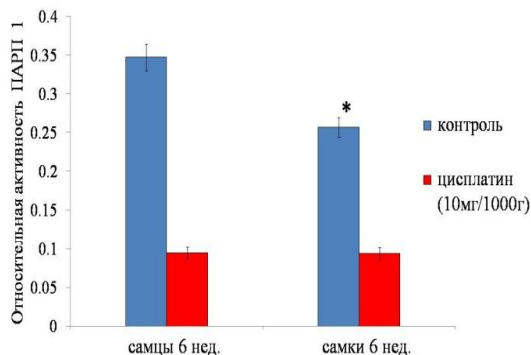


Рис. 2. Действие цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых самцов и самок. * - $p < 0.05$

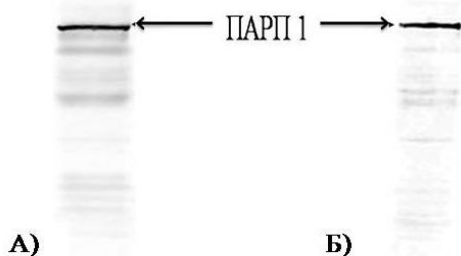


Рис. 3. Иммуноидентификация ПАРП 1 А)- в контроле, Б)-во фракции ядерных белков печени неполовозрелых крыс через 48 часов после введения животным цисплатина.

Подобное ингибирование может быть вызвано цисплатин-индуцированным подавлением энергетического обмена, понижением эндогенного содержания НАД⁺ [Zhou et al., 2002, Rodriguez-Enriquez et al., 2009] и недостаточной эффективностью детоксикации цисплатина в печени, вследствие возрастных особенностей экспрессии генного кластера, ответственного за синтез белков с детоксифицирующей активностью [Kwekel et al., 2010].

Картина существенно меняется после введения цисплатина половозрелым крысам (рис. 4), в ядрах клеток печени которых наблюдается резкая активация ПАРП 1 (в 2 раза). Более мощная система детоксикации печени половозрелых животных, нейтрализуя токсическое действие цисплатина на энергетический обмен, способствует развитию классического пути активации ПАРП 1 цисплатин-ДНК производными [Luo, Kraus, 2012, Zhu et al., 2010].

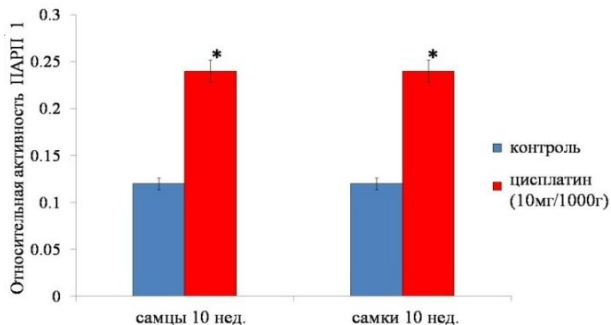


Рис. 4. Действие цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени половозрелых самцов и самок. * - $p < 0.05$

Действие аллостерического (АТФ) и конкурентного (бензамид) ингибиторов ПАРП 1 на активность фермента в ядрах клеток печени крыс разного пола и возраста после введения животным цисплатина.

В наших экспериментах бензамид (БАМ) или АТФ добавляли в инкубационную среду изолированных ядер за 15 минут до введения в среду инкубации реагентов, необходимых для определения активности ПАРП 1. Известно, что БАМ подавляет активность ПАРП 1, конкурируя с НАД⁺ за связывание в активном центре фермента. Таким образом, БАМ подавляет как транс-, так и авто-модифицирующую составляющие активности ПАРП 1 [Kun et al., 2004].

Согласно полученным данным (рис. 5), низкие концентрации БАМ (10мМ) достоверно не меняют активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс, подавляя при этом активность фермента на 30% у половозрелых животных. Более высокая концентрация БАМ (20мМ) в равной мере подавляет активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени самок и самцов неполовозрелых крыс (на 30 и 32%, соответственно). Эффективность 20мМ БАМ значительно выше в ядрах клеток печени половозрелых крыс.

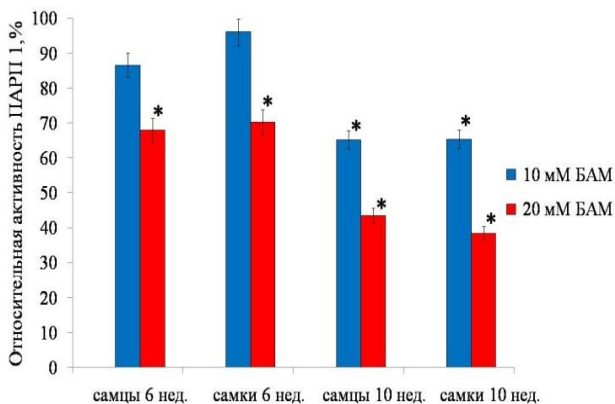


Рис. 5. Действие бензамида (БАМ) на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени самцов и самок разного возраста. За 100% принята активность ПАРП 1 в ядрах, инкубированных в отсутствие БАМ. * - $p < 0.05$

Известно, что внутриклеточная концентрация АТФ колеблется в пределах 1-10 мМ [Kim et al., 2004]. Согласно результатам наших исследований, 1 мМ АТФ подавляет активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс на 40%, независимо от пола животных, практически не действуя на активность фермента в ядрах клеток печени половозрелых крыс (рис. 6). Таким образом, понижение активности ПАРП 1 в процессе полового созревания крыс (6-10 недель) сопровождается повышением устойчивости фермента к ингибирующему действию 1 мМ АТФ. Присутствие 5мМ АТФ в среде инкубации приводит к полному подавлению активности ПАРП 1 в ядрах клеток печени крыс всех исследованных групп животных. Представленные данные подтверждают правомерность гипотезы Куна и соавт. [Kun et al., 2006], согласно которой в активно размножающихся клетках превалирует авто-модифицирующая компонента активности ПАРП 1.

