ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՆԱՎԱՍԱՐԴՅԱՆ ԱՐՓԻՆԵ ԼԵՎՈՆԻ

Candida guilliermondii ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԿԵՆՍԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ, ՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ԴԵԶԱՄԻՆԱՑՄԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ , ԻՆՉՊԵՍ ՆԱԵՎ ՊՈԼԻՖՈՍՖԱՏՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՏԵՂԱՇԱՐԺԵՐԸ ՌԵՆՏԳԵՆՅԱՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ ԵՎ ՌԵՊԱՐԱՑԻԱՅԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Գ.00.04 - Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2012

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

НАВАСАРДЯН АРПИНЕ ЛЕВОНОВНА

ИЗМЕНЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ, ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ НУКЛЕОТИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ, А ТАКЖЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ ПОЛИФОСФАТОВ У ДРОЖЖЕЙ *Candida guilliermondii* В ТЕЧЕНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – Биохимия

ЕРЕВАН – 2012

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝	ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Մ.Ա.Դավթյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր, Գ.Վ. Ապրիկյան կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր, Ե.Գ. Բաղդասարյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2012թ. հունիսի 21-ին, ժամը 14:00-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի 051 Կենսաֆիզիկա մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:
Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2012թ. մայիսի 21-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Լ.Հ.Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете.

Научный руководитель:	академик НАН РА, доктор биол. наук, профессор, М.А. Давтян
Официальные оппоненты:	доктор биол. наук, профессор, Г.В. Априкян доктор биол. наук, профессор, Е.Г. Багдасарян
Ведущая организация:	Государственный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 21–го июня 2012г., в 14^{00} часов, на заседании Специализированного совета 051 Биофизика ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.
Автореферат разослан 21-го мая, 2012 г.
Ученый секретарь Специализированного
совета 051, доктор биол. наук, профессор Л.А.Навасардян

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: Մարդու գործունեության ոլորտների ընդլայնմանը զուգահեռ՝ մեծանում են մարդու՝ իոնացնող ճառագայթման ենթարկվելու հնարավորությունները, ուստի ճառագայթումից պաշտպանվելու միջոցների մշակումը խիստ արդիական է, և հաջողությունները այդ ասպարեզում պահանջում են իոնացնող ճառագայթման ազդեցության մեխանիզմների պարզաբանում: Այդ խնդրին նվիրված բազմաթիվ հետազոտություններ կան, որոնք վերաբերվում են օրգանիզմների ռադիոկայունության մեխանիզմների [Кудряшов Ю.Б., 1974, Гусаревич Н.В., 1998, Навасардян Л.А., 2003], բջիջների կենսական ակտիվության [Kuřec M., et al., 2009], կենսունակության, հետճառագայթային վերականգնման և բազմաթիվ այլ հարցերին [Навасардян Л.А., 2003]:

Գրականությունից հայտնի տվյալների համաձայն՝ *Candida* ցեղի խմորասնկերի ռադոկայունությունը մոտ 2,5 անգամ ավելի բարձր է [Մարության Ս.Վ., 1999], քան *Saccharomyces* ցեղի խմորասնկերինը [Кудряшов Ю.Б., 1974]: Համապատասխանաբար, *Candida guilliermondii* խմորասնկերի մոտ բարձր են կենսունակության և կենսական ակտիվության ցուցանիշները, իսկ ռենտգենյան ճառագայթների ազդեցությանը ենթարկված *Candida* խմորասնակային բջիջների մոտ, չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ, գաղութառաջացումը 3 անգամ նվազել է [Մարության Ս.Վ., 1999]: Կենսական ակտիվությունը չճառագայթված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների մոտ աէրոբ-անաէրոբ անցման ժամանակ կազմել է 51,9%, ճառագայթված խմորասնկային բջիջների մոտ կենսական ակտիվությունը այդ նույն պայմաններում վերանում է, իսկ ռեպարացիոն շրջանում կրկին դրսևորվում է, բայց գրեթե 6 անգամ պակաս ակտիվությամբ: Գրականության տվյալների համաձայան *Saccharomyces cerevisiae carlsbergensis)* խմորասնկային բջիջների մոտ կենսական ակտիվությունը աէրոբ-անաէրոբ անցման ժամանակ կազմել է մոտ 23 % [Kuřec M., et al., 2009]:

Մյուս կողմից, քիչ են ճառագայթման ազդեցությամբ նուկլեոտիդները, նուլեոզիդները և ազոտական հիմքերը դեզամինացնող ֆերմենտների ուսումնասիրման ուղղությամբ աշխատանքները: Նուկլեինաթթուների ռեսինթեզի պրոցեսներում դեզամինացնող ֆերմենտների ազդեցությամբ պուրինային և պիրիմիդինային նուկլեոտիդները և նրանց ածանցյալները վեր են ածվում այնպիսի միացությունների, որոնք հեշտությամբ կարող են ընդգրկվել նուկլեոտիդների «փրկության» մեխանիզմներում: Պուրինների «փրկության» ուղում գործում են հետևյալ երկու ֆերմենտները՝ ադենինֆոսֆոռիբոզիլտրանսֆերազը, որի գործունեության արդյունքում գոյանում է շատ քիչ քանակությամբ ադենին և հիպոքսանտին-գուանին ֆոսֆոռիբոզիլտրանսֆերազը, որը «փրկում» է ուղղակիորեն գուանինին և անուղղակիորեն՝ ադենինին [Angstat C.N., 1997]:

Իոնացնող ճառագայթման և հետճառագայթային վերականգման (ռեպարացիայի) շրջանում բջիջների էներգետիկ մեխանիզմների խախտման և ռեպարացիոն շրջանում նրանց վերականգնման մեխանիզմների ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությամբ զգալիորեն արգելակվում է օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը առնետների լյարդի բջիջներում [Holahan P.K. et al., 1988, Kurgaliuk N.M., 2000] և փայծաղում [Van Bekkum D.W., 1957]: Որոշ հեղինակներ ճառագայթման ազդեցության մեխանիզմներում առավել կարևորում են միտոքոնդրիալ վնասվածքները, որոնք բերում են ԱԵՖ-ի քանակության կտրուկ անկման, ինչն էլ էապես դժվարացնում է վերականգնողական պրոցեսների ընթացքը [Van Bekkum D.W., Vos O., 1955]: Ինչ վերաբերում է այդ հարցերի ուսումնասիրմանը ստորակարգ էուկարիոտների մոտ, ապա վերջիններիս դեպքում համապատասխան ուսումնասիրությունները խիստ անբավարար են:

Այդ կապակցությամբ մեր ուշադրությունը գրավեցին գրականության որոշ տվյալներ այն մասին, որ հատկապես պրոկարիոտների և ստորակարգ էուկարիոտների մոտ պարունակվում են պոլիֆոսֆատներով լցված գրանուլներ, որոնք կոչվում են վոլյուտիններ: Վերջիններս, լինելով մակրոէրգիկ միացություններ, ունեն էներգիա պահեստավորող նշանակություն և կարևոր դեր բջիջների օսմոկարգավորման պրոցեսներում [Shirama K., et al., 1996, McGrath, et al., 2000, Docampo R., et al., 2010]:

Մեր առջև խնդիր դրվեց՝ ուսումնասիրել ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային վերականգնողական փուլերում *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների կենսական ակտիվության, նուկլեոտիդները և նրանց ածանցյալները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունների, ինչպես նաև՝ նշված փուլերում վոլյուտինային գրանուլների կրած փոփոխությունները:

<u>Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները</u>: Դրված խնդիրներին համապատասխան՝ ուսումնասիրությունները *C. guilliermondii* խմորասնկային բջիջների մոտ ծավալվել են հետևյալ ուղղություններով.

