



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(67), 2015

**ՊՈԼԻ(ԱԿՖ-ՌԻԲՈԶ)ՊՈԼԻՄԵՐԱԶ 1-Ի ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ
ՏԱՐԱԲԵՐՈՒՄՈՒՄ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՏԱՐԲԵՐ ՍԵՌԻ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ
ԹԻՍՈՑԻՏՆԵՐԻ ԿՈՐԻՉՆԵՐՈՒՄ**

Ա.Լ. ԱՄԱՏՐՅԱՆ

*Երևանի պետական լսարան, կենսաֆիզիկայի ամբիոն
anushassatryan@gmail.com*

Հետազոտվել է տարաբնույթ արգելակիչներ ԱԵՖ-ի և բենզամիդի (Բամ) ազդեցությունը պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի (ՊԱՌՊ 1) ակտիվության վրա տարբեր հասակի էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում: Հետազոտվել են կենդանիների 2 հասակային խմբեր (4-6 շաբաթական և 8-10 շաբաթական): Ցույց է տրվել, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը թիմոցիտների կորիզներում նվազում է սեռական հասունացման ժամանակ: Պարզվել է, որ ուսումնասիրվող տարիքային խմբերում ՊԱՌՊ 1-ի արգելակումն ալոստերիկ արգելակիչ ԱԵՖ-ով կախված չէ կենդանիների սեռից: Մինչդեռ պարզվել է, որ 4-6 շաբաթական առնետների թիմոցիտների կորիզներում ՊԱՌՊ 1-ը ավելի զգայուն է ԱԵՖ-ի արգելակիչ ազդեցության հանդեպ:

Ցույց է տրված, որ մրցակցային արգելակիչ Բամ-ը (20 մՄ) ցուցաբերում է ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման սեռից կախված տարբերություններ միայն 4-6 շաբաթական առնետների թիմոցիտներում: Ընդ որում նշված հասակային խմբի էգ առնետների մոտ Բամ-ի արգելակիչ ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա նվազում է 30%-ով արուների համեմատ:

*Թիմոցիտների կորիզներ – ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվություն – բենզամիդ – ԱԵՖ –
սեռական դիմորֆիզմ*

Исследовали действие ингибиторов различной природы (АТФ и бензамида-БАМ) на активность поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (ПАРП 1) в ядрах тимоцитов самок и самцов крыс двух возрастных групп (4-6 недель и 8-10 недель). Показано, что при половом созревании активность ПАРП 1 в ядрах тимоцитов уменьшается. Показано также, что подавление активности ПАРП 1 аллостерическим ингибитором АТФ не зависит от пола животных в исследованных возрастных группах. Вместе с тем выявлено, что ПАРП 1 проявляет большую чувствительность к ингибирующему действию АТФ в ядрах тимоцитов 4-6 недельных крыс. Показано, что половые различия в ингибировании ПАРП 1 конкурентным ингибитором БАМ (20 мМ) проявляются в возрастной группе 4-6 недель, причем у самок указанной возрастной группы ингибирующее действие Бам на активность ПАРП 1 уменьшается на 30%.

Ядра тимоцитов – активность ПАРП 1 – бензамид – АТФ – половой диморфизм

Impact of different poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP 1) inhibitors ATP and benzamide (BAM) on enzyme activity in thymocyte nuclei of rats from different age groups and sex was investigated. Two age groups of animals (4-6 and 8-10 old) were examined.

It was shown that PARP 1 activity in thymocyte nuclei declines during sexual maturation. PARP 1 inhibition by allosteric inhibitor ATP displays no sex-dependent differences. However, PARP 1 in thymocyte nuclei of 4-6 week-old rats is more susceptible to ATP inhibition. Competitive inhibitor BAM (20mM) elicits sex-dependent differences in enzyme inhibition only in 4-6 week-old rat thymocyte nuclei. Bam inhibition of PARP 1 in females from aforementioned age group was decreased by 30% vs level exhibited by male thymocyte nuclei.