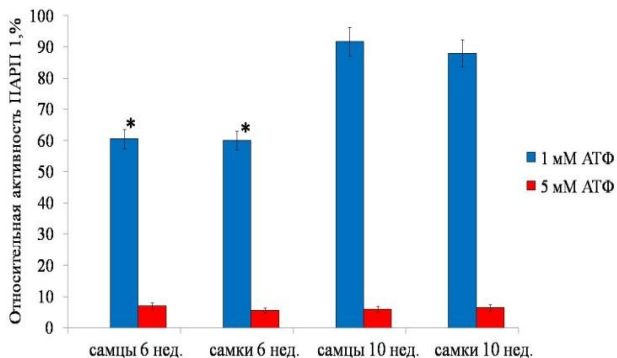


Рис. 6. Действие АТФ на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени самцов и самок разного возраста. За 100% принята активность ПАРП 1 в ядрах, инкубированных в отсутствие АТФ. * - $p < 0.05$

В настоящее время ингибиторы ПАРП 1 вступили в фазу клинических испытаний и применяются совместно с платиновыми противоопухолевыми препаратами при лечении различных злокачественных новообразований. Исходя из этого, в следующей серии экспериментов мы исследовали совместное действие цисплатина и ингибиторов ПАРП 1 на активность фермента в ядрах клеток печени самцов и самок крыс разного возраста. Согласно полученным результатам (рис. 7), после *in vivo* действия цисплатина полностью меняется картина ингибирования ПАРП 1 бензамидом.

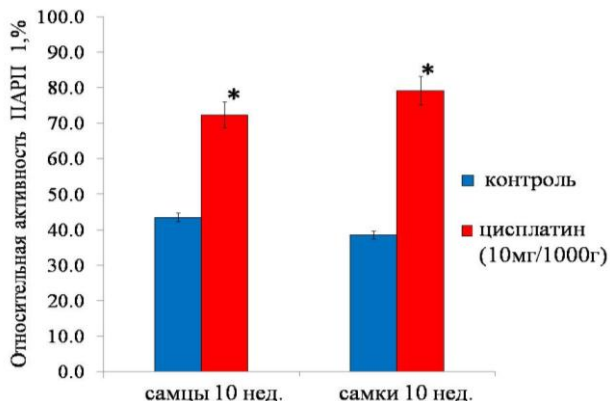


Рис. 7. Действие бензамида (БАМ) на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени половозрелых самцов и самок через 48 часов после введения цисплатина. За 100% принята активность ПАРП 1 в ядрах, инкубированных в отсутствие БАМ. * - $p < 0.05$

Как видно из рисунка, после введения половозрелым животным цисплатина ингибирующее действие 20мМ БАМ на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени крыс уменьшается в 1,5-2 раза.

Как показали результаты опытов следующей серии экспериментов, эффективность аллостерического ингибитора АТФ в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс не меняется после введения животным цисплатина. Однако, введение цисплатина половозрелым животным увеличивает ингибирующее действие 1мМ АТФ на активность ПАРП 1. Увеличение эффективности действия АТФ может быть обусловлено тем, что цисплатин сдвигает баланс активностей ПАРП 1 в пользу авто-модифицирования, которое специфически угнетается АТФ. Более высокие концентрации АТФ, как и в контроле, полностью подавляют активность ПАРП 1.

Действие цисплатина на характер интернуклеосомального расщепления хроматина клеток печени крыс разного пола и возраста.

Как известно, ПАРП 1 является активным участником процессов, формирующих структуру хроматина. Изменение активности фермента влияет не только на деятельность механизмов репарации ДНК, но и на степень конденсации хроматина [Kraus, 2008, Thomas, Tulin, 2013]. Цисплатин-ДНК производные, образующиеся после воздействия цисплатина, связывают молекулы ПАРП 1, которые, тем самым, оказываются в “ловушке” [Murai et al., 2015, Shen et al., 2015]. АТФ, связываясь с доменом авто-модификации фермента, препятствует диссоциации ПАРП 1 от ДНК и, таким образом, воспроизводит эффект “ловушки”, уменьшая доступность хроматина для нуклеаз [Kim et al., 2004, Kun et al., 2004]. Известно, что интенсивность и характер эндонуклеолитического расщепления ДНК являются биохимическими показателями степени конденсации, и интернуклеосомальное расщепление ДНК в хроматине апоптотическими эндонуклеазами характеризует особенности упаковки хроматина в клеточных ядрах [Yakovlev et al., 1999, Widlak et al., 2000, Hughes, Cidlowsky, 2000]. При оценке эффективности ингибиторов ПАРП 1 в противоопухолевой терапии необходимо учитывать изменения структуры хроматина, обусловленные действием цисплатина, которые играют определяющую роль как в активации ПАРП 1, так и для осуществления функций фермента. В нашей работе мы исследовали совместное действие цисплатина и ингибиторов ПАРП 1 на характер интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс. С этой целью мы активировали эндогенные внутриядерные апоптотические Mg^{2+} - и Ca^{2+}/Mg^{2+} -зависимые эндонуклеазы добавлением в среду инкубации изолированных ядер двухвалентных ионов. Как показали результаты исследований, интенсивность интернуклеосомального расщепления ДНК не зависит от пола животного. Исходя из этого, дальнейшие эксперименты проводили на неполовозрелых и половозрелых самцах крыс. На рисунке 8 приведены электрофореграммы ДНК ядер клеток печени неполовозрелых (А) и половозрелых (Б) крыс.

