

синаптических мембран приводит к повышению синаптической проницаемости [1, 5] и увеличению количества поведенческих реакций (реаринг, груминг и половой активность) крыс [9]. Как известно, каналцы гранулярной эндоплазматической сети, рибосомы и митохондрии являются главными белоксинтезирующими органеллами [2, 3]. На основании существования этих органелл в дендритах, сформировалось мнение о том, что в этих отростках синтезируются белки [10]. Увеличение количества этих органелл дает возможность думать о том, что при 12-часовой ТДС в постсинаптических дендритах усиливаются синтетические процессы. Наблюдаемые в аксодендритных синапсах структурные изменения и новообразование аксошипиковых синапсов при 12-часовой ТДС можно оценивать как структурные эквиваленты повышенной функциональной активности гиппокампа.

Список использованной литературы:

1. Абушов Б.М. Изменения ультраструктуры аксодендритных синапсов поля СА₁ гиппокампа при 96-часовой депривации парадоксального сна // Неврол. Вестник. – 2011. – т.43, – № 3, – с.8-10.
2. Абушов Б.М. Морфофункциональные изменения в ЦНС при депривации сна и их коррекция: дис. докт. биол. наук. – Баку, 2012. – 390с.
3. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии, М.: Медицина, 1979. – 167с.
4. Косицын Н.С. Микроструктура дендритов и аксодендритических связей в центральной нервной системе. М., Наука, 1976. – 198с.
5. Котляр Б.И. Пластичность нервной системы. М.: Изд-во МГУ, 1986. – 240с.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., Высшая школа, 1990. – 352с.
7. Пушкин А.С., Лапин С.К. Ультраструктурные признаки приспособительных и компенсаторных процессов ЦНС / Вопросы экспериментальной и клинической патологии / Тр. Ереванского мединститута. Ереван, 1980. – с.95-99.
8. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Пластичность синапсов головного мозга. – Омск: Омская областная типография, 2008. –404с.
9. Abushov B.M. Morphofunctional analysis of the effects of total sleep deprivation on the CNS in rats // Neurosci.a.Behav.Physiol. – 2010. – v.40, – No.4, – p.403-409.
10. Gardiol A., Racca C., Triller A. Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery // J. Neurosci. – 1999. – v. 19, – No.1, – p.168-179.

**Асатрян А.Л.
Арцруни И.Г.
Матинян К.С.
Геворкян Э.С.**

Ереванский Государственный Университет, аспирант

ДЕЙСТВИЕ ЦИСПЛАТИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ИНТЕРНУКЛЕОСОМАЛЬНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК В ЯДРАХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС

**Asatryan A.L.
Artsruni I.G.
Matinyan K.S.
Gevorgyan E.S.**

Yerevan State University, PhD student

THE EFFECT OF CISPLATIN ON INTENSITY OF DNA INTERNUCLEOSOMAL FRAGMENTATION IN RAT LIVER NUCLEI

Аннотация

Настоящая работа посвящена изучению *in vivo* действия цисплатина на эффективность подавления интернуклеосомальной фрагментации ДНК в ядрах клеток печени крыс ингибиторами поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 (ПАРП 1). В качестве экспериментальных животных служили самцы белых беспородных крыс 6-и и 10-и недельного возраста. Показано, что интернуклеосомальная фрагментация ДНК подавляется АТФ (аллостерический ингибитор ПАРП 1) независимо от возраста животных, и такое воздействие АТФ уменьшается после введения животным цисплатина.

Интенсивность фрагментации ДНК ядер печени 6-и недельных крыс не меняется при действии конкурентного ингибитора ПАРП 1 бензамида, однако значительно подавляется в ядрах печени 10-и недельных крыс. Введение цисплатина 10-и недельным животным снимает ингибирующее действие бензамида на интенсивность интернуклеосомальной фрагментации ДНК.

Abstract

In present paper we investigated the influence of the *in vivo* treatment of rats with cisplatin on efficacy of inhibition of DNA internucleosomal fragmentation in liver nuclei by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). The rats of two different age groups (males, 6 and 10 weeks old) were examined.

The results come to show that DNA internucleosomal fragmentation in liver nuclei is down-regulated by ATP (PARP 1 allosteric inhibitor) regardless to the age of animals and this inhibition of fragmentation can be diminished by treatment with cisplatin. DNA fragmentation in nuclei of 6 wk old rats was not affected by benzamide (PARP 1 competing inhibitor), but was severely inhibited in nuclei of 10 wk old rats. Inhibitory effect of benzamide vanished after cisplatin administration to 10 wk old rats.

Ключевые слова: интернуклеосомальная фрагментация ДНК, ингибирование, АТФ, бензамид, цисплатин.

Keywords: DNA internucleosomal fragmentation, inhibition, ATP, benzamide, cisplatin.