Thymocyte nuclei – PARP 1 activity – benzamide – ATP – sexual dimorphism

ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչները ներկայումս թևակոխել են կլինիկական գործարկման փուլ, կիրառվելով մոնոթերապևտիկ և զուգակցված ֆարմակոթերապիայի ռեժիմներում գանազան հիվանդությունների բուժման ժամանակ [3,14]:

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 [13,2]:

Էզերի և արունների մոտ դեղամիջոցների կենսաքիմիական փոխակերպման (մեթաբոլիզմի) տարբերությունները կարող են կարգավորվել գեների տրանսկրիպցիայի մակարդակում: Հայտնի է, որ դեղամիջոցների փոխակերպման ֆերմենտների (ԴՓՖ-ների) և դրանց տեղափոխությունները իրականացնող փոխադրող համակարգերում գործող սպիտակուցների գեների ակտիվությունը ենթակա է սեռական հորմոնների ազդեցությանը [10]:

Դեղամիջոցների ազդեցության սեռից կախված տարբերությունները հատուկ ուշադրության են արժանի հատկապես չարորակ ուռուցքների բուժման ժամանակ: Հայտնի է, որ նորագոյացությունների բուժման ժամանակ կիրառվում են մի քանի մոտեցումներ: Դրանցից են հակամեթաբոլիտների կիրառությունը, միկրոխոլալկենների առաջացումը ճնշող, միտոքոնդրիումների կառուցվածքը խաթարող և ԴՆԹ-ի կառուցվածքը և գործունեությունը խափանող միջոցները [12]:

Հայտնի է, որ ԴՆԹ-ի վնասվածքների կամ կառուցվածքի խաթարումների ժամանակ բջջակորիզներում մոտ 500 անգամ մեծանում է պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի (ՊԱՌՊ 1) ակտիվությունը [9]: ՊԱՌՊ 1-ի հատկանշական ակտիվացումը ԴՆԹ-ի խզումներով դարձնում է պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)ացումը ԴՆԹ-ի վնասվածքների բացահայտման և հետագա վերականգնման հզոր կարգավորիչ: ՊԱՌՊ 1-ը կորիզային քրոմատին-ասոցված սպիտակուց է, եզակի ֆերմենտային հատկություններով: Հատկանշական է, որ այն ֆիզիկապես միանալով կամ ռիբոզիլացնելով ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդների և հիմքերի էքսցիզիոն ռեպարացիան (NER և BER, համապատասխանաբար) իրականացնող սպիտակուցներին, խթանում է վերականգնմանը մասնակցող գործոնների հավաքագրումը և ռեպարացիայի ամբողջ գործընթացը [3]: Ելնելով այս իրողությունից, տրամաբանական էր ենթադրել, որ ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության ճնշումը, հետևաբար ԴՆԹ-ի վերականգնման պրոցեսների խափանումը, կհանգեցնի ուռուցքային բջիջների մահվան:

Ներկայումս ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման մեխանիզմների ուսումնասիրությունը և նոր արգելակիչների մշակումը համարվում է կարևոր գործնական խնդիր: Խնդրի առանձնահատկություններից է այն, որ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակման բուժիչ ազդեցությունը կախված է սեռից:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքի ընթացքում օգտագործվել են Sigma (ԱՄՆ) ֆիրմայի ռեակտիվներ: Հետազոտվել են 4-6 և 8-10 շաբաթական էգ և արու սպիտակ առնետներ: Կորիզների անջատումը թինդոցիտներից իրագործվել է Հյուլիշի մեթոդով [5]: Կորիզների մեկուսացման միջավայրը պարունակում է հետևյալ բազադրամասերը՝ սախարոզ 0.25 Մ, Տրիս 25 մՄ pH 7.4, 60 մՄ KCl, 15 մՄ NaCl, սպերմին 0.15 մՄ և սպերմիդին 0.5 մՄ:

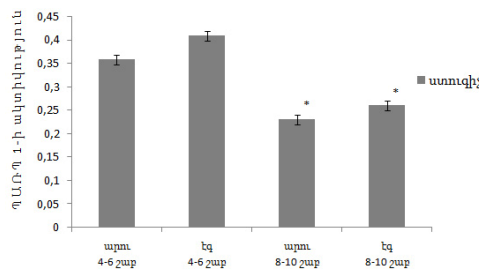
Կորիզների պարունակությունը սուսպենդիայում նորմավորվել է ըստ ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայի 1 Ն NaOH-ի լուծույթում (սպեկտրաֆոտոմետրիկ որոշում):

Պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ)պոլիմերազ 1-ի ակտիվությունը որոշվել է Փութի և համահեղինակների մեթոդով [11]: Մեթոդը հիմնված է նրա վրա, որ հիմնային միջավայրում մրջնաթթվի ներկայությամբ ՆԱԴ⁺-ը կարող է կապվել ացետոֆենոնի հետ, առաջացնելով գունավորված վերջնանյութ: Հոմոգենացման միջավայրում սուսպենդված կորիզներին (1մլ) հաջորդաբար ավելացվել են CaCl₂, MgCl₂ և ՆԱԴ⁺-ի մայրական լուծույթներից այնպիսի հաշվարկով, որ թվարկած նյութերի վերջնական կոնցենտրացիաները 1.25 մլ ռեակցիոն ծավալում կազմեն համապատասխանաբար 1 մՄ, 6 մՄ և 0.5 մՄ: Ռեակցիայի ավարտից հետո (10 րոպե, 37°C) կորիզները հեռացվում են ռեակցիոն միջավայրից ցենտրիֆուգման միջոցով: Մնացորդային ՆԱԴ⁺-ի քանակը որոշվում է 50 մկլ վերնստվածքային հեղուկում (երեքական որոշում) KOH-ի, ացետոֆենոնի և մրջնաթթվի հաջորդական ավելացումներով: Ստանդարտ նմուշը պարունակում է ՊԱՌՊ 1-ի ռեակցիոն

միջավայրի բոլոր բաղադրամասերը (CaCl_2 , MgCl_2 և ՆԱԴ^+) բացառությամբ կորիզային սուսպենզիան: ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության որոշման համար ստանդարտ նմուշի կլանումից հանվում է կորիզային սուսպենզիայի վերնատվածքային հեղուկի կլանումը: ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը սահմանվում է 10 րոպեում սպառված ՆԱԴ^+ -ի քանակով:

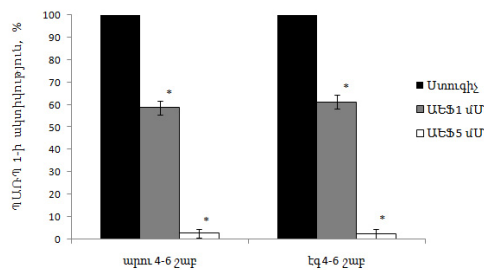
Արդյունքներ և քննարկում: Հայտնի է, որ թիմոցիտները հիմնական իմունա-կոմպետենտ բջիջներից են և դրանցում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության կարգավորումը ունի հատուկ նշանակություն, երբ օրգանիզմ են թափանցում տոքսիկ քսենոբիոտիկներ [4]:

Հետազոտությունների առաջին փուլում ուսումնասիրվել են ՊԱՌՊ 1-ի ելակետա-յին ակտիվությունները տարբեր տարիքային խմբերի էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում: Փորձնական արդյունքները ցույց տվեցին, որ երկու հասակային խմբերում էլ ֆերմենտի ակտիվությունը թիմոցիտների կորիզներում չի դրսևորում սեռական դիմորֆիզմ: Միաժամանակ պարզվեց, որ 8-10 շաբաթական առնետների թիմոցիտների կորիզներում ֆերմենտի ակտիվությունն ավելի քան 35% ավելի փոքր է 4-6 շաբաթական կենդանիների կորիզներում դիտվող ակտիվությունից (նկ. 1):

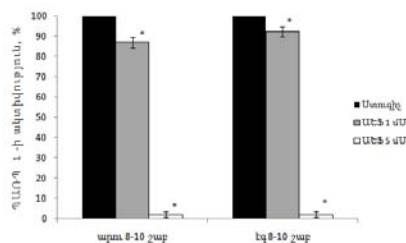


Նկ 1. ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը տարբեր տարիքային խմբերի արու և էգ առնետների թիմոցիտների կորիզներում (*- $p < 0.05$)