Введение цисплатина увеличивает количественное содержание крупных фрагментов ДНК в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс на 28%, в то время, как интенсивность расщепления ДНК в ядрах клеток половозрелых крыс возрастает почти в 2 раза, т.е. процентное содержание крупных фрагментов уменьшается почти вдвое (табл. 1). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что действие цисплатина на степень конденсации хроматина в ядрах клеток печени зависит от возраста крыс.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие цисплатина может вызвать деконденсацию хроматина не только вследствие образования цисплатин-ДНК производных, как полагалось ранее [Bellon et al., 1991], но и опосредованно путем активации ПАРП 1. В следующей серии экспериментов мы исследовали действие ингибиторов ПАРП 1 на интенсивность интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс через 48 часов после введения животным цисплатина. Как видно из рис. 8, 1мМ АТФ практически не действует на интенсивность интернуклеосомального расщепления ДНК в ядрах клеток печени неполовозрелых и половозрелых крыс контрольной группы. 5мМ АТФ, наряду с ингибированием активности ПАРП 1, полностью подавляет интернуклеосомальное расщепление ДНК в исследованных возрастных группах.

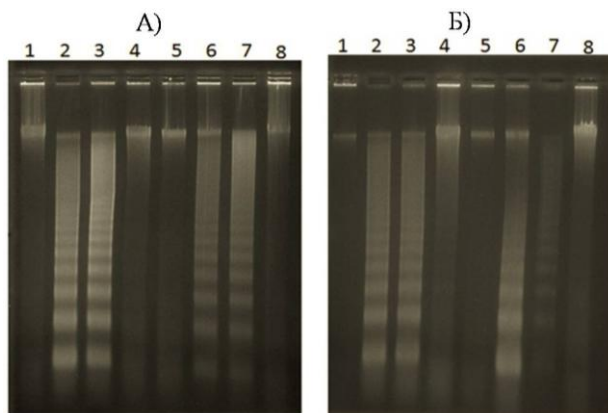


Рис. 8. Действие АТФ на интернуклеосомальное расщепление ДНК в ядрах клеток печени неполовозрелых (А) и половозрелых (Б) крыс в контроле (1-4) и через 48 ч после введения цисплатина (5-8). 1,5- ДНК выделяли через 60 мин инкубации изолированных ядер в отсутствие двухвалентных ионов; 2,6- ДНК выделяли через 60 мин инкубации в среде, содержащей двухвалентные ионы; 3,7- ДНК выделяли из ядер, инкубированных 15 мин в присутствие 1мМ АТФ и 60 мин в присутствие двухвалентных ионов; 4,8- ДНК выделяли из ядер, инкубированных 15 мин в присутствие 5мМ АТФ и 60 мин в присутствие двухвалентных ионов.

Таблица 1. Количественное содержание фрагментов ДНК (%) в ядрах клеток печени крыс, инкубированных в среде, содержащей АТФ. * - $p < 0.05$.

| Возраст крыс | Длина фрагментов ДНК | контроль | | цисплатин | |
|--------------|----------------------|-------------------------|---|-------------------------|--|
| | | 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} | 15мин 1мМ АТФ + 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} | 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} | 15мин 1 мМ АТФ + 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} |
| 6 нед. | >1000 п.о. | 25.3±1.51 | 30.2±1,8 | 32,5±1,62* | 45,2±3,16* |
| | 1000-200 п.о. | 62,3±4,75 | 63,1±3,8 | 65,1±4,94 | 53,5±4,81 |
| | <200 п.о. | 12,4±0,62 | 6,7±0,53 | 2,4±0,12 | 1,3±0.060 |
| 10 нед. | >1000 п.о. | 30,4±1,18 | 31,4±2,19 | 13,8±1,1* | 40,4±2,40* |
| | 1000-200 п.о. | 61,0±4,90 | 56,8±2,84 | 71,4±6,42 | 54,7±3,28* |
| | <200 п.о. | 8,6±0,90 | 11,8±0,70 | 14,8±1,01 | 4,9±0,34 |

После введения цисплатина в присутствие 1мМ АТФ содержание крупных фрагментов ДНК (>1000 п.о.) в ядрах клеток печени половозрелых крыс увеличивается почти в три раза, что свидетельствует об усилении ингибирующего эффекта АТФ. В ядрах клеток печени неполовозрелых крыс содержание крупных фрагментов ДНК увеличивается на 40%, 5мМ АТФ полностью подавляют процесс расщепления ДНК. Известно, что АТФ ингибирует авто-модифицирование ПАРП 1, в результате молекула фермента прочно связывается с ДНК, что приводит к маскировке линкерных участков хроматина и подавлению расщепления ДНК эндонуклеазами [Kun et al., 2004].