Введение

Поли(АДФ-рибозо)полимераза 1 (ПАРП 1) является членом семейства поли(АДФ-рибозо)полимераз, наиболее широко представленным в ядрах клеток эукариотов. Фермент принимает активное участие в различных механизмах репарации ДНК, способствуя выживанию клеток. Подавление его активности приводит к усилению терапевтического эффекта цисплатина и темозоламида [1, с. 1950]. В настоящее время ингибиторы фермента проходят клинические испытания и применяются при лечении BRCA-дефицитных опухолей.

Как известно, ПАРП 1 активно участвует в организации структуры хроматина, и изменение ее активности влияет не только на активность репарационных процессов, но и степень конденсации хроматина [2, с. 294]. Поскольку активность ПАРП 1 резко возрастает при нарушении целостности структуры ДНК [3, с. 250], а цитотоксическое действие цисплатина обусловлено образованием ДНК-аддуктов, нам представилось важным исследование действия препарата на характер интернуклеосомального расщепления хроматина. При совместном применении цитотоксических препаратов особое значение приобретает оценка их возможного аддитивного, синергического или антагонистического взаимодействия. Принимая во внимание, что терапевтический эффект, как и токсическое действие лекарственных препаратов имеют выраженную возрастную зависимость, мы исследовали действие конкурентного ингибитора ПАРП 1- бензамида и аллостерического ингибитора – АТФ на интенсивность интернуклеосомальной фрагментации ДНК в ядрах клеток печени 6 и 10 недельных крыс после введения животным цисплатина.

Интернуклеосомальное расщепление ДНК осуществляли путем активации внутриядерной Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы согласно методу [4, с. 50].

Материалы и методы

Методы:

В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США). В качестве экспериментальных животных служили самцы белых беспородных крыс 6-и и 10-и недельного возраста. Раствор цисплатина (Cis-DDP) вводили внутривентриально (10 мг/кг веса животного). Животных декапитировали через 48 часов после инъекции препарата. Выделение ядер производили по модифицированному методу [5, с. 505].

Выделение и электрофорез ДНК из изолированных ядер печени крыс

Для инициации интернуклеосомального расщепления ДНК ядер в среду их инкубации добавляли растворы CaCl₂ и MgCl₂ (конечная концентрация двухвалентных ионов 1 и 6 мМ, соответственно).

ДНК выделяли из суспензии ядер по протоколу [6, с. 6.10]. Электрофорез ДНК проводили в 1,8% агарозном геле в ТАЕ (0,04 М Трис-ацетат; 0,01 М EDTA, pH 8), при напряжении 8 в/см. ДНК окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл, 15 мин).

Определение интенсивности интернуклеосомальной фрагментации ДНК

Для определения относительного содержания ДНК в отдельных электрофоретических полосах была использована компьютерная программа денситометрирования (FUJIFILM, Science lab, Image Gauge V 0.4), разработанная для оценки цифровых фотографий гелей.

Достоверность различий между средними величинами полученных данных определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Интернуклеосомальное расщепление ДНК апоптическими эндонуклеазами характеризует степень конденсации и особенности упаковки хроматина в ядрах. В настоящей работе мы исследовали действие ингибиторов ПАРП 1 различной природы на интенсивность интернуклеосомального расщепления ядерной ДНК клеток печени крыс до и после введения животным цисплатина. Показателем интенсивности расщепления ДНК служило относительное содержание фрагментов ДНК, превышающих 1000 пар осн. и фрагментов менее 200 пар осн. На рисунке 1 приведены фореграммы ядерной ДНК клеток печени 6-и (А) и 10-и недельных крыс (Б). В таблице 1 представлено относительное содержание соответствующих олигонуклеосомальных фрагментов. Полученные данные показывают, что хроматин ядер печени 10-и недельных крыс менее конденсирован, о чем свидетельствует низкое содержание длинных фрагментов ДНК. Цисплатин не меняет относительное содержание указанных фрагментов у животных различного возраста.

Аллостерический ингибитор ПАРП 1 АТФ в концентрации 1 мМ подавляет интенсивность фрагментации ДНК в ядрах печени животных исследованных возрастных групп в 2-3 раза (контрольная группа). Ингибирующее действие 1 мМ АТФ уменьшается после введения животным цисплатина.

