

*Կենսաբանություն*

УДК 577.152.277+577.175.722

Մ. Ա. ՍԵԼՆԻԿՈՎԱ-ՇԱՐՈՎԱ, Տ. Ռ. ԹՈՐԳՈՄՅԱՆ, Ա. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ,  
Ա. Գ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Լ. Ա. ԱԹԱՆԵՍՅԱՆ, Է. Գ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

**ԻՆՍՈՒԼԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴՆԹ-Ի ՕԼԻԳՈՆՈՒԿԼԵՈՍՈՍԱՅԻՆ  
ՖՐԱԳՄԵՆՏԱՎՈՐՄԱՆ ՎՐԱ ՈՒՐՑԱԲԶԻՋՆԵՐԻ ԿՈՐԻՋՆԵՐՈՒՄ**

**Ներածություն:** Բարձրակարգ կենդանիների հոմեոստազի պահպանումը անհնար է առանց իմունային և էնդոկրինային համակարգերի ներդաշնակ փոխազդեցության: Առաջնային իմունային օրգանների նորմալ գործունեությունը վերահսկվում է բազմաբնույթ հորմոնների համաձայնեցված փոխազդեցությամբ:

Ինչպես հայտնի է, ուրցաբջջների յուրահատկությունը ձեռք է բերվում ուրցագեղձում՝ ապոպտոզի միջոցով իրականացվող բջջային սելեկցիայի ճանապարհով: Ապոպտոզին բնորոշ կարգավորված մորֆոլոգիական փոփոխությունների հիմքում ընկած են որոշակի կենսաքիմիական ռեակցիաներ: Ըստ ձևավորված պատկերացումների՝ ապոպտոզի եզրափակիչ կորիզային փուլում քրոմատինը ճեղքավորվում է ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային հատվածներում [1]: Նման ճեղքավորման արդյունքում գոյանում են բնորոշ օլիգոնուկլեոսոմային ֆրագմենտներ, որոնք ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզային բաժանման ժամանակ երևակվում են ապոպտիկ «սանդղակ»-ի տեսքով [2]: Ենթադրվում է, որ ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոսոմային ճեղքավորումը իրականացնող կորիզային էնդոնուկլեազները խթանվում են մահացող բջջի ցիտոպլազմայում ի հայտ եկող և դեպի կորիզ տեղափոխվող տարաբնույթ ազդակներով [3–5]:

Ներկայացվող աշխատանքում ուսումնասիրվել է ուրցաբջջների կորիզային ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա ինսուլինի *in vivo* ազդեցությունը ներարկումից 1 և 4 ժամ հետո:

**Հետազոտության մեթոդները:** Աշխատանքում օգտագործվել են «Sigma» (ԱՄՆ) ֆիրմայի ռեակտիվները: Որպես փորձարարական կենդանիներ օգտագործվել են 10-շաբաթական սպիտակ արու առնետներ: Կենդանիները գլխատվել են ինսուլինի ենթամաշկային ներարկումից 1 և 4 ժամ հետո: Ներարկվել է հորմոնի ջրային լուծույթը՝ 2 միավոր/100 գ կենդանու զանգվածի հաշվարկով: Ինսուլինի ներարկումից 15 րոպե առաջ առնետներին ներարկվել է գլյուկոզի լուծույթ այն հաշվարկով, որ նրա կոնցենտրացիան արյան մեջ կազմի մոտ 0,12%:

Կորիզների անջատումն առնետների ուրցագեղձից իրականացվել է ըստ Հյուիշի [6]: Հոմոգենացման միջավայրը կազմվել է 0,25 Մ սախարոզի լուծույթից 25 մՄ *Sphu*-ում՝ pH 7,4: Բուֆերային լուծույթը պարունակել է 60 մՄ KCl, 15 մՄ NaCl, 0,15 մՄ սպերմին և 0,5 մՄ սպերմինոլ (լուծույթ Ա):