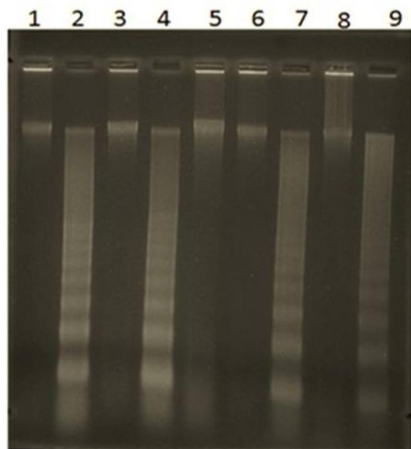


Рис. 9. Действие бензамида (БАМ) на интернуклеосомальное расщепление ДНК в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс в контроле (1-4) и через 48 ч после введения цисплатина (5-9). 1,6- ДНК выделяли через 60 мин инкубации изолированных ядер в отсутствие двухвалентных ионов; 2,7- ДНК выделяли через 60 мин инкубации в среде, содержащей двухвалентные ионы; 3,8- ДНК выделяли из ядер, инкубированных 60 мин в присутствии 20мМ БАМ; 4,9-ДНК выделяли из ядер, инкубированных 15 мин в присутствии 20мМ БАМ и 60 мин в присутствии двухвалентных ионов, 5- ДНК выделяли сразу после изолирования ядер.

Таблица 2. Количественное содержание фрагментов ДНК (%) в ядрах клеток печени крыс, инкубированных в среде, содержащей бензамид (БАМ). *- $p < 0.05$.

| Возраст крыс | Длина фрагментов ДНК | контроль | | цисплатин | |
|--------------|----------------------|-------------------------|--|-------------------------|--|
| | | 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} | 15мин 20мМ БАМ + 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} | 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} | 15мин 20мМ БАМ + 60мин Ca^{2+}/Mg^{2+} |
| 6 нед. | >1000 п.о. | 25,3±0,98 | 20,5±1,63 | 32,5±1,62* | 38,1±2,28 |
| | 1000-200 п.о. | 62,3±4,75 | 56,2±3,93 | 65,1±4,94 | 54,7±2,18 |
| | <200 п.о. | 12,4±0,62 | 23,3±1,16 | 2,4±0,12 | 7,2±0,21 |
| 10 нед. | >1000 п.о. | 30,4±1,18 | 60,4±4,80* | 13,8±1,10* | 28,7±2,01* |
| | 1000-200 п.о. | 60,6±4,90 | 31,1±1,86 | 71,4±6,42 | 62,5±5,62 |
| | <200 п.о. | 9,0±0,90 | 8,6±0,60 | 14,8±1,01 | 8,8±0,26 |

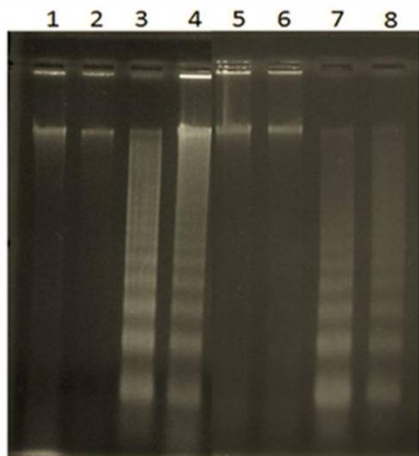


Рис. 10. Действие бензамида (БАМ) на интернуклеосомальное расщепление ДНК в ядрах клеток печени половозрелых крыс в контроле (1-4) и через 48 ч после введения цисплатина (5-8). 1,5- ДНК выделяли сразу после изолирования ядер; 2,6- ДНК выделяли через 60 мин инкубации изолированных ядер в отсутствие двухвалентных ионов; 3,7- ДНК выделяли через 60 мин инкубации в среде, содержащей двухвалентные ионы; 4,8-ДНК выделяли из ядер, инкубированных 15 мин в присутствии 20мМ БАМ и 60 мин в присутствии двухвалентных ионов.

Результаты, полученные в следующей серии экспериментов (рис.9 и 10, табл. 2), показывают, что введение 20мМ БАМ в среду инкубации изолированных ядер почти в 2 раза подавляет интенсивность интернуклеосомального расщепления ДНК в ядрах клеток печени половозрелых крыс, не действуя на интенсивность расщепления ДНК в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс.

Действие цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах тимоцитов самок и самцов крыс разного возраста. Исходя из значения ПАРП 1 для нормального лейкоцитогенеза, мы исследовали действие цисплатина на ингибирование ПАРП 1 в ядрах тимоцитов крыс. Исследования были начаты с изучения действия цисплатина на массу и морфологию тимуса крыс. Показано, что масса тимуса и рост железы в процессе полового созревания не зависят от пола животных (рис.11).