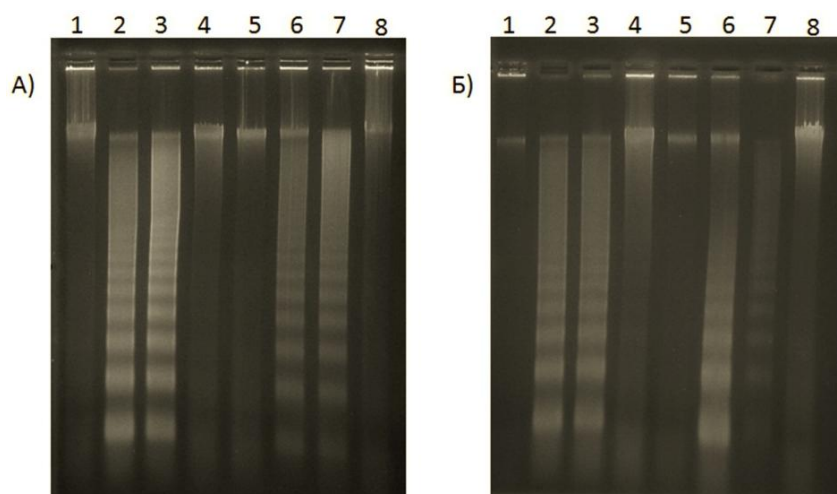


Рисунок 1. Действие АТФ на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени А) 6-и и Б) 10-и недельных крыс в контроле (1-4) и после действия цисплатина (5-8).

А) и Б) 1,5- ДНК, выделенная через 60 минут после инкубации изолированных ядер, 2,6- ДНК ядер, выделенная через 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+} , 3,7 - ДНК ядер, выделенная через 15 мин инкубации с 1 мМ АТФ и 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+} , 4,8- ДНК ядер, выделенная через 15 мин инкубации с 5 мМ АТФ и 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+}

Таблица 1. Количественное содержание фрагментов ДНК (%) в ядрах печени крыс, инкубированных в среде, содержащей АТФ.

	контроль				цисплатин			
	60' SS	60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15' 1mM АТФ + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15' 5mM АТФ + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	60' SS	60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15' 1mM АТФ + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15' 5mM АТФ + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
6 нед.								
>1000 п.о.	100	17.83±0.35	36.81±1.1	100	100	28.23±0.84	39.55±1.58	100
<200 п.о.	0	44.97±0.9	25.24±0.5	0	0	22.52±0.9	20.08±0.6	0
10 нед.								
>1000 п.о.	100	8.39±0.17	30.34±1.21	100	100	13.33±0.53	25.91±10.3	100
<200 п.о.	0	46.01±1.38	44.79±1.34	0	0	43.52±0.87	35.43±1.06	0

Данные, представленные на рисунке 2 и в таблице 2, свидетельствуют о том, что конкурентный ингибитор ПАРП 1 бензамид не оказывает существенного влияния на интенсивность интернуклеосомального расщепления ДНК ядер печени 6-и недельных крыс, как в контроле, так и после действия цисплатина. Однако в ядрах печени 10-и недельных животных контрольной группы бензамид значительно подавляет интенсивность интернуклеосомального расщепления ДНК. Введение цисплатина 10-и недельным животным снимает ингибирующее действие бензамида.

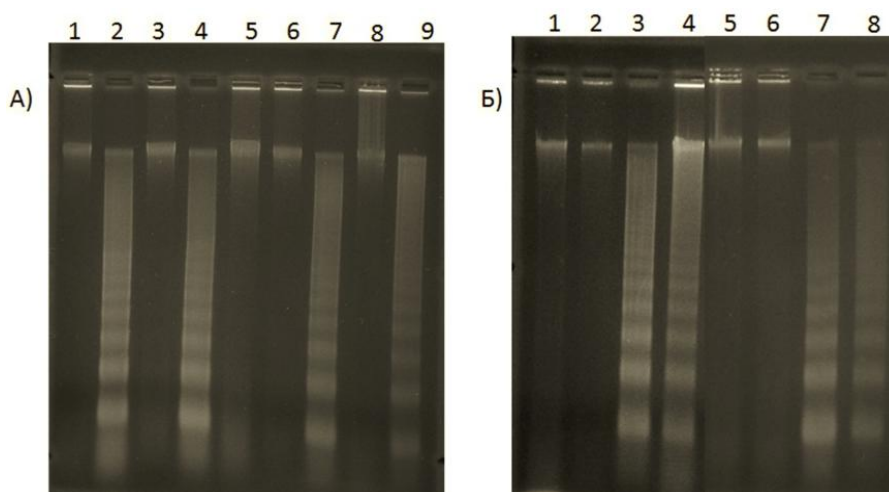


Рисунок 2. Действие бензамида на процесс интернуклеосомального расщепления хроматина в ядрах клеток печени А) 6-и и Б) 10-и недельных крыс в контроле (1-4) и после действия цисплатина (5-9).

