



*Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •  
Experimental and Theoretical articles*

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3 (60), 2008

**ԻՆՍՈՒԼԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ  
ԻՆՏԵՐՆՈՒԿԼԵՍՈՍՄԱՅԻՆ ՃԵՂՔԱՎՈՐՄԱՆ ՎՐԱ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ  
ԼՅԱՐԴԻ ԲԶՋԱԿՈՐԻՉՆԵՐՈՒՄ**

**Ի.Գ. ԱՐՄՐՈՒՆԻ, Կ.Ս. ՄԱՏԻՆՅԱՆ,  
Ս.Ա. ՄԵԼՆԻԿՈՎԱ-ՇԱՐՈՎԱ, Է.Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ**

*Երևանի պետական համալսարան, կենսաբանության ֆակուլտետ, կենսաֆիզիկայի ամբիոն  
E-mail: gana@ysu.am*

Հետազոտվել է ինսուլինի ազդեցությունը քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման վրա առնետների լյարդի բջջակորիզներում: Ցույց է տրվել, որ ինսուլինի ազդեցությունից 4 ժ հետո տեղի է ունենում քրոմատինի կոնդենսացում, որն արտահայտվում է քրոմատինի մատչելիության նվազմամբ էկզոգեն ԴՆԱզ 1-ի և ներկորիզային  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -կախյալ էնդոնուկլեազների համար: Քրոմատինի կոնֆորմացիայի նման փոփոխությունը կարող է խոչընդոտել ապոպտիկ  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -կախյալ էնդոնուկլեազի ազդեցությանը և արգելակել հետագա կորիզային ապոպտիկ պրոցեսների զարգացումը:

*Ինսուլին-քրոմատին-ԴՆԱզ1-ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորում*

Исследовалось действие инсулина на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени крыс. Показано, что через 4 ч после введения гормона происходит конденсация хроматина, что выражается в уменьшении доступности хроматина для экзогенной ДНазы 1 и внутриядерных  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -зависимых эндонуклеаз. Подобные конформационные изменения хроматина могут препятствовать действию апоптической  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -зависимой эндонуклеазы, тем самым подавляя дальнейшие апоптические процессы в ядрах.

*Инсулин – хроматин - ДНазы 1 – интернуклеосомальное расщепление*

The role of insulin on chromatin internucleosomal cleavage in rat liver cell nuclei was investigated. It was shown that in 4 h hormone injection rat liver nuclei chromatin was more condensed and less accessible for exogenously applied DNase 1 and intranuclear  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -dependent endonuclease. This conformational transition is capable to suppress chromatin internucleosomal cleavage by apoptotic  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -dependent endonuclease and eventually apoptotic developments in nuclei.

*Insulin – chromatin - DNase 1 - internucleosomal cleavage*

Բազմաթիվ ներդրեզներատիվ, ուռուցքային և աուտոիմունային հիվանդությունների հիմքում ընկած է բջջային հոմեոստազի խախտումը: Հիվանդագին զարգացումների արգելակման համար արդիական է նոր հակաապոպտիկ միջոցների բացահայտումը և դրանց գործունեության մեխանիզմների պարզաբանումը:

Վնասված, ծերացած կամ ավելորդ բջիջների մահը ֆիզիոլոգիական պայմաններում իրականանում է ապոպտոզի միջոցով: Շուրջ 20 տարի ապոպտոզի ուսումնասիրությունների ճնշող մեծամասնությունը նվիրված էր պրոցեսի խթանիչների և այն ներբջջային կարգավորիչների բացահայտմանը, որոնք պատասխանատու են անդարձելի փուլի՝ քրոմատինի ֆրագմենտավորման համար: Հայտնի է, որ քրոմատինի ֆրագմենտավորման արգելակումը կորիզներում հանգեցնում է ցիտոպլազմատիկ ապոպտիկ երևույթների հետընթացին և բջիջների կենսունակության մեծացմանը:

Ինսուլինը և ինսուլինանման պոլիպեպտիդները բազմաթիվ բջջային համակարգերում գոյատևման և աճի հիմնական գործոններից են: Վերջին տասնամյակում կուտակված գիտական տվյալները վկայում են, որ ինսուլինը կարող է դրսևորել նաև հզոր հակաապոպտիկ ազդեցություն:

Լյարդի բջջակորիզներում ինսուլինը առաջ է բերում զանազան ենթակառուցվածքների ֆոսֆոլիպիդային կազմի փոփոխություն [1,3]: Այդ փոփոխությունները կորիզաթաղանթում, կորիզային մատրիքում և քրոմատինում կարող են փոխել ներկորիզային ապոպտիկ զարգացումների ընթացքը, ազդելով բջջային ապոպտոզի ողջ գործընթացի վրա:

Ներկայացված աշխատանքում հետազոտվել է ինսուլինի ազդեցությունը կորիզային ապոպտոզի բնորոշ երևույթի՝ քրոմատինի ֆրագմենտավորման պրոցեսի վրա:

**Նյութ և մեթոդ:** Աշխատանքի ընթացքում օգտագործվել են Sigma (ԱՄՆ) ֆիրմայի ռեակտիվներ: Հետազոտվել են 4-6 շաբաթական սպիտակ առնետներ: Հոդվածում ներկայացված են 12 անկախ փորձերի (24 առնետ) տվյալները:

Կենդանիները զլխատվել են ինսուլինի ենթամաշկային ներարկումից 4 ժ հետո: Հորմոնը ներարկվել է ջրային լուծույթի ձևով՝ 2 միավոր/100 գ կենդանու զանգվածի հաշվարկով: Ինսուլինի ներարկումից 15 ր առաջ առնետներին ներարկվել է գլյուկոզի լուծույթ այն հաշվարկով, որ գլյուկոզի կոնցենտրացիան արյան մեջ կազմի մոտ 0,12 %:

Լյարդի բջջակորիզների անջատումը կատարվել է Հյուլիշի մեթոդով [4]: Հումոզենացման միջավայրի բաղադրության մեջ մտնում էր՝ 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:

Հետազոտվող նմուշներում կորիզային սուսպենզիայի խտությունը նորմավորվել է ըստ 0,1N NaOH-ում լուծված նմուշների օպտիկական խտության: Համապատասխան նոսրացումներից հետո հոմոզենացման միջավայրում սուսպենզված կորիզները (0,1մլ) ինկուբացվել է 37<sup>0</sup>-ում տարբեր տևողությամբ:

Կորիզների ինկուբացիայի հետ կապված համապատասխան փորձարարական գործողություններից հետո, հետազոտվող նմուշների վրա ավելացվել է 3 մլ տարալուծող լուծույթ՝ 0,5 Մ Տրիս pH 8; 0,5 Մ EDTA; 0,8% SDS: Կորիզների տարալուծումից հետո բոլոր նմուշները մշակվել են ՌՆՎ A-ով (20 մկգ/մլ) 30 րոպե տևողությամբ 37<sup>0</sup>-ում: Սպիտակուցները հեռացվել են 7,5 Մ ամոնիումի ացետատի ավելացումով, նմուշում աղի վերջնական կոնցենտրացիան կազմել է 2,5 Մ: ԴՆԹ-ի անջատումը լուծույթից կատարվել է սառեցված իզոպրոպիլ սպիրտի ավելացումով մինչև 60-75% վերջնական կոնցենտրացիան: ԴՆԹ-ի ձևավորված նստվածքը անջատվել է ցենտրիֆուգումով 10000 g 15 ր, լվացվել է էթանոլով (70%) և լուծվել TE-ում (Տրիս 10 մՄ, pH 8; 1 մՄ EDTA):

ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզը կատարվել է 1,8%-ոց ագարոզային ժելում TBE-ում (Տրիս 100 մՄ, pH 8; 0,89 Մ բորաթթու; 0,02 Մ EDTA) 8 Վ/սմ դաշտի լարվածության պայմաններում: ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների երևակման համար ժելը ինկուբացվել է ֆլուորեսցենտային ներկի (էթիդիում բրոմիդ 0,5 մկգ/մլ) լուծույթում: Ներկի ավելցուկը հեռացվել է լվացումով:

Էթիդիումի բրոմիդով գունավորման ինտենսիվությունը հանդիսանում է հետազոտվող նմուշում ֆրագմենտավորված ԴՆԹ-ի հարաբերական պարունակության ցուցանիշ: Ֆրագմենտների հարաբերական պարունակության որոշումը կատարվել է ժելի թվային լուսանկարի նեգատիվ պատկերի միջոցով համակարգչային FUJIFILM, Image Gauge V 0.4 ծրագրով:

Քրոմատինի ԴՆՎ I զգայունությունը որոշելու համար օգտագործվել է ԴՆԹ-ի թթվալուծ ֆրագմենտների առաջացման կինետիկայի վերլուծությունը [2]:

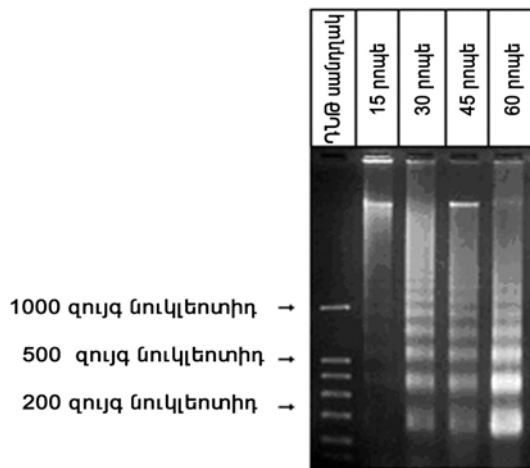
Թթվալուծ նուկլեոտիդների քանակը որոշվում է յուրաքանչյուր 5 րոպե ժամանակահատվածից հետո 30 րոպեների ընթացքում: Թթվալուծ նուկլեոտիդների քանակը որոշվել է ըստ օպտիկական կլանման (260 նմ): ԴՆԹ-ի հիդրոլիզի թթվալուծ ֆրագմենտների քանակության փոփոխությունը հաշվարկվել է 0-ական նմուշի նկատմամբ օպտիկական խտության տոկոսային ավելացմամբ:

**Արդյունքներ և քննարկում:** Հիվանդագին զարգացումների արգելակման անհրաժեշտությունը արդիականացնում է հակաապոպտիկ մի-ջոնների հայտնաբերման և դրանց գործունեության մեխանիզմի բացահայտման խնդիրը: Ինսուլինի ադեցության վաղ շրջանում իրականացող մոլեկուլային իրադարձությունների շղթան բավականին ուսումնասիրված է, ինչը թույլ է տալիս ձևավորել հորմոնային ազդակի ռեցեպցիայի համալիր պատկերը: Ինչպես ցույց են տալիս բազմաթիվ հետազոտությունների արդյունքները, ապոպտոզը բարդ բազմափուլ գործընթաց է, որի յուրաքանչյուր փուլը կարող է վերահսկվել ուրույն մեխանիզմով [5]: Ելնելով այս պատկերացումներից կարելի է ենթադրել, որ ինսուլինի ներգործությունը ապոպտիկ պրոցեսների վրա կարող է իրականանալ գործընթացի ցանկացած փուլում, այդ թվում և կորիզային: Հայտնի է, որ առանցքային ապոպտիկ փոփոխությունը կորիզներում դա քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումն է [6]:

Քրոմատինի կոնֆորմացիայի և մատչելիության գործոնը կարևոր նշանակություն ունի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման իրագործման համար:

Ելնելով դրանից, մենք խնդիր դրեցինք ուսումնասիրել քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորումը էնդոգեն  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -կախյալ էնդոնուկլեազով այն կորիզներում, որոնք անջատվել էին ստուգիչ կենդանիների և ինսուլինի ազդեցությանը ենթարկված առնետների լյարդից:

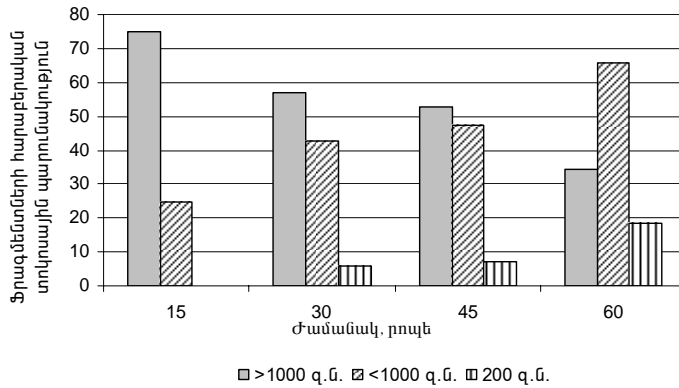
Հայտնի է, որ *in vitro* պայմաններում, երբ մեկուսացված կորիզների ինկուբացիայի միջավայր են ներմուծվում  $Ca^{+2}$  և  $Mg^{+2}$  իոններ, կորիզներում ակտիվանում է լատենտ  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -կախյալ էնդոնուկլեազն և մոտավորապես 15 րոպե հետո ֆերմենտի խթանումը դրսևորվում է քրոմատինի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման տեսքով (նկ. 1):