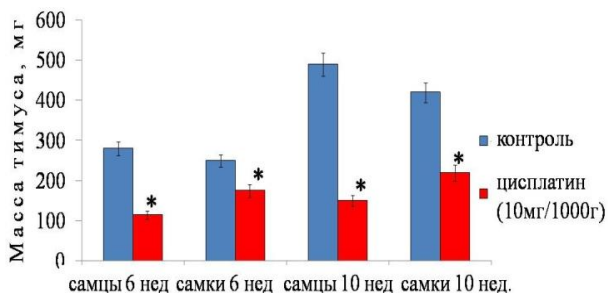


Рис. 11. Масса тимуса у крыс разного пола до и после введения цисплатина. * $p < 0.05$.

После введения цисплатина проявляется половой диморфизм в уменьшении массы железы. Исследование морфологии тимуса выявило изменения, характерные для токсической атрофии железы.

Полученные нами результаты показали, что рост железы сопровождается падением активности ПАРП 1 на 35% по сравнению с активностью фермента в ядрах тимоцитов неполовозрелых крыс.

Тимоциты являются одними из основных иммунокомпетентных клеток, и регуляция активности ПАРП 1 в этих клетках приобретает особое значение при поступлении токсических ксенобиотиков в организм. Согласно полученным результатам, после введения крысам цисплатина активность ПАРП 1 в ядрах тимоцитов неполовозрелых самцов не меняется, в то время, как активность фермента в ядрах тимоцитов самок увеличивается на 40% (рис. 12А). Аналогичное действие цисплатин оказывает на активность ПАРП 1 ядер тимоцитов самок половозрелых крыс (рис. 12Б).

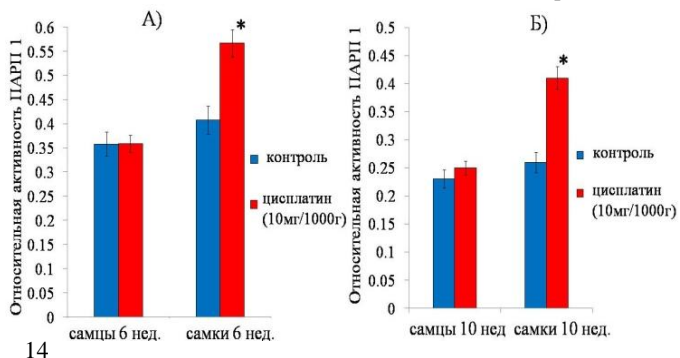


Рис. 12. Действие цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах тимоцитов самок и самцов неполовозрелых (А) и половозрелых (Б) крыс. * - $p < 0.05$.

Исходя из участия ПАРП 1 в перманентном размножении и гибели тимочитов в процессе их созревания в тимусе, нами было исследовано действие ингибиторов ПАРП 1 на активность фермента в ядрах тимочитов самок и самцов крыс разного возраста. Было показано, что ингибирующий эффект 1 мМ АТФ в ядрах тимочитов не зависит от пола животных, но уменьшается с возрастом крыс. 5 мМ АТФ полностью подавляют активность ПАРП 1 в ядрах тимочитов во всех исследованных группах крыс (рис. 13). Результаты исследований показали, что ингибирующее действие БАМ также не зависит от пола крыс. БАМ не ингибирует активность ПАРП 1 в ядрах тимочитов неполовозрелых крыс, но заметно подавляет активность фермента (на 55%) в ядрах тимочитов половозрелых крыс. Характер ингибирующего действия БАМ на активность ПАРП 1 в ядрах тимочитов крыс не меняется после введения животным цисплатина, при этом эффективность ингибитора выше в ядрах тимочитов половозрелых крыс.

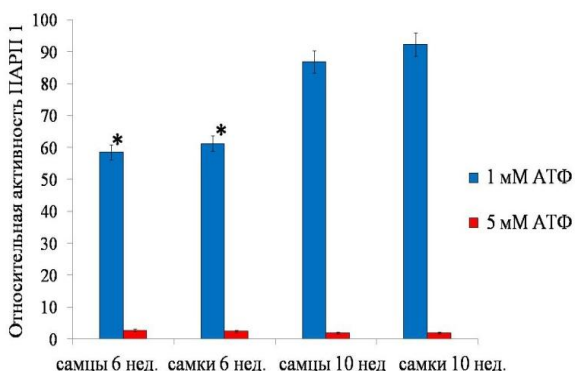


Рис. 13. Действие АТФ на активность ПАРП 1 в ядрах тимочитов неполовозрелых и половозрелых самок и самцов крыс. За 100% принята активность ПАРП 1 в ядрах, инкубированных в отсутствие АТФ. * - $p < 0.05$

После введения цисплатина неполовозрелым животным ингибирующее действие АТФ в ядрах тимочитов не меняется. Однако, цисплатин существенно увеличивает эффективность ингибитора в ядрах тимочитов самок и самцов половозрелых крыс (активность ПАРП 1 уменьшается на 45-50%, рис. 14).