Ուրցաբջջիջների մեկուսացված կորիզներից պատրաստվել է կախույթ Ա լուծույթում: Կորիզների խտությունը կախույթում համահավասարեցվել է ըստ ԴՆԹ-ի պարունակության: Կորիզային կախույթը բաժանվել է առանձին նմուշների (100 մկլ ծավալով), որոնք ինկուբացվել են 37<sup>0</sup>C-ում 24 ժամվա ընթացքում:

Կորիզային ԴՆԹ-ն անջատվել է կորիզների տարրալուծումից հետո: Այդ նպատակով կորիզային կախույթներին ավելացվել է 3-ական մլ տարրալուծող հեղուկ (10 մՄ *Sphu*, pH 8,0; 10 մՄ էթիլենդիամինտետրաքաջախաթթու (EDTA); 0,5% սոդիումի դոդեցիլսուլֆատ (SDS)): Կորիզային ԴՆԹ-ները քայքայվել են A ռիբոնուկլեազով (20 մկգ/մլ, 30 րոպ, 37<sup>0</sup>C): Տարրալուծված կորիզների սպիտակուցային զանգվածը անջատվել է քացախաթթվական ամոնիակի խիտ աղային լուծույթով (վերջնական կոնցենտրացիան 2,5 Մ): ԴՆԹ-ն անջատվել է սպիտակուցազրկված վերնստվածքից իզոպրոպիլ սպիրտի միջոցով (սպիրտի վերջնական կոնցենտրացիան՝ 60–75%): ԴՆԹ-ն լուծվել է համապատասխան լուծիչում (10 մՄ *Sphu*, pH 8,0; 1 մՄ EDTA):

ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզային բաժանումը կատարվել է 1,8% ազարոզի ժելում (8 վ/սմ լարման դաշտում):

Ֆրագմենտների հարաբերական պարունակության որոշումը իրականացվել է համակարգչային խտաչափական եղանակով (FujiFilm Image Gauge v.4 ծրագրով): Հոդվածում ներկայացված են 5 անկախ փորձերի արդյունքում ստացված տիպիկ էլեկտրաֆորեզագրերը համապատասխան հաշվարկներով:

**Արդյունքները և նրանց քննարկումը:** Կորիզային ԴՆԹ-ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորումը ուրցաբջջիջների ապոպտոզի եզրափակիչ փուլում ողջ ապոպտիկ գործընթացի ամենաբնորոշ դրսևորումն է: Ինչպես հայտնի է, այս կենսաքիմիական ռեակցիան ուրցաբջջիջների կորիզներում հանդիսանում է զանազան ապոպտիկ ճանապարհների առաջացման պատճառ [7]: Ըստ իշխող տեսակետի՝ ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոսոմային ճեղքավորումը ապոպտիկ բջջիջների կորիզներում իրականացնող էնդոնուկլեազների ակտիվությունը կարող է վերահսկվել կամ ցիտոպլազմայից ներմուծված կասպազ-3-ով [8, 9], կամ Ca<sup>+2</sup> իոնների աճող ներհոսքով կորիզ [10, 11]: Միտոքոնդրիումային ապոպտիկ ճանապարհին բնորոշ է նաև ներկորիզային ԴՆԹ-ի ճեղքավորումը էնդոնուկլեազ-G-ով, որը կորիզ է տեղափոխվում քայքայված միտոքոնդրիումներից [4]:

Մեր կողմից կատարված ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ քրոմատինի օլիգոնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորումը ուրցաբջջիջների կորիզներում կարող է խթանվել առանց վերը նշած ցիտոպլազմային որևէ գործոնի: ԴՆԹ-ի օլիգոնուկլեոսոմային ճեղքավորումը ուրցաբջջիջներից անջատված կորիզներում սկսվում է ինկուբացիայից 6–8 ժամ հետո (նկ. 1), և ինկուբացիայի տևողության մեծացմանը զուգընթաց դիտվում է ֆրագմենտավորման պրոցեսի խորացում: Վերջինս արտահայտվում է ԴՆԹ-ի 1000 գ.ն. ից