**Նկ. 1.** ԴՆԹ-ի ֆրագմենտավորումը լյարդի մեկուսացված բջջակորիզներում:

Ինկուբացիայի տևողության մեծացումը հանգեցնում է ֆրագմենտավորման ինտենսիվության մեծացմանը: 60 րոպե հետո 1000 գ.ն.-ից մեծ ֆրագմենտների պարունակությունը նվազում է, իսկ 200 գ.ն. ֆրագմենտներինը՝

աճում շուրջ 1,5 անգամ: Ֆրագմենտների պարունակության նման դինամիկան վկայում է  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -կախյալ էնդոնուկլեազի աճող ակտիվության մասին (նկ. 2):

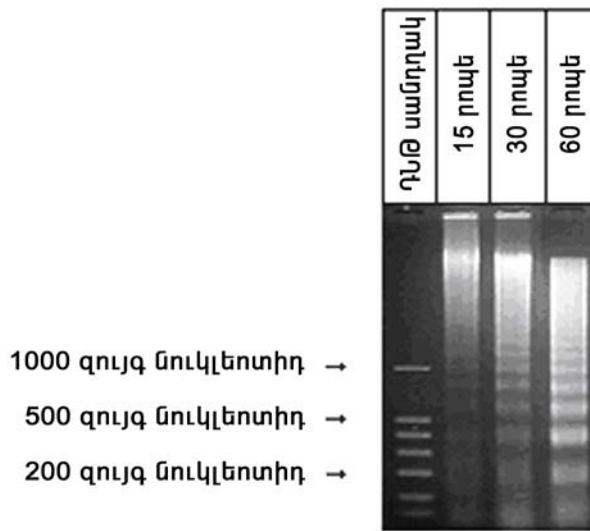


**Նկ. 2.** Ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման հետևանքով առաջացած  $1,25(OH)_2D_3$  ֆրագմենտների տոկոսային պարունակությունը մեկուսացված կորիզների ինկուբացիայի 30-րդ, 45-րդ և 60-րդ րոպեներին ստուգիչ խմբի առնետների լյարդի բջջակորիզներում:

Փորձերի հաջորդ խումբը նվիրված էր ինսուլինի ազդեցության ուսումնասիրությանը քրոմատինի ինդուցված ֆրագմենտավորման ինտենսիվության վրա հորմոնի *in vivo* ազդեցությունից 4 ժ հետո անջատված կորիզներում:

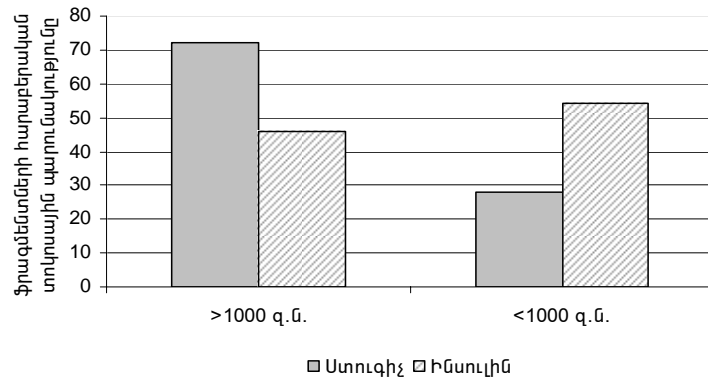
Ըստ գրական տվյալների [1,3] հորմոնի ներգործության այս փուլում դիտվում են ներկորիզային կառույցների էական փոփոխություններ: Խնդիր էր դրված ուսումնասիրել որքանով կարող են անդրադառնալ այդ փոփոխությունները քրոմատինի կայունության վրա էնդոնուկլեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցության հանդեպ:

Ինսուլինի ներարկումից 4 ժ հետո անջատված կորիզների համար  $Ca^{+2}$  և  $Mg^{+2}$  ավելացումը ինկուբացիայի միջավայր փոխում է ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման ինտենսիվությունը (նկ. 3):



**Նկ. 3.**  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ -կախյալ էնդոնուկլեազով  $1,25(OH)_2D_3$ -ի ինտերնուկլեոսոմային ֆրագմենտավորման կինետիկան ինսուլինի ներարկումից 4 ժ հետո անջատված լյարդի բջջակորիզներում:

Ինկուբացիայի 60-րդ րոպեին 1000 գ.ն.-ից մեծ ֆրագմենտների պարունակությունը 1,5 անգամ ավելի մեծ է, քան ստուգիչ կենդանիների մոտ, իսկ 200 գ.ն. ֆրագմենտներինը՝ 2 անգամ ավելի փոքր (նկ. 4):