1. որոշվել է բջիջների կենսական ակտիվությունը՝ հիմնվելով աէրոբ-անաէրոբ անցման ժամանակ NAD(P)/NAD(P)H հարաբերության փոփոխության վրա:
2. որոշվել է ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիոն (ռեպարացիոն) փուլերում նուկլեոտիդները և նրանց ածանցյալները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունների կրած փոփոխությունները:
3. որոշվել է էլեկտրոնային միկրոսկոպիայի եղանակով՝ վոլյուտինային գրանուլների կրած փոփոխությունները ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիոն փուլերում:

<u>Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը:</u> Աշխատանքում առաջին անգամ որոշվել է իոնացնող ճառագայթման ենթարկված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների կենսական ակտիվությունը և ապացուցվել է,

որ այս խմորասնկային բջիջների մոտ ճառագայթման պայմաններում կենսական ակտիվությունը խիստ ընկճվում է, իսկ ռեպարացիայի փուլում՝ զգալիորեն բարձրանում:

Ուսումնասիրվել են ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիոն փուլերում ադենինային և գուանինային նուկլետիդները, նուկլեոզիդները և ազոտային հիմքերը դեզամինացնող ֆերմենտների ակտվությունների փոփոխությունները, որոնք ապահովում են գրեթե բոլոր նուկլետիդների, նուկլեոզիդների և ազոտային հիմքերի դեզամինացումը և այդ ճանապարհով՝ նրանց ընդգրկումը ռեպարացիոն պրոցեսներում:

Առաջին անգամ էլեկտրոնային միկրոսկոպիայի օգնությամբ ցույց է տրվել խմորասնկային բջիջների մոտ ճառագայթման շրջանում մետաքրոմատիկ գրանուլների՝ վոլյուտինների առկայությունը, որոնք ռեպարացիայի փուլում մանրանում և, ըստ էության, զբաղեցնում բջջի ողջ ցիտոպլազման՝ ապահովելով բջջում ընթացող ռեպարացիոն պրոցեսներն անհրաժեշտ քանակությամբ ԱԵՖ-ով:

<u>Աշխատանքի գիտական և կիրառական նշանակությունը:</u> Ստացված տվյալները անկասկած խորացնում են մեր գիտելիքները խմորասնկերի մոտ նուկլեոտիդների, նուկլեոզիդների և ազոտային հիմքերի դեզամինացման առանձնահատկությունների, ինչպես նաև խմորասնկային բջիջների ռադիոկայունության և կենսական ակտիվության վերաբերյալ: Առանձնապես հետաքրքրություն են ներկայացնում խմորասնկերի պոլիֆոսֆատների (վոլյուտինների) էլեկտրոնամիկրոսկոպիկ հետազոտությունների արդյունքները, որոնք ընդհանրապես անբավարար են ուսումնասիրված: Հաշվի առնելով այն փաստը, որ խմորասնկային բջիջը իր ժառանգական նյութի կառուցվածքով և տրանսկրիպցիոն առանձնահատկություններով շատ նման է բարձրակարգ էուկարիոտների քրոմատինին և կարող է դիտարկվել որպես ակտիվ քրոմատինի կառուցվածքի և կազմակերպման ուսումնասիրման հարմար մոդել [Nelson D., et al., 1977], ինչպես նաև ատենախոսությունում հիմնավորված եզրակացությունները պոլիֆոսֆատների, նուկլեոտիդների և նրանց ածանցյալների, խմորասնկերի կենսական ակտիվության, ԱԵՖ-ի կենսասինթեզի ապահովման վերաբերյալ, բաց են անում ուսումնասիրման նոր ուղիներ, որոնք կարող են բերել այնպիսի հիվանդությունների բուժման ուղիների մշակման, ինչպիսիք են սուր համակցված իմունային անբավարարությունը, խրոնիկ հեպատիտը, լյարդի ցիրոզը և այլն: Անկասկած է, որ ստացված տվյալները լայնորեն կօգտագործվեն կենդանի օրգանիզմների վրա իոնացնող ճառագայթման ազդեցության կանխման, հետճառագայթային վերականգնողական պրոցեսների արդյունավետության բարձրացման, կենսաքիմիական պաշտպանիչ այլ միջոցառումների մշակման ուղղությամբ:

<u>Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները:</u> Ատենախոսությունը փորձաքննության է ենարկվել ԵՊՀ կենսաբանության

ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում:
Ստացված արդյունքները զեկուցվել են հետևյալ գիտաժողովներում՝ “The Second International Conference dedicated to the 105th anniversary of the birth of N.W.Timofeeff-Ressovsky and the 70th anniversary of the paper «On the Nature of Gene Mutations and Gene Structure» by N.W.Timofeeff-Ressovsky, K.G.Zimmer, and M.Delbrück”, Yerevan, September 8-11, 2005, «Միջազգային Ուսանողական Կենսաբանական Գիտաժողով» նվիրված Երևանի պետական համալսարանի 90-ամյակին և կենսաբանության ֆակուլտետի 75-ամյակին, ԵՊՀ, Երևան, Մարտի 2-4, 2009, "XXIV Российская конференция по электронной микроскопии", Черноголовка, 2012г.:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված է 3 հոդված և գիտաժողովների 3 թեզիս:

<u>Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը:</u> Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտման օբյեկտի և մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից, ամփոփումից, ընդհանուր եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից:

Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 128 էջերում: Պարունակում է 7 գրաֆիկ, 5 աղյուսակ և 8 նկար:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