մեծ ֆրագմենտների քանակի նվազումով և 200 զ.ն. ֆրագմենտների պարունակության կտրուկ աճով (աղյ. 1):

Աղյուսակ 1

ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների տոկոսային պարունակության արժեքները էլեկտրաֆորեսիկ բաժանումից հետո

Էլեկտրաֆորեսիկ տոկոսային համարը	0 ժ	2 ժ	4 ժ	6 ժ	8 ժ	12 ժ	16 ժ	24 ժ
1 (>1000 զ.ն.)	100	100	100	92,86	88,82	77,76	71,18	36,69
2 (>500 զ.ն.)	–	–	–	1,07	1,14	0,97	0,40	0,84
3 (500 զ.ն.)	–	–	–	1,49	1,01	1,72	0,98	1,63
4 (400 զ.ն.)	–	–	–	2,85	1,19	2,14	1,53	3,00
5 (300 զ.ն.)	–	–	–	1,74	1,90	3,33	2,53	5,32
6 (200 զ.ն.)	–	–	–	2,56	5,94	14,08	23,38	52,52

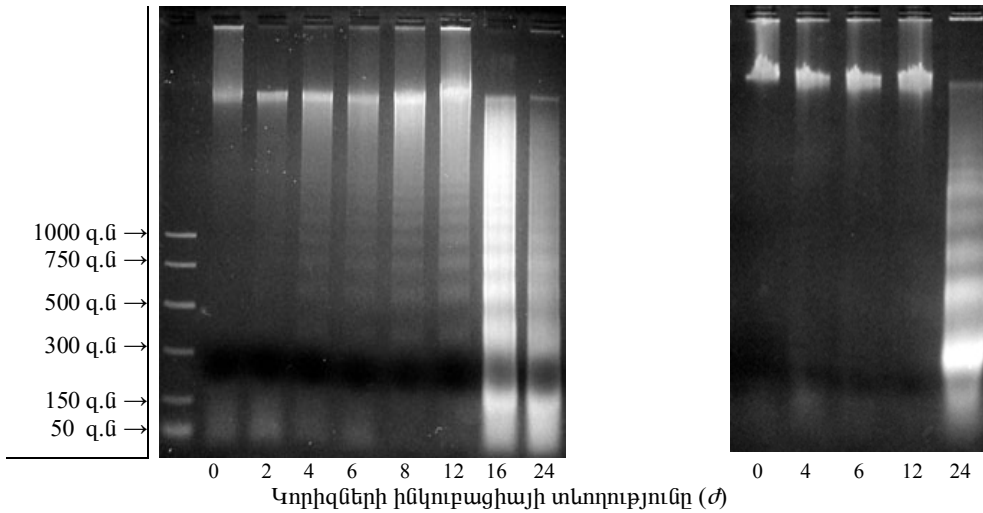
Աղյուսակ 2

Ինսուլինի ազդեցությունից հետո ուրցաբջջների կորիզներում դիտվող ԴՆԹ-ի օլիգո-նուկլեոտոմային ֆրագմենտների տոկոսային պարունակությունը ինկուբացիայից 24 ժամ հետո

Շերտի համարը և ֆրագմենտի մեծությունը	Ստուգիչ	Ինսուլինի ներարկումից 1 ժ հետո	Ինսուլինի ներարկումից 4 ժ հետո
1 (>1000 զ.ն.)	21,74	56,22	38,94
2 (>500 զ.ն.)	5,16	10,58	8,93
3 (500 զ.ն.)	8,28	15,41	13,43
4 (400 զ.ն.)	12,83	11,17	28,76
5 (300 զ.ն.)	20,72	6,62	9,95
6 (200 զ.ն.)	24,17	–	–
7 (100 զ.ն.)	7,11	–	–