Հետազոտությունների հաջորդ փուլում ուսումնասիրվել է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության արգելակիչ ԱԵՖ-ի տարբեր ֆիզիոլոգիական կոնցենտրացիաների (1 և 5 մՄ) ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա երկու հասակային խմբերի արու և էգ առնետների թիմոցիտների կորիզներում: Ստացված արդյունքները ցույց տվեցին, որ 5 մՄ ԱԵՖ-ը թիմոցիտների կորիզներում լիովին արգելակում է ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունը, և նման ազդեցությունը կախված չէ կենդանիների սեռից և տարիքից (նկ. 2,3):



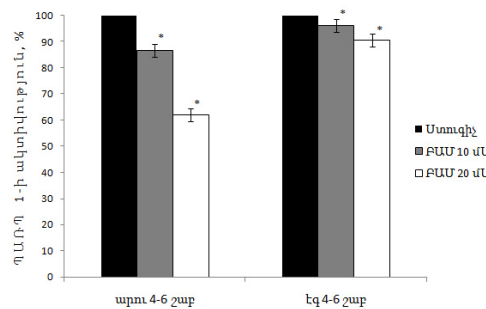
Նկ 2. ԱԵՖ-ի (1 և 5 մՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում (*- $p < 0.05$)



Նկ 3. ԱԵՖ-ի (1 և 5 մՄ) ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում (*- $p < 0.05$)

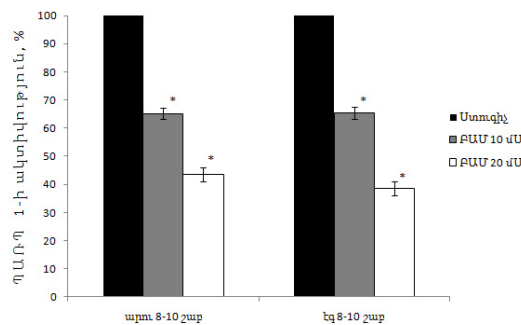
Պարզվեց, որ ԱԵՖ-ի փոքր քանակները՝ 1մՄ, շատ ավելի արդյունավետ արգելակիչ ազդեցություն են դրսևորում ոչ սեռահասուն առնետների մոտ (4-6 շաբ.) (նկ. 2): Այսպիսով, համաձայն ստացված տվյալների, ԱԵՖ -ի արգելակիչ ազդեցությունը կախված է միայն կենդանու տարիքից: Հայտնի է, որ ՊԱՌՊ 1 կորիզներում դրսևորում է տրանս- և ինքնա պոլի(ԱԿՖ-ռիբոզ) պոլիմերացման ակտիվություն [6, 7]: Ելնելով դրանից, կարելի է ենթադրել, որ 4-6 շաբաթական առնետների թիմոցիտներում գերիշխում է ՊԱՌՊ 1 ինքնառիբոզիլացնող ակտիվությունը: Մի կողմից դա պայմանավորում է ՊԱՌՊ 1 էլակետային բարձր ակտիվությունը, մյուս կողմից ավելի մեծ զգայունությունը էկզոգեն ԱԵՖ-ի նկատմամբ, քանի որ համաձայն իշխող տեսակետի, ԱԵՖ -ը ճնշում է ՊԱՌՊ 1-ի ինքնառիբոզիլացման ակտիվությունը [8]:

Բորբոքային և իշեմիկ կազությունների հետ կապված ախտածին վիճակներում ՊԱՌՊ 1-ի դեղորայքային արգելակումն ունի նպաստավոր բուժիչ ազդեցություն [1]: Ելնելով հարցի գործնական նշանակությունից, խնդիր դրվեց ուսումնասիրել ՊԱՌՊ 1-ի մրցակցային արգելակիչ՝ ԲԱՄ-ի, ազդեցությունը թիմոցիտների կորիզների ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա (նկ. 4, 5):



Նկ. 4. ԲԱՄ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա ոչ սեռահասուն էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում (*-p<0.05)

