



Биол. журн. Армении, 3 (66), 2014

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ ЦИТИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТКАХ

С.В. МАРУТЯН, А.Л. НАВАСАРДЯН, Л.Р. АРАКЕЛЯН, Л.А. НАВАСАРДЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
marsed@ysu.am

Определена активность ферментов, дезаминирующих цитидин, цитозин и цитозино-вые нуклеотиды в экстрактах необлученных, облученных рентгеновскими лучами и репари-рованных дрожжей *Candida guilliermondii*. Было показано, что при облучении резко падает уровень дезаминирования цитидиндезаминазы (ЦДФ), а уровень дезаминирования цитозина возрастает. После пострadiационной репарации клеток наблюдался рост активности де-заминирования у всех исследованных субстратов, кроме цитидина.

*Цитидиндезаминаза – цитозин – ЦМФ – ЦДФ – ЦТФ – дрожжи –
рентгеновское облучение – репарация*

Ուսումնասիրվել է ցիտիդինի, ցիտոզինի և ցիտիդինային նուկլեոտիդների դեզամինացումը ճնշազայթված, ռենտգենյան ճառագայթահարման ենթարկված, այնուհետև՝ ռեպարացված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների էքստրակտներում: Ցույց է տրվել, որ ճնշազայթման դեպքում կտրուկ ընկնում է (ՑԴՖ)-ի դեզամինացման մակարդակը, իսկ ցիտոզինի դեզամինացման մա-կարդակն աճում է: Բջիջների հետճնազայթային ռեպարացիայից հետո դիտվում է դեզամինացման մակարդակի աճ բոլոր հետազոտված սուբստրատների համար, բացի ցիտիդինից:

*Ցիտիդինդեզամինազ – ցիտոզին – ՑՄՖ, ՑԿՖ, ՑԵՖ – խմորասնկեր –
ռենտգենյան ճառագայթում – ռեպարացիա*

The investigation of deamination of citidine, cytosine, and citidine nucleotides (CMP, CDP and CTP) was carried out on yeast *Candida guilliermondii*. It has been shown, that after exposure to X-ray the value of deamination of (CTD) was decreased, and the value of deamination of cytosine was increased. The increase of deamination level was detected in presence of all substrates besides citidine after the post radiation repair of cells.

Citidinedeaminase – cytosine – CMP – CDP – CTP – yeasts – X-rays – repair

Живая клетка наделена сложными, и в тоже время очень тонкими метаболи-ческими механизмами и не может продолжать свою деятельность в случае даже небольшого повреждения. Любой вид ионизирующего излучения приводит к ши-рокому спектру биологических изменений в организме. Хотя организм проявляет различные защитные реакции и сильно выраженную устойчивость к ионизиру-ющему излучению, однако известно, что ионизирующие лучи оказывают негативное влияние на живые организмы. В литературе имеются данные, посвященные меха-низмам радиорезистентности [3, 4], жизнеспособности [6] и способности колониеоб-разования [1] у дрожжей.

С другой стороны, в литературе сравнительно мало данных, посвященных исследованию дезаминирования пуриновых [8] и пиримидиновых [7] соединений под воздействием ионизирующего излучения.

В процессе ресинтеза нуклеиновых кислот пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды и их производные под влиянием дезаминирующих ферментов преобразуются в соединения, которые легко включаются в механизмы "спасения" нуклеотидов [5, 8].

Целью настоящей работы было исследование дезаминирования цитидиновых соединений у необлученных, подвергнутых рентгеновскому облучению, а также репарированных дрожжевых клеток *Candida guilliermondii* НП-4.

Материал и методика. В качестве объекта исследований использовались кормовые дрожжи *C. guilliermondii* НП-4, выращенные в жидкой питательной среде [8].

Рентгеновское облучение дрожжевых клеток было проведено на рентгеновской установке Дрон-3. Напряжение на рентгеновской трубке составляло 27 кВ, анодный ток -17 \AA , время экспозиции 30 мин. Источником облучения служил анод *Сu*, длина волны рентгеновского облучения составляла $1,54 \times 10^{-8}$ см, общая доза облучения – 27 кР.

Пострадиационное восстановление (репарация) дрожжевых клеток. Часть облученных дрожжей была подвергнута дальнейшей инкубации в условиях, способствующих репарации (температура 30°C, среда с 100 мМ глюкозы), в том же составе жидкой синтетической питательной среды, в тех же условиях, при которых инкубировались клетки до облучения [2].

Получение дрожжевого экстракта. Дрожжевая биомасса была заморожена до температуры -10°C . Затем клетки гомогенизировались заранее замороженным прессом. Полученный гомогенат перемешивали в калий-фосфатном буфере на магнитной мешалке в течение 20 мин, после чего центрифугировали при 15000 g, в течение 20 мин. Супернатант декантировали и определяли его объем.

Определение активности ферментов, дезаминирующих нуклеотиды и нуклеозиды. Активность ферментов, дезаминирующих цитидиновые соединения, определялась в супернатанте экстракта методом инкубации с субстратом в течение 1,5 ч, при температуре 37°C. Затем реакция была остановлена добавлением к инкубационной смеси 1 мл 20%-ного ТХУ и определялось количество выделенного NH_3 . Ферментативную активность выражали в мкМ выделенного NH_3 в 1г свежей дрожжевой биомассы.

Определение аммиака. Количество аммиака определяли микродиффузионным методом Зелингсона [9].