Ինչպես հետևում է աղյ. 2-ում բերված տվյալներից, ինսուլինի ներարկումից 1 ժամ հետո ուրցաբջջներից անջատված կորիզներում դիտվող օլիգո-նուկլեոտոմային ֆրագմենտների (300 զ.ն.) քանակը փոքր է ստուգիչ կենդանիների համապատասխան ցուցանիշից ավելի քան 3 անգամ, իսկ բարձրապոլիմերային ֆրագմենտներինը (1000 զ.ն.-ից մեծ) գերազանցում է ստուգիչ տարբերակի նույն ցուցանիշը 2,5 անգամ: Ավելի կարճ ֆրագմենտները, որոնք համապատասխանում են մոնոնուկլեոտոմային ֆրագմենտներին, բացակայում են այն կորիզներում, որոնք անջատվել էին ուրցաբջջներից ինսուլինի ներարկումից հետո: Այս տվյալները քանակապես արտահայտում են այն փոփոխությունները, որոնք դիտվում են ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեսային բաժանման պատկերում (նկ. 2): Ինչպես երևում է նկ. 2-ից, ինսուլինի ներգործությունից հետո տեղի է ունենում ֆրագմենտավորման պրոցեսի մեկնարկի ուշացում: Ինսուլինի ներգործությունից 4 ժամ հետո դիտվում է հորմոնի արգելակող ազդեցության նվազում ԴՆԹ-ի ֆրագմենտավորման վրա, քանզի նվազում է բարձրապոլիմերային ֆրագմենտների քանակը: Վերջինս թեև մոտ 80%-ով

մեծ է ստուգիչ տարբերակի ֆրագմենտների քանակից, այնուամենայնիվ նկատելիորեն փոքր է ինսուլինի ներարկումից 1 ժ հետո դիտվող ցուցանիշից:



Նկ. 1: Գ-ՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտոմային ֆրագմենտավորման դինամիկան քիմոցիտների մեկուսացված կորիզներում:

Նկ. 2: Գ-ՆԹ-ի օլիգոնուկլեոտոմային ֆրագմենտավորման դինամիկան քիմոցիտների կորիզներում: Կորիզներն անջատվել են ինսուլինի ներարկումից 4 ժ հետո:

Ինչպես հետևում է ստացված տվյալների վերլուծությունից, ինսուլինի *in vivo* ազդեցության վաղ շրջանում (1 և 4 ժամ հետո) ուրցաբջջիցներից անջատված կորիզները ավելի կայուն են դառնում՝ դրսևորելով օլիգոնուկլեոտոմային ֆրագմենտավորման հանդեպ քրոմատինի կայունացման միտում:

Ինսուլինի արգելակիչ ազդեցությունը քրոմատինի օլիգոնուկլեոտոմային ֆրագմենտավորման վրա կարող է մասամբ պայմանավորել ինսուլինի հակաապոպտիկ ազդեցությունը ուրցաբջջիցների վրա:

**Եզրակացություն:** Կենսական գործոնների բացակայությունը ուրցաբջջիցների կորիզների ինկուբացիայի միջավայրում խթանում է քրոմատինի օլիգոնուկլեոտոմային ֆրագմենտավորումը: Սա վկայում է քրոմատինի ճեղքավորման կորիզային ինքնավար համակարգի գոյության մասին:

Ինսուլինի 1 և 4 ժամ *in vivo* ազդեցության հետևանքով (ազդեցության վաղ փուլում) ուրցաբջջիցներից անջատված կորիզները ավելի կայուն են դառնում կենսական գործոնների բացակայության դեպքում, ինչը պայմանավորվում է քրոմատինի օլիգոնուկլեոտոմային ֆրագմենտավորման ցածր ինտենսիվությամբ: Մեր կողմից ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ ինսուլինի հակաապոպտիկ ազդեցության հիմքում կարող է ընկած լինել հորմոնի արգելակող ազդեցությունը ապոպտոզի կորիզային փուլի վրա:

Կենսաֆիզիկայի ամբիոն

Ստացվել է 24.05.2007

#### Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1. **Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D.** – J. Pathology, 1984, v. 142, p. 67–77.
2. **Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H.** – Cell Death Differ, 2003, v. 10, p. 108–116.
3. **Zhang J., Xu M.** – Trends in Cell Biology, 2002, v. 12(2), p. 84–49.
4. **Widlak P., Garrard W.T.** – J. Cellular Biochemistry, 2005, v. 94, p. 1078–1087.
5. **Samejima K., Earnshaw W.C.** – Nature Reviews Mol. Cell Biology, 2005, v. 6, p. 677–688.
6. **Hewis D.R., Burgoyne L.A.** – Biochemica and Biophysical Res. Com., 1973, v. 52, № 2, p. 504–510.
7. **Schwartzman R.A., Cidlowski J.A.** – Endocrine Reviews, 1993, v. 14, p. 133–151.
8. **Widlak P., Li P., Wangi X., Garrard W.** – J. Biol. Chem., 2000, v. 275, p. 8226–8232.
9. **Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwatsu A., Nagata S.** – Nature, 1998, v. 391, p. 43–50.
10. **Shiokawa D., Tanuma S.** – J. Biochemistry, 2001, v. 40, p. 143–152.
11. **Yakovlev A.G., Wang G., Stoca B.A., Baulares H.A., Spoode A.Y., Yoshihara K., Smulson M.E.** – J. Biol. Chem., 2000, v. 275, p. 21302–21308.

М. А. МЕЛЬНИКОВА–ШАРОВА, Т. Р. ТОРГОМЯН, А. В. МАРГАРЯН, А. Г. ГАЛСТЯН,  
Л. А. АТАНЕСЯН, Э. Г. САРГСЯН

### ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА НА ОЛИГОНУКЛЕОСОМАЛЬНУЮ ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК В ЯДРАХ ТИМОЦИТОВ

#### Резюме

Известно, что действие инсулина вызывает увеличение вилочковой железы (тимуса) крыс и рост количества свободных тимоцитов в их крови. Предполагается, что эти явления обусловлены антагонизмом, который проявляется во взаимодействии инсулина с глюкокортикоидами при регуляции апоптоза.

В настоящей работе исследовалось действие инсулина на ключевую апоптическую реакцию в тимоцитах – на процесс олигонуклеосомального расщепления хроматина в ядрах. Было показано, что такое расщепление ДНК в изолированных ядрах тимоцитов может осуществляться без участия апоптических цитоплазматических индукторов. Результаты исследований показали, что олигонуклеосомальная фрагментация ДНК в ядрах тимоцитов крыс резко подавляется на ранней стадии действия инсулина. Полученные данные позволяют выдвинуть предположение о том, что в основе антиапоптического действия инсулина может лежать ингибирующее действие гормона на расщепление хроматина в ядрах тимоцитов.

M. A. MELNIKOVA–SHAROVA, T. R. TORGOMYAN, A. V. MARGARYAN,  
A. G. GALSTYAN, L. A. ATANESYAN, E. G. SARGSYAN

### INSULIN ACTION ON OLIGONUCLEOSOMAL DNA FRAGMENTATION IN THYMOCYTE NUCLEI

#### Summary

It is established that insulin induces overgrowth of rat thymic gland and elevation of free thymocytes in blood. It is assumed that insulin can antagonize

pro-apoptotic effect of glucocorticoids and this underlies mentioned events.

In present study we examined the effect of insulin on the key apoptotic process in thymocytes – oligonucleosomal DNA fragmentation in nuclei.

It was shown, that oligonucleosomal DNA fragmentation in isolated thymocyte nuclei could be performed without involvement of well-known inducers that are generated in apoptotic cytoplasm. According to our data in early stages of insulin treatment (1 and 4 h after administration), hormone suppresses the oligonucleosomal DNA fragmentation in rat thymocyte nuclei. Coming from these data a supposal was derived that anti-apoptotic effect of insulin could be mediated by hormone-induced suppression of the key nuclear apoptotic event in thymocytes – the oligonucleosomal DNA fragmentation.