Ստացված արդյունքները վկայում են, որ ԲԱՄ-ի փոքր կոնցենտրացիան չի արգելակում ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվությունն ոչ սեռահասուն (4-6 շաբ.) առնետների թիմոցիտների կորիզներում (նկ.4): Ի հակադրություն դրան, արգելակիչի ավելի մեծ կոնցենտրացիայի (20 մՄ) ազդեցության ժամանակ ի հայտ են գալիս սեռից կախված տարբերություններ: Ոչ սեռահասուն արու կենդանիների թիմոցիտների կորիզներում 20 մՄ ԲԱՄ-ը ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը մոտ 40%-ով, զրեթե չազդելով էգերի ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա: Թեպետ ֆերմենտի արգելակման սեռական դիմորֆիզմը վերանում է 8-10 շաբաթական կենդանիների թիմոցիտների կորիզներում, վերջիններս ավելի զգայուն են ԲԱՄ-ի արգելակող ազդեցության հանդեպ (նկ. 5):



Նկ. 5. ԲԱՄ-ի ազդեցությունը ՊԱՌՊ 1-ի ակտիվության վրա սեռահասուն էգ և արու առնետների թիմոցիտների կորիզներում (*-p<0.05)

Այսպիսով, ստացված արդյունքների ամբողջությունը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ թիմոցիտների կորիզներում ՊԱՌՊ 1-ի արգելակումն ԱԵՖ-ով կախված չէ սեռից, այլ կախված է միայն կենդանու տարիքից: Էգ կենդանիների թիմոցիտներն ավելի կայուն են ՊԱՌՊ 1-ի դասական արգելակիչ ԲԱՄ-ի ազդեցության նկատմամբ: Բերված

արդյունքները կարող են կիրառական նշանակություն ունենալ ՊԱՌՊ 1-ի արգելակիչների թերապևտիկ չափաբաժինների նպատակային ընտրության համար:

This work was made possible in part by research grant from the Armenian National Science and Education Fund (ANSEF) based in New York, USA

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Beal M.F., Palomo T., Kostrzewa R.M., Archer T. Neuroprotective and neurorestorative strategies for neuronal injury”, *Neurotox Res.* 2, 2-3, 71-84, 2000.
2. Davar D., Beumer J.H., Hamieh L., Tawbi H. Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy, *Curr Med Chem.* August 1; 19, 23, 3907- 3921, 2012.
3. El-Khamisy S.F., Masutani M., Suzuki H., Caldecott K.W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, 31, 5526-5533, 2003.
4. Gui J., Mustachio L., Su D., Craig R. Thymus size and age-related thymic involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. June, 3, 3, 280-290, 2012.
5. Hewish D.R., Burgoyne L.A. The calcium dependent endonuclease activity of isolated nuclear preparations. Relationships between its occurrence and the occurrence of other classes of enzymes found in nuclear preparations. *Biochemical and Biophysical Res. Com.*, 52, 475-481, 1973.
6. Kim M.Y., Mauro S., Gevry N., Lis J.T. and Kraus W.L. NAD⁺-Dependent Modulation of Chromatin Structure and Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1. *Cell*, 119, 803-814, 2004.
7. Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J., Ordahl Ch.P. Regulation of the Enzymatic Catalysis of Poly(ADP-ribose) Polymerase by dsDNA, Polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, Histones H1 and H3, and ATP. *Biochemistry*, 43, 210-216, 2004.
8. Kun E., Kirsten E., Hakam A., Bauer P., Mendeleyev J. Identification of poly(ADP-ribose)polymerase-1 as the OXPHOS-generated ATP sensor of nuclei of animal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 568-573, 2008.
9. Luo X., Kraus L., On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1, *Genes & Development*, 26, 417-432, 2012.
10. Mabley J., Horvath E., Murthy K., Zsengeller Z., Vaslin A., Benko R., Kollai M., and Szabo C. Gender Differences in the Endotoxin-Induced Inflammatory and Vascular Responses: Potential Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, JPET, 315, 2813-2820, 2005.
11. Putta K.S. and Hergenrother P.J. 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. *Analytical Biochemistry*, 326, 78-86, 2004.
12. Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Gallardo-Perez J. C., Carreno-Fuentes L., Moreno-Sanchez R., Targeting of cancer energy metabolism *Mol. Nutr. Food. Res.* 53, 29-48, 2009.
13. Soldin O., Chung S., Mattison D. Sex Differences in Drug Disposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 2011.
14. Szabo C., Pacher P., Swanson R.A. Novel modulators of poly(ADP-ribose)polymerase. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 12, 626-630, 2006.

Ստացվել է 17.12.2014