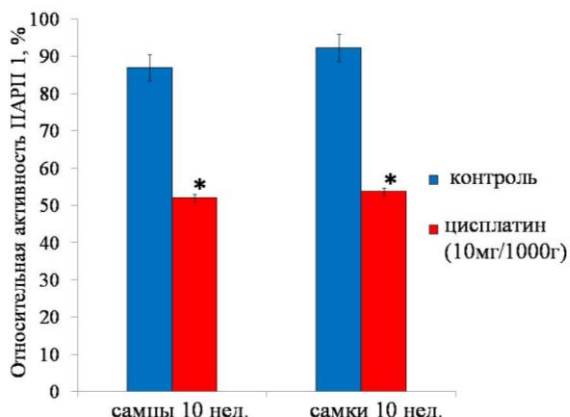


Рис. 14. Действие 1мМ АТФ на активность ПАРП 1 в ядрах тимочитов половозрелых самок и самцов через 48 часов после введения цисплатина. За 100% принята активность ПАРП 1 в ядрах, инкубированных в отсутствие АТФ. * - $p < 0.05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты наших исследований показали, что в ядрах клеток печени неполовозрелых животных проявляются половые различия активности ПАРП 1, которые исчезают в процессе полового созревания крыс (6-10 недель). В тот же период исходная активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимоцитов уменьшается в разной степени. Наблюдаемое уменьшение активности ПАРП 1 в ядрах клеток печени половозрелых крыс может быть обусловлено возрастным снижением пролиферативной активности клеток печени и переключением авто-модифицирующей активности фермента на меньшую транс-модифицирующую активность ПАРП 1.

Примечательно, что половые различия активности ПАРП 1 в ядрах клеток печени неполовозрелых крыс исчезают через 48 часов после введения животным цисплатина, наряду с резким уменьшением активности фермента. Вместе с тем, в противоположность этому, в ядрах тимоцитов цисплатин индуцирует появление половых различий активности ПАРП 1 как у неполовозрелых, так и половозрелых крыс.

Данные, накопившиеся за последнее десятилетие по применению в клинике ингибиторов ПАРП 1, указывают на то, что терапевтический эффект ингибиторов зависит от пола пациента. Однако до настоящего времени не ясно, является ли подобное проявление полового диморфизма следствием фармакогенетических различий, или оно обусловлено пол-зависимыми различиями в фармакокинетике и фармакодинамике ингибиторов ПАРП 1. Полученные нами результаты по действию ингибиторов ПАРП 1 на активность фермента в изолированных ядрах клеток печени и тимоцитов крыс разного пола и возраста позволили исключить фармакокинетические и фармакодинамические эффекты, проявляемые на уровне целостного организма.

Результаты диссертационной работы свидетельствуют о том, что действие БАМ и АТФ на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимоцитов зависит не от пола, а от возраста крыс. Вместе с тем, у неполовозрелых крыс цисплатин не действует на эффективность ингибиторов. После введения цисплатина половозрелым животным эффективность АТФ увеличивается в ядрах клеток печени и тимоцитов, эффективность БАМ в печени уменьшается, а в ядрах тимоцитов остается неизменной. Таким образом, можно заключить, что эффективность ингибирования ПАРП 1 в клетках печени половозрелых особей зависит от способа воздействия применяемого ингибитора.

Полученные в работе результаты о том, что *in vivo* действие цисплатина вызывает рост интенсивности интернуклеосомального расщепления ДНК в ядрах клеток печени половозрелых крыс, свидетельствуют о деконденсации хроматина. Примечательно, что после введения цисплатина АТФ резко подавляет процесс расщепления ДНК в ядрах клеток печени половозрелых животных. БАМ, как и АТФ, наиболее эффективно подавляет процесс интернуклеосомального расщепления ДНК в ядрах клеток печени половозрелых крыс. Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что после действия цисплатина подавление активности фермента приводит к конденсации хроматина независимо от природы ингибитора.

ВЫВОДЫ

1. Исходная активность ПАРП 1 имеет различное значение в ядрах клеток печени самок и самцов неполовозрелых крыс. В ядрах тимоцитов половой диморфизм активности ПАРП 1 не наблюдается. В процессе полового созревания животных (6-10 недель) активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимоцитов резко уменьшается, а зависящие от пола различия активности фермента исчезают.
2. Эффективность ингибирования ПАРП 1 БАМ и АТФ в ядрах клеток печени и тимоцитов зависит от возраста животных и природы ингибирования. У половозрелых (10 недельных) крыс эффективность конкурентного ингибитора БАМ увеличивается, в то время, как эффективность аллостерического ингибитора АТФ уменьшается. У половозрелых крыс превалирует транс-модифицирующая составляющая активности ПАРП 1.
3. После введения цисплатина неполовозрелым и половозрелым животным в ядрах клеток печени наблюдаются не зависящие от пола разнонаправленные изменения активности ПАРП 1. Цисплатин подавляет активность фермента неполовозрелых самцов и самок, резко активируя ПАРП 1 в ядрах клеток печени половозрелых крыс. Активирующее действие цисплатина наблюдается только в ядрах тимоцитов самок.
4. Воздействие цисплатина на эффективность ингибиторов ПАРП 1 зависит от возраста крыс. После *in vivo* действия цисплатина эффективность АТФ возрастает в ядрах клеток печени и тимоцитов половозрелых крыс, эффективность БАМ в ядрах клеток печени уменьшается, а в ядрах тимоцитов остается неизменной. У неполовозрелых крыс цисплатин не действует на эффективность ингибиторов.
5. Активация ПАРП 1 в ядрах клеток печени половозрелых крыс после *in vivo* действия цисплатина сопровождается деконденсацией хроматина, в то время, как ингибирование фермента БАМ и АТФ приводит к конденсации хроматина.
6. Введение цисплатина неполовозрелым и половозрелым крысам, независимо от пола, приводит к токсической инволюции тимуса, которая происходит путем не апоптической, а некротической гибели клеток.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Арцруни И.Г., Матинян К.С., Асатрян А.Л., Геворгян Э.С. Значение НАД⁺ и АТФ в переключении программ клеточной гибели. Сборник статей Второй Международной Научно-Практической конференции “Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине”, Санкт-Петербург, 2011, с. 68-69.
2. Асатрян А.Л., Маргарян А.В., Арцруни И.Г., Матинян К.С. Проявление половых различий в действии цисплатина на активность ПАРП 1 в ядрах клеток печени и тимоцитов крыс. Сборник тезисов 16-ой международной школы – конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пушкино, 2012, с. 92.