Результаты и обсуждение. Определялся уровень дезаминирования цитидиновых нуклеотидов ЦТФ(цитидин-три фосфат), ЦДФ(цитидин-два фосфат), ЦМФ(цитидин-монофосфат), цитидина и цитозина в экстрактах необлученных, облученных рентгеновскими лучами и репарированных дрожжей *C. guilliermondii*. Полученные данные представлены в табл. 1. Согласно приведенным данным, в необлученных дрожжевых клетках не наблюдается дезаминирования ЦМФ. Из приведенных данных видно, что уровень дезаминирования цитидина превышает уровень дезаминирования цитозина приблизительно 2,3 раза.

В следующем этапе исследований определялся уровень дезаминирования цитидиновых соединений в экстракте дрожжей, подвергнутых рентгеновскому облучению. Было показано, что в этом случае наблюдается дезаминирование ЦТФ и ЦДФ, но в отличие от необлученных дрожжевых клеток, уровень дезаминирования у обоих субстратов падает, в частности, для ЦДФ интенсивность дезаминирования уменьшается почти в 3 раза. Однако и в условиях облучения, и в необлученных клетках не наблюдается дезаминирования ЦМФ.

Полученные нами результаты показывают, что в условиях рентгеновского облучения уровень дезаминирования ЦДФ, по сравнению с ЦТФ, повышается приблизительно в 1,18 раз. Уровень дезаминирования цитозина, по сравнению с нативными клетками, выше почти в 2 раза, а по сравнению с цитидином – почти в 4,5 раза. Впоследствии, у облученных дрожжей параллельно с уменьшением уровня

дезаминирования цитидина, ЦДФ и ЦТФ, повышается уровень дезаминирования цитозина почти в 2 раза.

Таблица 1. Уровень дезаминирования цитидиновых соединений в экстрактах дрожжей *C. guilliermondii* НП-4 (мкМ NH₃ в 1г свежей биомассы, n=5, p<0,05)

Субстрат	Уровень дезаминирования		
	Клетки		
	Необлученные	Облученные	Репарированные
ЦТФ	5,1±0.4	3,2±0.2	4,8±0.31
ЦДФ	9,87±0.84	3,8±0.23	8,6±0.73
ЦМФ	-	-	5,25±0.41
Цитозин	2,2±0.2	4,52±0.3	8,2±0.7
Цитидин	5,2±0.4	0,99±0.07	-

После пострadiационной инкубации облученных дрожжей наблюдается сравнительно высокий уровень дезаминирования у всех исследованных субстратов, кроме цитидина: уровень дезаминирования цитозина, по сравнению с облученными дрожжевыми клетками, повышается почти в 1,8 раза, а по сравнению с необлученными дрожжевыми клетками – почти в 3, 7 раза. Повышается также уровень дезаминирования ЦТФ почти в 1,5 раза, ЦДФ – в 2,2 раза. После репарации, по сравнению с нативными и облученными клетками, уровень дезаминирования ЦМФ составляет 5,25 мкмол NH₃.

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что при облучении дрожжевых клеток рентгеновскими лучами уровень дезаминирования у всех цитидиновых соединений, кроме цитозина, понижается, а после пострadiационной инкубации, наоборот, несколько повышается. Что же касается ЦТФ, то процесс дезаминирования происходит как при нативном состоянии дрожжей, так и после рентгеновского облучения и пострadiационной репарации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Մարության Ս.Վ. Ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությունը *Candida guilliermondii* НП-4 խմորասնկերի կենսունակության և ԴՆԹ-ի որոշ ֆիզիկաքիմիական ցուցանիշների վրա, Երևան, 1999:
2. Մավաաբյան Լ.Յ., Մարության Ս.Վ. Խմորասնկային բջիջներից հիստոնային սպիտակուցների և ԴՆԹ-ի անջատումը և ֆյուրոբեսցենտային ցուցանիշների համեմատական ուսումնասիրումը (ուսումնամեթոդական ձեռնարկ), ԵՊՀ հրատարակչություն, 40 էջ, 2006:
3. Гусаревич Н.Б., Богдан А.Ц. Биологические эффекты малых доз и радиоактивное загрязнение среды (радиоэкологические и медикобиологические последствия). Минск, 62 с., 1998.
4. Навасардян Л.А. Влияние различных стрессовых факторов на белковые фракции дрожжей и на ДНК. Докт. дисс., 2003.
5. Angsstat C.N. Purine and Pirimidine Metabolizm. Ph. D., 1997.
6. Kuřec M., et al. Yeast vitality determination based on intercellular NAD(P)H fluorescence measurement during Aerobic-Anarobic transition. Fol. Microb., 5, 1, p. 25-29, 2009.
7. Lada A.G., Krick C.Frahm, Kozmin S.G., Mayorov V.I., Karpova T.S., Rogozin I.B., and Pavlov Y.I. Mutator effects and mutation Signatures of editing deaminases produces in Bacteria and yeast. ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 76, 1, pp.131-146, 2011.
8. Navasardyan A.L. The changes of vitality, deamination of the nucleotides and their derivatives and the quantitative changes of the polyphosphates in yeasts *Candida guilliermondii* during X-radiation and repair.
9. Zelingson D., Zelingson H. J. Microdiffusion method for determination nitrogen liberated as ammonia. Lab. Clin. Med. 38, 1951.

Поступила 27.03.2014