А) 1,6- ДНК, выделенная через 60 минут после инкубации изолированных ядер, 2,7- ДНК ядер, выделенная через 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+} , 3,8- ДНК ядер, выделенная через 60 мин инкубации с 20мМ Бам, 4,9- ДНК ядер, выделенная через 15 мин инкубации с 20мМ Бам и 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+} , 5) ДНК ядер клеток печени после их выделения

Б) 1,5 - ДНК ядер клеток печени после их выделения, 2,6 – ДНК, выделенная через 60 минут после инкубации изолированных ядер 3,7 – ДНК ядер, выделенная через 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+} , 4,8 - ДНК ядер, выделенная через 15 мин инкубации с 20мМ Бам и 60 мин инкубации с Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Во всех исследованных группах независимо от возраста крыс и действия цисплатина интернуклеосомальное расщепление ДНК полностью подавляется 5 мМ АТФ.

Таблица 2. Количественное содержание фрагментов ДНК (%) в ядрах печени крыс, инкубированных в среде, содержащей бензамид.

6 нед.	контроль				цисплатин			
	60' SS	60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	60' SS + 20мМ Бам	15' 20мМ Бам + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	60' SS	60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	60' SS + 20мМ Бам	15' 20мМ Бам + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
	>1000 п.о.	100	15.37±0.61	100	11.26±0.33	100	27.38±1.09	100
<200 п.о.	0	42.14±1.68	0	58.93±2.94	0	52.63±2.1	0	33.59±1.7

10 нед.	контроль			цисплатин		
	60' SS	60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15' 20мМ Бам + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	60' SS	60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	15' 20мМ Бам + 60' $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
	>1000 п.о.	100	14.38±0.57	56.87±2.27	100	17.08±0.8
<200 п.о.	0	51.96±2.59	26.55±1.32	0	51.99±2.59	56.08±2.24

Ранее нами было показано, что введение животным цисплатина увеличивает ингибирующее действие АТФ на активность ПАРП 1 в ядрах печени 10-и недельных крыс. Результаты настоящей работы свидетельствуют, что при этом цисплатин уменьшает эффективность АТФ, как ингибитора интернуклеосомального расщепления

ДНК. Исследование действия конкурентного ингибитора ПАРП 1 бензамида на активность фермента выявило большую эффективность у крыс старшей возрастной группы, как в контроле, так и после действия цисплатина. Введение цисплатина 10-и недельным крысам приводит к проявлению возрастной зависимости действия бензамида на интенсивность расщепления ДНК.

Результаты настоящей работы указывают на необходимость коррекции химиотерапевтических схем с учетом возрастных особенностей действия ингибиторов ПАРП 1 различной природы.

Список использованной литературы

1. Clark CC, Weitzel JN, O'Connor TR. "Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models". *Mol Cancer Ther*; 11: 2012, pp.1948–58.

2. Kraus W., *Transcriptional Control by PARP-1: Chromatin Modulation, Enhancer-binding, Coregulation, and Insulation*, *Curr Opin Cell Biol*. 20(3): 2008, pp. 294–302.

3. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. and Poirier G.G. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.*, 342: , 1999, pp. 249-268.

4. Hughes FM Jr, Cidlowski JA, Apoptotic nuclease assays, *Methods Enzymol.*; 322: , 2000, pp. 47-62.

5. Hewish D.R., Burgoyne L.A. Chromatin Substructure, The Digestion of Chromatin DNA at Regularly Spaced Sites by a Nuclear Deoxyribonuclease. *Biochemical and Biophysical Res. Com*, 52: , 1973, pp. 504-510.

6. Sambrook J., Russel D. *Molecular Cloning, a laboratory manual*, v.1, 6.4-6.11

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

Сапиашвили З.Г.

Гимназия № 19, Курган

АНТРОПОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ДИНАМИКИ СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В ГОРОДЕ КУРГАНЕ

Z G Sapiashvili

Grammar school № 19,

Kurgan

ANTHROPOLOGICAL IMPLICATIONS OF THE DYNAMICS OF SOCIO- THE ECONOMIC SITUATION IN THE CITY OF KURGAN

Аннотация

На основании комплексного ретроспективного антропометрического анализа историй родов 3584 рожениц и новорожденных города Кургана за последние 20 лет выявлено, что в условиях децелерации роста тела после 10-летнего периода снижения происходит нормализация коэффициента рождаемости и функциональных показателей развития детей. Следовательно, в условиях стабилизации социально-экономических отношений наступает эпигенетическая адаптация плода к сложившимся условиям жизни и нормализация темпов его развития.

Abstract

Based on a comprehensive clinical examination and anthropometric 3584 maternal and neonatal Kurgan city over the last 20 years revealed that in terms of growth decelerations of the body after a 10-year period of declining birth rates are normalized and functional parameters of child development. Consequently, in terms of stabilization of socio-economic relations comes epigenetic adaptation of the fetus to the existing conditions of life and the normalization of the pace of its development.

Ключевые слова: децелерация роста, антропометрия, рост детей, развитие.