3. Artsruni I.G., Matinyan K.S., Asatryan A.L., Margaryan A.V., Gevorgyan E.S. Cisplatin alters chromatin structure and suppress poly(ADP-ribose)yl polymerase activity in rat liver nuclei. Book of Abstracts, International Conference “Physical Concepts Of Nucleic –Acid Structure And Behavior”, Yerevan, 2013, p. 43-44.
4. Artsruni I.G., Matinyan K.S., Asatryan A.L., Margaryan A.V., Gevorgyan E.S. Effects of insulin and hydrocortisone on DNA internucleosomal fragmentation and PARP-1 activity in rat liver and thymus cell nuclei. Book of Abstracts, International Conference “Physical Concepts Of Nucleic–Acid Structure And Behavior”, Yerevan, 2013, p. 45-46.
5. Asatryan A.L., Artsruni I.G., Matinyan K.S., Margaryan A.V., Gevorgyan E.S. Gender Differences of PARP-1 Activity in Liver. Book of Abstracts, New Aspects in Molecular Biotechnology and Biochemistry, Yerevan, 2013, p. 8.
6. Asatryan A.L., Margaryan A.V., Artsruni I.G., Matinyan K.S., Gevorgyan E.S. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) activity demonstrates gender-dependent differences in rat liver cell and thymocyte nuclei. Perspectives for development of molecular and cellular biology-4, Biol. Journal of Armenia, Suppl. 1(65), Yerevan, 2013, p. 37-38.
7. Artsruni I.G., Matinyan K.S., Margaryan A.V., Asatryan A.L., Gevorgyan E.S. Gender dependent differences in poly(ADP-ribose)polymerase-1 activity of rat liver and thymocyte nuclei, Biolog. Journal of Armenia, 4(65), 2013, p. 20-25.
8. Асатрян А.Л., Арцруни И.Г., Матинян К.С., Геворкян Э.С. Действие бензамида на активность поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 в ядрах тимоцитов крыс после введения цисплатина. 19-я Международная Пушинская Школа-Конференция Молодых Ученых «Биология - Наука XXI Века», Пушкино, 2015, с. 127-128.
9. Artsruni I.G., Asatryan A.L., Matinyan K.S., Gevorgyan E.S. Age-dependent difference in thymocyte poly(ADP-ribose)polymerase 1 inhibition after the in vivo treatment of rats with cisplatin. Biol. Journal of Armenia, 2(67), 2015, p. 46-50.
10. Ասատրյան Ա.Լ. Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվության վրա տարաբնույթ արգելակիչների ազդեցության առանձնահատկությունները տարբեր սեռի առնետների թիմոցիտների կորիզներում, Հայաստանի կենսաբան. հանդես, 1(67), 2015, p. 86-90.
11. Artsruni I., Asatryan A., Matinyan K., Gevorgyan E. Age- and sex-dependent modification of the activity and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase 1 by cisplatin in the rat thymocytes. International Journal of Chemical and Biomedical Science, 1(5), 2015, p. 103-108.
12. Асатрян А.Л., Арцруни И.Г., Матинян К.С., Геворкян Э.С. Действие цисплатина на интенсивность интернуклеосомальной фрагментации ДНК в ядрах клеток печени крыс. IV Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы науки XXI века", 2ч., Москва, 2015, с. 9-14.
13. Асатрян А.Л. Действие цисплатина на активность поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 в ядрах клеток печени крыс. XVIII Международная научно-практическая конференция "Современные концепции научных исследований", Москва, 2015, с. 8-12.
14. Асатрян А.Л., Арцруни И.Г., Матинян К.С., Геворкян Э.С. Возрастные особенности действия цисплатина на активность поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 в ядрах клеток печени крыс. 20-я Международная Пушинская Школа-Конференция Молодых Ученых «Биология - Наука XXI

Века», Пушкино, 2016, с. 169.

15. Artsruni I.G., Asatryan A.L., Matinyan K.S., Gevorgyan E.S. Cisplatin Modulates Poly(ADP-Ribosyl) Polymerase 1 Inhibition and DNA Internucleosomal Fragmentation in Rat Liver Nuclei. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v.39(2), 2016, p. 25-30.