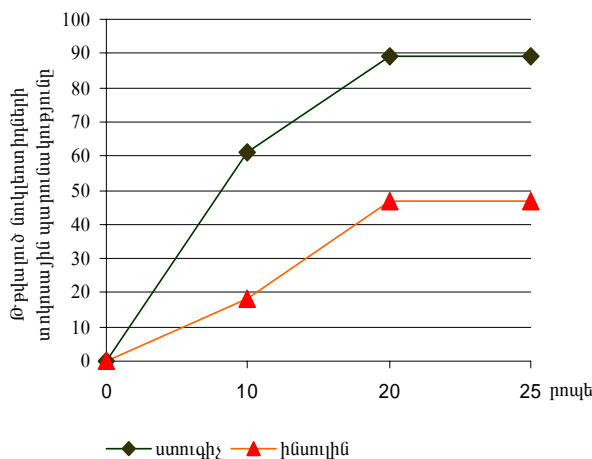


**Նկ. 4.** Ինսուլինի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների տոկոսային պարունակության վրա լրա լյարդի բջջակորիզներում (ֆրագմենտների մեծությունը ներկայացված է զույգ նուկլեոտիդներով):

*ա) ստուգիչ, բ) ինսուլինի ներարկումից 4 ժ հետո անջատված բջջակորիզներ: p < 0,05*

Չի բացառվում, որ հորմոնը կարող է փոխել էնդոգեն ներկորիզային  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -կախյալ էնդոնուկլեազի բազային ակտիվությունը ֆերմենտի հետտրանսլյացիոն մոդիֆիկացիայի շնորհիվ:

Այս հնարավորությունը ստուգելու համար մենք հետազոտեցինք կորիզներում քրոմատինի ճեղքավորման կինետիկան էկզոգեն ԴՆԹ I-ի ազդեցության ժամանակ: Ստացված տվյալները ընդհանրացված են նկ. 5-ում: Քանի որ էկզոգեն ԴՆԹ I-ի կիրառման պարագայում բացառվում է ճեղքավորող ֆերմենտի ակտիվության փոփոխությունը ներկորիզային մոդիֆիկացնող գործոններով (առնվազն ԴՆԹ I-ի գործունեության առաջին 15 րոպեների ընթացքում), ապա այս տվյալները արտացոլում են քրոմատինի մատչելիության փոփոխությունը: Դրանք ցույց են տալիս, որ ինսուլինի ներգործությունից 4 ժ հետո լյարդի քրոմատինը ավելի կայուն է դառնում նուկլեոլիտիկ ճեղքավորման հանդեպ (նկ. 5):



**Նկ. 5.** Քրոմատինի քայքայման կինետիկան ԴՆԹ-1-ով ստուգիչ տարբերակում և ինսուլինի ներարկումից 4 ժ հետո: p<0,05

Քրոմատինի ավելի սպեցիֆիկ (միայն լինկերային հատվածներում) ինտերնուկլեոսոմային ճեղքավորման արգելակումը վկայում է, որ քրոմատինի հարաբերական կայունացումը ընդգրկում է նաև լինկերային հատվածները:

Ստացված տվյալների ամբողջությունը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ ինսուլինի ազդեցությունից 4 ժ հետո հորմոնը հանգեցնում է քրոմատինի կոնֆորմացիայի այնպիսի փոփոխության, որը խոչընդոտում է ապոպտիկ  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -կախյալ էնդոնուկլեազի գործունեությանը և կարող է արգելակել հետագա կորիզային ապոպտիկ զարգացումները:

#### ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Геворкян Э.С., Демирханян Л.О., Явроян Ж.В., Арцруни И.Г., Дерзисян Н.Г.* Укр.биохим. ж., 73, 4, с.29-32, 2001.
2. *Billing J.R. and Bonner J.* Biochimica et Biophysica Acta. 281, p. 453-462, 1972.
3. *Gevorgyan E.S., Demirkhanyan L.H., Artsruny .G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R.* Ukrainian Bioch, 73,51-54, 2001.
4. *Hewish D.R., Burgoyne L.A.* Bioch. and Bioph.Res. Com 52, 2, pp. 475-481, 1973.
5. *Schwartzman R.A., Cidlowski J.A.* Endocr Rev. 14,133-151, 1993.
6. *Yakovlev A.G., Wang G., Stoica B.A., Boulares H.A., Spoonde A.Y., Yoshihara K. and Smulson M.E.* The Journal of Biological Chemistry, 275, 21302-21308, 2000.

*Ստացվել է 13.06.2008*