ԱՍՏՏՐՅԱՆ ԱՆՈՒՅ ԼԵՎՈՒՒ

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

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ցիսպլատին, ՊԱՌՊ 1, ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչներ, ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորում

Աշխատանքը նվիրված է ցիսպլատինի ազդեցության ուսումնասիրությանը պոլի(ԱԿՖ-դիրոզ)պոլիմերազ 1-ի (ՊԱՌՊ 1) ակտիվության կարգավորման վրա տարբեր հասակի և սեռի առնետների լյարդի և ուրցագեղձի բջջակորիզներում: Հայտնի է, որ 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, որի արգելակիչները կիրառվում են բազմաթիվ չարորակ ուռուցքների բուժման ժամանակ: 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: Կուտակվող տվյալներն ցույց են տալիս, որ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների բուժիչ ներգործությունը տարբեր է արական և իգական սեռերի մոտ: Սեռական դիմորֆիզմի նման դրսևորումը չափազանց կարևոր խնդիր է առաջ բաշում: Այն կայանում է նրանում, որ չարորակ ուռուցքների դեղաբուժումը պետք է մշակվի, ելնելով նաև հիվանդի սեռից:

Ներկայացված հետազոտության արդյունքները ցույց են տալիս, որ ՊԱՌՊ 1-ի ելակետային ակտիվությունը կախված է կենդանիների հասակից, ընդ որում ոչ սեռահասուն առնետների լյարդի բջջակորիզներում դրսևորվում է սեռական դիմորֆիզմ, ինչը բացակայում է թիմոցիտների կորիզներում: 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 մակածում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության սեռից

կախված տարբերություններ թե՛ ոչ սեռահասուն, թե՛ սեռահասուն առնետների մոտ: Տույց 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:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ ցիսպլատինի ներարկումը տարբեր հասակի կենդանիներին թողնում է տարաբնույթ ազդեցություն 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: Տույց է տրված նաև, որ ՊԱՌՊ 1-ը, լինելով քրոմատին-կապված սպիտակուց, ոչ միայն պայմանավորում է քրոմատինի ֆունկցիոնալ ակտիվությունն, այլև մեծապես կարգավորում վերջինիս կոնֆորմացիան: Մեր ուսումնասիրության արդյունքները վկայում են, որ քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման ուժգնությունը և որակը կախված չեն առնետների սեռից: 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 *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: Ի տարբերություն ցիսպլատինի, ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային և ալոստերիկ արգելակիչները նվազեցնում են ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման ինտենսիվությունը, ինչը բնորոշ է քրոմատինի կոնդենսացված վիճակին: Տույց 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:

The impact of cisplatin on poly(ADP-ribose)polymerase 1 activity regulation in liver cell and thymocyte nuclei of rats of different age and sex

ABSTRACT

Keywords: cisplatin, PARP 1, PARP 1 inhibitors, internucleosomal DNA fragmentation

In present study we investigated the role of sex- and age-dependent variables on PARP 1 activity in rat liver cell and thymocyte nuclei after in vivo treatment of rats with cisplatin. It is widely accepted that tumorigenesis is determined by overactivation of proliferation or by misregulation of cell elimination processes. PARP 1 plays an axial role in both, thus PARP 1 inhibitors are employed in cancer treatment. Inhibition of PARP 1 in cancer cells significantly enhances the efficacy of anti-tumor therapy diminishing the doses of genotoxic and cytotoxic drugs and their side effects in healthy tissues and organs.

Mounting data evidenced that curative potential of PARP 1 inhibitors has sex-bias. This sexual dimorphic behavior arise important issue concerning the use of different regimens of pharmacotherapy of malignant tumors depending on patient sex.

The results of the present study come to show that baseline PARP 1 activity depends on the age of the animals. PARP 1 activity in liver cell nuclei of pubertal age rats (6 weeks) displays sex-dependent differences, which are absent in thymocyte nuclei. The elimination of sex-dependent differences in PARP 1 activity in liver cell nuclei is paralleled with drastic diminution of enzyme activity in young adults (10 week). In contrast, cisplatin induces sex-dependent differences in PARP 1 activity both in pubertal age and young adult rat thymocyte nuclei. It was shown, that there are no sex-dependent differences in PARP 1 inhibition by competing inhibitor benzamide and allosteric inhibitor ATP. However, well defined age-dependent differences are apparent. Competing inhibitor elicits higher efficacy in rat liver and thymocyte nuclei of young adults, while allosteric inhibitor is more efficient in pubertal age rats.

For the first time it was demonstrated that administration of cisplatin to animals of different age has opposite effect on efficacy of PARP 1 inhibition by aforementioned inhibitors. In pubertal age rats cisplatin does not affect efficacy of inhibitors, whilst in young adults it causes elevation of inhibitory efficiency of ATP both in liver cell and thymocyte nuclei. Inhibitory efficacy of competing inhibitor Bam decreases in liver cell nuclei and does not affect it in thymocyte nuclei.

Our results show, that PARP 1 which is recognized as chromatin-associated protein, regulates functional activity and conformation of chromatin. The data

revealed that intensity and character of DNA internucleosomal fragmentation in rat liver cell nuclei do not depend on sex of the rats.

Coming from the knowledge that cisplatin affects PARP 1 activity in age-dependent manner, we used only male rats of different age in our proceeding investigation. The results demonstrated that PARP 1 activation in liver cell nuclei of young adult rats treated with cisplatin is accompanied by dramatic increase in intensity of DNA internucleosomal fragmentation, evidencing chromatin loosening. In contrast to cisplatin, competing and allosteric PARP 1 inhibitors diminish intensity of DNA internucleosomal fragmentation, which is featured to chromatin condensation.

The results of present study come to show, that the DNA in thymocyte nuclei of rats treated with cisplatin does not undergo apoptotic DNA laddering. It was concluded that necrosis is engaged in degenerative changes linked to toxic atrophy of thymus rather than the apoptotic death of thymocytes.