<u>Հետազոտության օբյեկտը:</u> Հետազոտության օբյեկտ են հանդիսացել նավթային ածխաջրածիններ յուրացնող *Candida guilliermondii* խմորասնկերը, որոնք ստացվել են Մոսկվայի սպիտակուցի սինթեզի ինստիտուտից, և պահվել են 4^0C ջերմաստիճանում, 2%-ոց քաղցու պարունակող ագար-ագարի վրա: Երկու ամիսը մեկ անգամ կատարվել է խմորասնկային բջիջների թանգարանային կուլտուրայի վերացանքս: Յուրաքանչյուր փորձից առաջ խմորասնկային բջիջները վերացանվել են 2% քաղցու պարունակող ագար-ագարով փորձանոթներում և աճեցվել 30^0C ջերմաստիճանի պայմաններում թերմոստատում, 48ժամ տևողությամբ:

<u>Սննդամիջավայրի պատրաստումը և խմորասնկային կենսազանգվածի ստացումը:</u> Խմորասնկային բջիջներն աճեցվել են հետևյալ բաղադրությամբ հեղուկ սինթետիկ սննդամիջավայրում՝ $(NH_4)_2HPO_4$–50մգ, $NH_4H_2PO_4$–200մգ, K_2SO_4-20մգ, $MgSO_4$ x $7H_20$-40մգ, որտեղ խմորասնկերի աճման համար որպես ածխածնի միակ աղբյուր օգտագործվել է D-գլյուկոզ: 200մլ սննդամիջավայր պարունակող Էրլենմեյերի կոլբայում ավելացրել ենք 0,1Մ գլյուկոզ և $3x10^{-6}$գ/լ բիոտին, ապա կոլբաները տեղադրել ենք թափահարող սարքի վրա (200-250պտ/ր), որն ապահովում է անհրաժեշտ աէրացիան: Խմորասնկերն աճեցվել են 4000 Լյուքս լուսավորության և 30^oC ջերմաստիճանի պայմաններում: 24-ժամյա ինկուբացիայից հետո խմորասնկային կենսազանգվածը կուլտուրալ միջավայրից առանձնացվել է

ցենտրիֆուգման միջոցով 4000պտ/ր արագությամբ, 10 րոպե տևողությամբ: Խմորասնկային բջիջները թորած ջրով լվանալուց հետո որոշվել է թաց կենսազանգվածի կշիռը:

Խմորասնկային բջիջների ճառագայթահարումը: Խմորասնկային կենսազանգվածը ենթարկվել է ռենտգենյան ճառագայթման սենյակային ջերմաստիճանում: Ռենտգենյան խողովակի վրա կիրառված լարումը կազմել է 35ԿՎ, անոդային հոսանքը եղել է 15մԱ: Ճառագայթման աղբյուր է հանդիսացել Cu-ի անոդը, ճառագայթման ալիքի երկարությունը եղել է $1,54x10^{-8}$սմ, ճառագայթման ընդհանուր դոզան կազմել է 30կՌ:

Խմորասնկային բջիջների հետճառագայթային վերականգնումը: Ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված խմորասնկային կենսազանգվածի մի մասը ենթարկվել է հետագա ինկուբացիայի՝ հետճառագայթային վերականգնմանը նպաստող պայմաններում (30^oC ջերմաստիճան, 100mM գլյուկոզի առկայություն), նույն բաղադրությամբ սննդամիջավայրում և նույն պայմաններում, որում աճեցվել էր խմորասնկային կենսազանգվածը նախքան ճառագայթահարելը:

Նուկլեոտիդները և նուկլեոզիդները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունների որոշումը խմորասնկային էքստրակտում: Խմորասնկային բջիջները սառեցվել են մինչև -10^oC, մամլվել են նախապես սառեցված մամլիչով և հոմոգենացվել մագնիսական խառնիչի վրա, 20ր տևողությամբ, ֆոսֆորական բուֆերի միջավայրում: Ստացված հոմոգենատը ցենտրիֆուգվել է 15000պտ/ր (ЦЛР-1) արագությամբ, 20ր տևողությամբ: Վերնստվածքում (էքստրակտ) որոշվել է պուրինային և պիրիմիդինային նուկլեոտիդները (ԱՄՖ, ԱԿՖ, ԱԵՖ, ԳՄՖ, ԳԿՖ, ԳԵՖ և ՑՄՖ), նուկլեոզիդները (ադենոզին, գուանոզին) և ազոտական հիմքերը (ադենազ, գուանազ) դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունները՝ համապատասխան սուբստրատների հետ խմորասնկային էքստրակտում ինկուբացիայի եղանակով. 37^oC ջերմաստիճանի պայմաններում, 1.5ժամ տևողությամբ: Ինկուբացիայից հետո ռեակցիան կանգնեցվել է՝ ռեակցիոն խառնուրդին ավելացնելով 1մլ 20% ԵՔՔ: Այնուհետև որոշվել է NH_3-ի քանակությունը: Ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտվել է 1գ թաց կենսազանգվածում առաջացած NH_3-ի մկմոլ-երով: Որոշվել է նաև ֆերմենտների տեսակարար ակտիվությունները:

Ամոնիակի որոշումը: Ամոնիակը որոշվում է Զելինգսոնի միկրոդիֆուզիոն մեթոդով [Zelingson D. et al., 1951]՝ ձևափոխված Սիլակովայի և աշխատակիցների կողմից: Մեթոդի էությունը կայանում է հերմետիկորեն փակված հատուկ միկրոդիֆուզիոն անոթներում KOH-ի միջոցով ինկուբացիոն խառնուրդներից NH_3-ի դուրս մղման մեջ: Ինկուբացիոն խառնուրդից անջատված ամոնիակը կապվում է ձողիկների վրա գտնվող ծծմբական թթվի հետ՝ առաջացնելով ջրալուծ ծծմբաթթվային աղ՝$(NH_4)_2SO_4$: Առաջացած ամոնիումի սուլֆատի քանակությունը որոշվել է գունաչափման եղանակով՝ Նեսլերի ռեակտիվի հետ փոխազդման

արդյունում առաջացած կոմպլեքս միացության դեղին գունավորման շնորհիվ (КФК-2МП, 440նմ ալիքի երկարություն, կյուվետ №20):

Էլեկտրոնային միկրոսկոպիա: Էլեկտրոնամիկրոսկոպիկ հետազոտությունների համար չճառագայթված, ճառագայթված և ռեպարացված խմորասնկային բջիջների սուսպենզիաները ենթարկվել են ֆիքսման գլյուտարալդեհիդի 2.5% լուծույթում 0,1M կակոդիլատային բուֆերում՝ ըստ ընդունված մեթոդիկայի [Reynolds E.S., 1968]: Նույն բուֆերում լվանալուց հետո կենսանմուշի ջրազրկումն իրականացվել է էթանոլի աճող կոնցենտրացիայով 30, 50, 70, 96 և 100% կամ ացետոնի աճող կոնցենտրացիայով՝ այնուհետև լցնելով այն արալդիտի խառնուրդով ըստ Լաֆտի [Luft J.H., 1968]:Պոլիմերացման ավարտից հետո թերմոստատներում 37^0Cև 59^0C պայմաններում ստացվել են գերբարակ կտրվածքներ Reichert-Jung ուլտրամիկրոտոմի վրա: Գերբարակ կտրվածքները ներկվել են ուրանիլ ացետատի և լիմոնաթթվական կապարի 5% լուծույթով ըստ [Venable J.H., 1965] և հետազոտել տրանսմիսիոն (լուսարկող) Tesla BS –500 և սկանավորող (տեսածրող) Tesla BS-301, Tescan էլեկտրոնային միկրոսկոպերով: Միկրոլուսանկարները սկանավորել են 900պիքսել/մատնաչափ լուծողունակությամբ Draw X5 11 ¨ Phtoshop CS5 ծրագրերով:

Խմորասնկերի կենսական ակտիվության որոշումը: Խմորասնկային բջիջների կենսական ակտիվությունը որոշվել է՝ գրանցելով NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի ինտեսիվության փոփոխությունը աէրոբ-անաէրոբ ստիպողական անցման ընթացքում «AA-անցում» [Kuřeca M. et al., 2009]: NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխությունը ($FI_{340/440}$) չափվել է 340/440նմ պայմաններում (գրգռման/առաքման ալիքի երկարություն), 10մմ կվարցե կյուվետում: Խմորասնկերում AA անցումը դրդվել է՝ բջջային սուսպենզիայում այլընտրանքորեն աէրոբ և անաէրոբ պայմաններ ստեղծելով, որն ապահովվել է խմորասնկային սուսպենզիա պարունակող կյուվետի մեջ կամ օդ, կամ ազոտ մղելով (0.1լ/ր): $FI_{340/440}$ ազդանշանը նախքան ազոտի ներհոսքը (AE) և ներհոսքից հետո (AN) գրանցվել է աշխատանքային ռեժիմում, յուրաքանչյուր 0.5վրկ-ում մեկ չափում՝ օգտագործելով FluoroMax™ ֆլյուորեսցենտային սպեկտրոմետր, մինչև հաստատուն ազդանշանի հաստատվելը (FI_{AE}, FI_{AN}): Այնուհետև արտածվող ազդանշանը հարթեցվել է՝ միջինացնելով ստացված տվյալները: Խմորասնկերի կենսական ակտիվությունը որոշվել է որպես NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի հարաբերական աճ (FI_{rel}, %)՝ անաէրոբ և աէրոբ արժեքների միջև (FI_{rel} = 100 (FI_{AN} – FI_{AE}) / FI_{AE}): Տվյալների մշակման այլ մեթոդ է հարթեցված $FI_{NAD(P)H}$-ազդանշանի առաջին կարգի ածանցյալ (dFI/dt) հաշվելը: NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի մաքսիմալ աճը՝ dFI/dt_{max} առավելագույն արժեքը, հանդիսանում է խմորասնկերի կենսական ակտիվության ցուցիչ:

ՍՏԱՑՎԱԾ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

Ներկայումս, կապված շրջապատող միջավայրի տեխնոգեն աղտոտվածության մեծացման հետ, արդիական խնդիր է դարձել կենդանի օրգանիզմի վրա միջավայրի անբարենպաստ ազդակների ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմների բացահայտումը: Արտաքին ֆիզիկական գործոնների շարքում առավել կարևոր է իոնացնող ճառագայթման ազդեցության ուսումնասիրումը, քանի որ նման ճառագայթումը հանդիսանում է հզոր մուտագեն և կանցերոգեն գործոն: Գիտական հետաքրքրություն է ներկայացնում ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիայի (ռեպարացիայի) ենթարկված ստորակարգ էուկարիոտ բջիջների, մասնավորապես՝ խմորասնկերի, կենսունակության և կենսական ակտիվության, նույն պայմաններում նուկլեոտիդները, նուկլեոզիդները և ազոտական հիմքերը դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունների, ինչպես նաև բջջում պոլիֆոսֆատների կրած փոփոխությունների ուսումնասիրումը, քանի որ խմորասնկային բջիջները իրենց ժառանգական նյութի կառուցվածքի և տրանսկրիպցիոն առանձնահատկությունների տեսակետից համեմատելի են բարձրակարգ էուկարիոտ բջիջների ժառանգական նյութի հետ:

Մեր լաբորատորիայում նախկինում իրականացված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ *Candida* ցեղի խմորասնկերը ավելի կենսունակ են և, հետևապես, ավելի ռադիոկայուն ռենտգենյան ճառագայթների նկատմամբ, համեմատած *Saccharomyces* ցեղի խմորասնկերի: Մասնավորապես *Candida* ցեղի խմորասնկերի ռադիոկայունությունը մոտ 2,5 անգամ ավելի բարձր է [Մարության Ս.Վ., 1999], քան *Saccharomyces* ցեղի խմորասնկերինը [Кудряшов Ю.Б., 1974]:

Կենսական ակտիվություն: Հետազոտությունների առաջին փուլում իրականացրել ենք չճառագայթված, ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիայի ենթարկված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների կենսական ակտիվության ուսումնասիրություն: Այդ նպատակով մեր աշխատանքում կիրառվել է նոր մոտեցում, որը հիմնված է NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխության գրանցման վրա՝ աերոբ-անաերոբ ստիպողական անցման ընթացքում (AA-անցում) [Kuřec M., et al., 2009]: Համապատասխան տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Բերված տվյալներից երևում է, որ ինտակտ խմորասնկային բջիջները բնորոշվում են մոտ 51.9% կենսական ակտիվությամբ: Ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված խմորասնկային բջիջների մոտ կենսական ակտիվություն չի դրսևորվում, իսկ ռեպարացված խմորասնկային բջիջների մոտ մասամբ վերականգնվում է կենսական ակտիվությունը, թեև ելակետային վիճակի համեմատությամբ մոտ 6 անգամ մնում է ցածր (գծ.1,2,3):

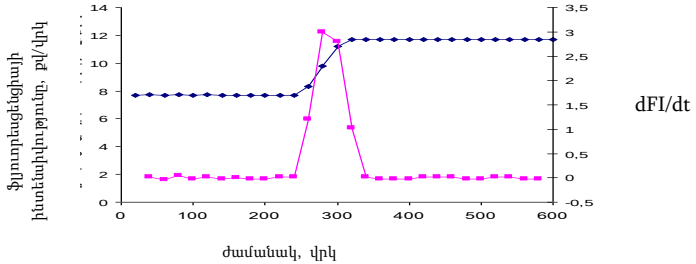
Ադենինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվության ուսումնասիրումը: Մեր լաբորատորիայում նախկինում կատարված հետազոտությունների արդյունքում ցույց է տրվել նաև, որ

ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությամբ ԴՆԹ-ի մոլեկուլում առաջացած վնասվածքները հետճառագայթային ռեպարացիայի ընթացքում, հակառակ սպասումների, ավելի են խորանում [Навасардян Л.А., 2003]:

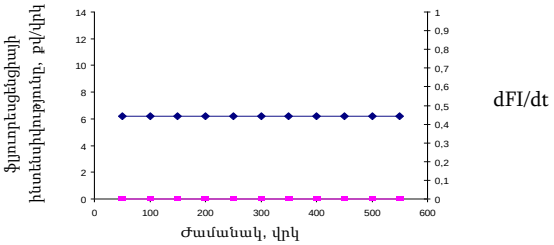
Աղյուսակ 1

Candida guilliermondii խմորասնկերի կենսական ակտիվության ուսումնասիրումը աէրոբ-անաէրոբ ստիպողական անցման ընթացքում (n=5, p<0,05)

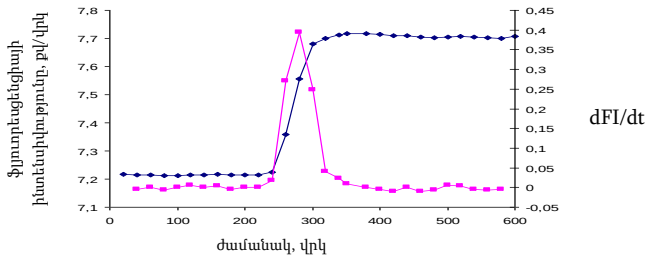
	FI_{AE}, *10^6բվ/վ	FI_{AN}, *10^6բվ/վ	FI_{rel}, %
Չճառագայթված բջիջներ	7.7±0.1	11.7±0.2	51.9
Ճառագայթված բջիջներ	6.07±0.2	6.1±0.01	0
Ռեպարացված բջիջներ	6.45±0.03	6.99±0.08	8.5



Գծ.1 Ներբջջային NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջներում:



Գծ.2 Ներբջջային NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջներում:



Գծ.3 Ներբջջային NAD(P)H-ի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը հետճառագայթային ինկուբացիայի ենթարկված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջներում:

Այդ իսկ պատճառով կարևոր է պուրինային նուկլեոտիդների (ԱՄՖ, ԱԿՖ, ԱԵՖ, ԳՄՖ, ԳԿՖ, ԳԵՖ) և նուկլեոզիդների (ադենոզին, գուանոզին), ինչպես նաև ազոտային հիմքերի՝ ադենինի և գուանինի, փոխանակությանը մասնակցող ֆերմենտների ակտիվությունների կրած փոփոխությունների ուսումնասիրումը չճառագայթված, ռենտգենյան ճառագայթման և 24 ժամյա հետճառագայթային ինկուբացիայից ենթարկված *Candida guilliermondii* խմորասնկերում:

Իրականացվել է ԱԵՖ-ի, ԱԿՖ-ի, ԱՄՖ-ի, ադենոզինի և ադենինի դեզամինացման համեմատական ուսումնասիրություն ինչպես չճառագայթված, այնպես էլ՝ ռենտգենյան ճառագայթների ազդեցությանը ենթարկված և ռեպարացված (հետճառագայթային ինկուբացիայի ենթարկված) *C. guilliermondii* խմորասնկային բջիջների էքստրակտում: Ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում: Պարզվել է, որ չճառագայթված խմորասնկային բջիջների էքստրակտում չի դիտվել ադենինդեզամինազ և ադենոզինդեզամինազ ֆերմենտների ակտիվություն (գծ. 4): Ադենինային նուկլեոտիդների շարքում չի դիտվել միայն ԱՄՖ-ի դեզամինացում: Համեմատաբար բարձր ակտիվություն է նկատվել ԱԿՖ-ը և ԱԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտների մոտ, ընդ որում՝ ԱԿՖ-ի դեզամինացման աստիճանը մոտ 7 անգամ բարձր է ԱԵՖ-ի համեմատությամբ:

Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացվել է դեզամինացման ուսումնասիրություն ռենտգենյան ճառագայթների ազդեցությանը ենթարկված խմորասնկերի էքստրակտում: Այստեղ նույնպես չի դիտվել ադենինը, ադենոզինը և ԱՄՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվություն: Չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ այստեղ մոտ 3 անգամ իջել է ԱԵՖ-ի դեզամինացման աստիճանը, նկատվել է ԱԿՖ-ի դեզամինացման բարձրացում մոտ 1.6 անգամ (գծ.5):

Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացվել է ռենտգենյան ճառագայթների ազդեցությանը ենթարկված խմորասնկերի հետճառագայթային 24 ժամյա ինկուբացիա՝ ռեպարացիան խթանող պայմաններում (100մՄոլ գլյուկոզ, 30°C ջերմաստիճան) [Навасардян Л.А., 2003]: Ռեպարացիայից հետո դրսևորվում է

դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվություն բոլոր դիտարկված սուբստրատների համար (գծ.4 և գծ.5): Ընդ որում, ադենինդեզամինազի և ադենոզինդեզամինազի համար դիտվում է գրեթե միանման ակտիվություն, որը զգալիորեն ցածր է ադենինային նուկլեոտիդները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունից: ԱԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվությունը կտրուկ աճում է՝ գերազանցելով ելակետային արժեքը մոտ 4,4 անգամ, իսկ ճառագայթված բջիջներին բնորոշ մակարդակի համեմատությամբ՝ մոտ 14,3 անգամ: ԱԿՖ-ը դեզամինացման մակարդակը չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ մեծանում է 1,37 անգամ, իսկ ճառագայթված բջիջների համեմատությամբ՝ իջնում՝ մոտ 1,2 անգամ: Այսպիսով, ադենինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտների շարքում բոլոր դիտարկված տարբերակներում ամենաբարձր ակտիվություն ցուցաբերել է ԱԿՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտը, իսկ ռեպարացված խմորասնկային բջիջներում դեզամինացման ամենացածր մակարդակը դիտվել է ԱՄՖ-ի դեպքում:

Իոնացնող ճառագայթման տոքսիկ ազդեցության ուսումնասիրման դասական մոդելները ճառագայթման նկատմամբ զգայուն բջջային թիրախների շարքում առաջին տեղում դասում են ԴՆԹ-ն, սակայն գրականություն վերջին տվյալների համաձայն սպիտակուցները, ավելի շատ քան ԴՆԹ-ն, հանդիսանում են իոնացնող ճառագայթման կենսաբանական ազդեցության գլխավոր թիրախը զգայուն բակտերիաների համար [Daly M.J., et al., 2007]:

Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացվել է ադենինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմետների ակտիվությունների ուսումնասիրություն, ըստ սպիտակուցի քանակության, Լոուրիի մեթոդով [Lowry O. H. et. al., 1951]:

ԱԵՖ-դեզամինազի տեսակարար ակտիվություն առկա է դիտարկված բոլոր վիճակներում, ընդ որում՝ ճառագայթումից հետո տեսակարար ակտիվությունը չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ մի փոքր իջել է: Ռեպարացիայից հետո նկատվել է ԱԵՖ-դեզամինազի տեսակարար ակտիվության բարձրացում ճառագայթված բջիջների համեմատությամբ՝ 3 անգամ, իսկ չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ՝ մոտ 2.9 անգամ: ԱԿՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտը դիտարկված ֆերմենտների շարքում ցուցաբերել է ամենաբարձր տեսակարար ակտիվություն. այն մոտ 4.7 անգամ ավելի բարձր է ԱԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվության համեմատությամբ: Ճառագայթված խմորասնկերում ԱԿՖ-դեզամինազի տեսակարար ակտիվությունը չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ բարձրանում է մոտ 1.2 անգամ, իսկ ռեպարացված տարբերակում՝ մոտ 2.1 անգամ՝գերազանցելով չճառագայթված բջիջներում դրսևորած տեսակարար ակտիվության մոտ 2.6 անգամ: ԱՄՖ-ը, ադենինը և ադենոզինը դեզամինացնող ֆերմետները չճառագայթված խմորասնկային բջիջներում ակտիվություն չեն ցուցաբերում: Նույն պատկերը դիտվում է նաև ճառագայթված խմորասնկային բջիջներում: Ինչ վերաբերում է հետճառագայթային

ռեպարացիայի ենթարկված բջիջներին, ապա բոլոր երեք ֆերմենտների համար դիտվում են ակտիվություններ, ընդ որում՝ ադենինդեզամինազի և ադենոզինդեզամինազի տեսակարար ակտիվությունները մոտավորապես հավասար են և զգալիորեն ցածր ԱԿՖ-ը և ԱԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտների տեսակարար ակտիվություններից:

Գուանինային նուկլեոտիդները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվության ուսումնասիրությունը: Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացվել է գուանինային միացությունների՝ ԳԵՖ-ի, ԳԿՖ-ի, ԳՄՖ-ի, գուանոզինի և գուանինի դեզամինացման համեմատական ուսումնասիրություն չճառագայթված, ռենտգենյան ճառագայթների ազդեցությանը, ինչպես նաև՝ հետճառագայթային ինկուբացիայի ենթարկված *C.guilliermondii* խմորասնկային բջիջների էքստրակտում: Ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 3-ում:

Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ չճառագայթված խմորասնկային բջիջների էքստրակտում գուանինդեզամինազի և գուանոզինդեզամինազի ակտիվություն չի դիտվել (գծ.6): Գուանինային նուկլեոտիդներից չի դիտվել միայն ԳՄՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվություն: Պարզվել է, որ ԳԵՖ-ը դեզամինացման աստիճանը մոտ 1.7 անգամ բարձր է եղել ԳԿՖ-ի դեզամինացման աստիճանից (գծ.7):

Այնուհետև ուսումնասիրվել է գուանինային միացությունների դեզամինացումը ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությանը ենթարկված խմորասնկային բջիջների էքստրակտում, և պարզվել է, որ, ի տարբերություն չճառագայթված բջիջների, ռեպարացված խմորասնկային բջիջներում դրսևորվել է գուանազ ֆերմենտի զգալի ակտիվություն (գծ.6): Ուսումնասիրված մյուս սուբստրատների դեպքում դիտվում է ֆերմենտների ակտիվության անկում: ԳԿՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվությունը չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ ընկնում է մոտ 1.6 անգամ, իսկ ԳԵՖ-ի դեզամինացում չի դիտվում: Ակտիվություններ չեն դիտվում նաև գուանոզինդեզամինազի և ԳՄՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի դեպքում (գծ.7):

Հետճառագայթային ինկուբացիայից հետո բջջային էքստրակտում նորից ի հայտ է եկել ԳԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվություն, որը, սակայն, մոտ 1.2 անգամ ցածր է չճառագայթված բջիջներին բնորոշ աստիճանից: Մոտ 1.5 անգամ աճում է նաև ԳԿՖ-ի դեզամինացման աստիճանը ճառագայթման ենթարկված բջիջների համեմատությամբ, սակայն չճառագայթված բջիջների համեմատ այն մնում է մոտ 1.15 անգամ ցածր: Ռեպարացված բջիջներում հայտնաբերվել է ԳՄՖ-դեզամինազի ակտիվություն, ընդ որում այն ամենաբարձրն է դիտարկված բոլոր սուբստրատների շարքում, թեև չճառագայթված և ճառագայթված բջիջներում այս ֆերմենտն ակտիվություն չի ցուցաբերել: ԳԵՖ-դեզամինազի ակտիվությունը մոտ 1.6 անգամ բարձր է ԳԿՖ-դեզամինազի ակտիվությունից: Գուանինդեզամինազի ակտիվությունը ճառագայթված բջիջների համեմատ բարձրացել է 3.8 անգամ, իսկ

գուանոզինդեզամինազը ակտիվություն չի ցուցաբերելել նաև ռեպարացված խմորասնկային բջիջներում(գծ.7):

Հաջորդ փուլում իրականացվել է գուանինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտների տեսակարար ակտիվության ուսումնասիրություն՝ ըստ սպիտակուցի քանակության: Տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 5-ում: Ինչպես երևում է աղյուսակից, ԳԵՖ-դեզամինազի տեսակարար ակտիվությունը ռեպարացված բջիջներում մոտ 1.6 անգամ ցածր է չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ, իսկ ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված բջիջներում ակտիվություն չի դիտվում: Ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությամբ ճնշվում է ԳԿՖ-դեզամինազի տեսակարար ակտիվությունը, իսկ ճառագայթված բջիջներում մոտ 1.6 անգամ ցածր է չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ: Ռեպարացված բջիջներում դիտվում է ֆերմենտի տեսակարար ակտիվության աճ մոտ 1.2 անգամ ճառագայթված և ակտիվության նվազում 1.3 անգամ չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ: ԳՄՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտը չճառագայթված և ճառագայթված բջիջներում ակտիվություն չի ցուցաբերում, իսկ ռեպարացված բջիջներում տեսակարար ակտիվությունն ամենաբարձրն է դիտարկված բոլոր ֆերմենտների շարքում: Գուանինի դեպքում նկատվում է ցածր ակտիվություն ճառագայթված բջիջներում, որը մի փոքր բարձրանում է ռեպարացված բջիջներում, իսկ գուանոզինդեզամինազի ակտիվություն չի դիտվում ընդհանրապես:

Այսպիսով, գուանինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտներից ամենաբարձր տեսակարար ակտիվություն ցուցաբերում է ԳՄՖ-դեզամինազը՝ ռեպարացիայի ենթարկված խմորասնկային բջիջներում:

Էլեկտրոնային միկրոսկոպիա: Գրականության տվյալների համաձայն, միաբջիջ օրգանիզմները տարբեր սթրես-գործոնների նկատմամբ օժտված են բարձ կայունությամբ, ինչի մասին վկայում է Չեռնոբիլի ԱԷԿ-ի տարածքում հայտնաբերված միաբջիջ օրգանիզմների բազմազանությունը [Гусаревич Н.В., 1998]: Հայտնի է նաև, որ բակտերիաները, խմորասնկերը, միաբջիջ կանաչ ջրիմուռներն ընդունակ են առաջացնելու պոլիֆոսֆատով հարուստ վոլյուտինային գրանուլներ [Vagabov V.M., 1996, Bode G., 1993, Auli-Riché D., 1998], որոնք հանդիսանում են ֆոսֆորի պահուստ և կարևոր դեր են խաղում օսմոկարգավորման պրոցեսներում [McGrath J.W., 2000, Shirama K., 1996, Docampo R., et al., 2010]: Իրականացվել է չճառագայթված ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիայի ենթարկված խմորասնկային բջիջների ուսումնասիրությունը սկանավորող (տեսածրող) և տրանսմիսիոն (լուսարկող) էլեկտրոնային միկրոսկոպտերով: Ցույց է տվել, որ ճառագայթված խմորասնկային բջիջներում հայտնաբերվում են բջիջների թելանման և գիգանտ ձևեր, և բջջում տեղի են ունենում կառուցվածքային առանձնահատկությունների փոփոխություններ և ցիտոպլազմայում դիտվում է, այսպես կոչված, մետաքրոմատիկ գրանուլների կամ վոլյուտինի՝ բջջում պոլիֆոսֆատների պահուստի, ավելացում:

Աղյուսակ 2.

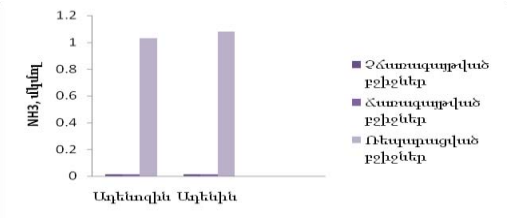
Ադենինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունը *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների էքստրակտում (մկմոլ NH_3 1գ թաց կենսազանգվածում, n=5, p<0,05)

Սուբստրատ	Ֆերմենտային ակտիվություն		
	Չճառագայթված բջիջներ	Ճառագայթված բջիջներ	Ռեպարացված բջիջներ
ԱԵՖ	0,98±0,07	0,3±0,02	4,3±0,2
ԱԿՖ	7,04±0.4	11,2±0,6	9,6±0,5
ԱՄՖ	-	-	1,24±0,1
Ադենոզին	-	-	1,03±0,08
Ադենին	-	-	1,08±0,09

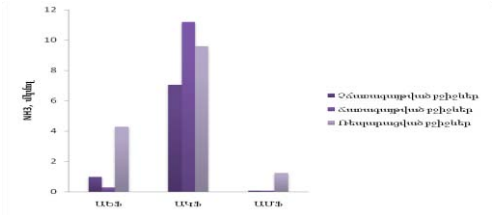
Աղյուսակ 3

Գուանինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունը *Candida guilliemondii* խմորասնկային բջիջների էքստրակտում (մկմոլ NH_3 1գ թաց կենսազանգվածում n=5, p<0,05)

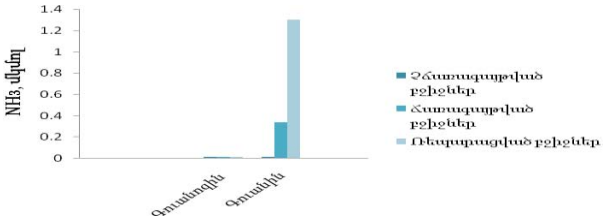
Սուբստրատ	Ֆերմենտային ակտիվություն		
	Չճառագայթված բջիջներ	Ճառագայթված բջիջներ	Ռեպարացված բջիջներ
ԳԵՖ	3,52±0.3	-	2,87±0.21
ԳԿՖ	2,04±0.1	1,24±0.1	1,77±0.15
ԳՄՖ	-	-	9,7±0.8
Գուանոզին	-	-	-
Գուանին	-	0,34±0.03	1,3±0.1



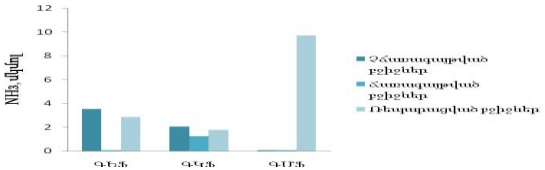
Գծ.4. *Candida guilliermondii* խմորասնկերի ադենոզինդեզամինազ (1) և ադենազ (2) ֆերմենտների ակտիվությունները



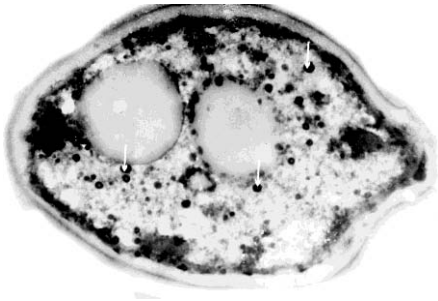
Գծ.5. *Candida guilliermondii* խմորասնկերի ադենինային նուկլեոտիդները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունները. ԱԵՖ-(1), ԱԿՖ-(2), ԱՄՖ-(3):



Գծ.6. *Candida guilliemondii* խմորասնկերի գուանոզինդեզամինազ (1) և գուանազ (2) ֆերմենտների ակտիվությունները:



Գծ.7.*Candida guilliemondii* խմորասնկերի գուանինային նուկլեոտիդները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունները. ԳԵՖ–(1), ԳԿՖ-(2), ԳՄՖ-(3):



Նկ.4. Ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված *Candida guillermondii* խմորասնկային բջիջների լուսարկող էլեկտրոնամանրադիտակային (ԼԷՄ) ուսումնասիրություն: Պոլիֆոսֆատային օսմիոֆիլ գնդերի՝ վոլյուտինի (↓) առկայություն ցիտոպլազմայում (գերբարակ կտրվածք): Խոշորացում՝ 10000:

Հետճառագայթային 24-ժամյա ինկուբացիայից հետո *Candida guillermondii* խմորասնկային բջիջներում հայտնաբերվել են ինտակտ բջիջներին նման բջիջներ ինչպես նաև երկարացված թելաձև բջիջներ, տեղի է նաև ունենում վոլյուտինային գրանուլների շատացում և տարածում բջջի ողջ ցիտոպլազմայում:

Նկատի ունենալով գրականությունից հայտնի տվյալները, որոնք վկայում են հետճառագայթային ախտահարումից հետո՝ ռեպարացիայի ընթացքում, պոլիֆոսֆատների վատման մասին [Holahan K.P., 1988, Овнанян К.О., и др., 2008], և մեր ստացած տվյալները, ամենայն հավանականությամբ, պոլիֆոսֆատները կարող են կոմպենսացնել ճառագայթային վնասման հետևանքով բջջում առաջացած ԱԵՖ-ի հսկայական դեֆիցիտը:

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Չնայած իոնացնող ճառագայթման վերաբերյալ առկա հսկայական գրականությանը, այնուամենայինիվ դեռևս բաց է մնում բազմաթիվ սկզբունքային հարցերի պարզաբանումը: Մասնավորապես, անբավարար է ուսումնասիրված ստորակարգ էուկարիոտների և պրոկարիոտների ռադիոռկայունության, նրանց կենսունակության և կենսական ակտիվության վերաբերյալ հարցերը իոնացնող ճառագայթման և հետճառագայթային փուլերում: Չպարզաբանված են մնում բջիջների պուրինային և պիրիմիդինային նուկլեոտիդները և նրանց ածանցյալները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունների փոփոխության, ռեպարացիոն մեխանիզմների հարցերը: Անբավարար են ուսումնասիրված էներգետիկ փոխանակության և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա իոնացնող ճառագայթման ազդեցության մեխանիզմը, և այդ պայմաններում էներգիայի մատակարարման հնարավոր այլ մեխանիզմների գոյության հարցը:

Տվյալ աշխատանքի նպատակն է՝ ուսումնասիրել *Candida* ցեղի խմորասնկերի ռադիոկայունության, կենսունակության և կենսական ակտիվության առանձնահատկությունները:

Մեր լաբորատորիայում նախկինում իրականացված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ *Candida guilliermondii* ցեղի խմորասնկերը ավելի կենսունակ են [Մարության Ս.Վ., 1999] և ռադռոկայունությունը մոտ 2,5 անգամ ավելի բարձր է [Навасардян Л.А., 2003], քան *Saccharomyces* ցեղի խմորասնկերինը [Кудряшов Ю.Б., 1974]: Մեր կողմից ցույց է տրվել, որ չճառագայթված *Candida* խմորասնկերի մոտ կենսական ակտիվությունը աէրոբ-անաէրոբ անցման ժամանակ կազմել է 51,9%, ճառագայթված բջիջներում վերանում է, իսկ ռեպարացիոն շրջանում կրկին դրսևորվում է, բայց գրեթե 6 անգամ պակաս ակտիվությամբ: Հայտնի է, որ *Saccharomyces cerevisiae* խմորասնկերի մոտ կենսական ակտիվությունը աէրոբ-անաէրոբ անցման ժամանակ կազմում է մոտ 23 % [Kuřec M., et al., 2009]: Ուսումնասիրվել են չճառագայթված, ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիայի ենթարկված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջներում ադենինային և գուանինային միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունները: Նկատվել է, որ ԱԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտը ակտիվություն ցուցաբերել է բոլոր երեք վիճակներում էլ, ընդ որում՝ ճառագայթված բջիջներում դեզամինացման մակարդակը ընկնում է, իսկ ռեպարացիայից հետո՝ բարձրանում: ԳԵՖ-ի դեզամինացում չի դրսևորվում ճառագայթված բջիջներում ակտիվություն: ԱԿՖ-ը և ԳԿՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտները ակտիվություններ դրսևորվում են նշված բոլոր վիճակներում: Ճառագայթված խմորասնկային բջիջներում ԱԿՖ-ի դեպքում դիտվում է ակտիվության զգալի աճ, իսկ ԳԿՖ-ի դեպքում ակտիվությունը ճնշվում է: Ռեպարացված բջիջներում ԱԿՖ-ի դեզամինացման աստիճանը իջնում է, սակայն մնում է բարձր՝ չճառագայթված բջիջների համեմատությամբ: ԳՄՖ-ը և ԱՄՖ-ը չճառագայթված և ճառագայթված բջիջներում չեն դեզմանինացվում, իսկ ռեպարացված բջիջներում երկուսն էլ դեզամինացվում են, ընդ որում ԳՄՖ-ը, ցուցաբերում է ամենաբարձր դեզամինացման աստիճանը գուանինային և ադենինային միացությունների շարքում: Ադենազը և գուանազը չճառագայթված բջիջներում չեն դեզամինացվում, ճառագայթված բջիջներում դեզամինացվում է միայն գուանազը, իսկ ռեպարացված բջիջներում ակտիվություններ ցուցաբերում են և ադենազը, և գուանազը: Ադենոզինը և գուանոզինը ճառագայթված, և չճառագայթված բջիջներում չեն դեզամինացվում սակայն, ռեպարացված բջիջներում ադենոզինդեզամինազը ցուցաբերում է ակտիվություն, իսկ գուանոզինդեզամինազը՝ ոչ:

Ստացված տվյալներից բխում է, որ ռեպարացիայի շրջանում ակտիվանում են նուկլեոտիդներն ու նուկլեոզիդները դեզամինացնող ֆերմենտները, ինչը պետք է հանգեցնի այդ նուկլեոտիդների և նուկլեոզիդների քայքայմանը և նրանց

արգասիքների քանակության շատացման: Դա հանրավորություն կտա նրանց «փրկվել» և կրկին ընդգրկվել նուկլեինաթթուների կենսասինթեզի պրոցեսներում:

Ճառագայթման հետևանքով բջջում ԱԵՖ-ի կոնցենտրացիաների կոմպենսացիայի վերաբերյալ առկա բացը լրացնելու նպատակով մեր ուշադրությունը գրավեցին օրգանիզմներում ԱԵՖ-ի պահանջը լրացնող ֆերմենտների և համապատասխան մեխանիզմների վերաբերյալ տվյալները: Այդ տեսակետից մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում վոլյուտինները որոնք բջջում պոլիֆոսֆատների պահուստի դեր են կատարում: Նկատի ունենալով գրականության աղքատիկ տվյալները [Holahan P.K. et al., 1988], որոնք վկայում են հետճառագայթային ռեպարացիայի ընթացքում պոլիֆոսֆատների վատման մասին, ամենայն հավանականությամբ, պոլիֆոսֆատները կարող են կոմպենսացնել ճառագայթային վնասման հետևանքով բջջում առաջացած ԱԵՖ-ի հսկայական դեֆիցիտը:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. *Candida guillermondii* խմորասնկերը, որոնք զգալիորեն ռադիոկայուն են *Saccharomyces cerevisiae* խմորասնկերի համեմատությամբ, դրսևորում են նաև բարձր կենսական ակտիվություն:
2. Ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությամբ *Candida guillermondii* խմորասնկերի կենսական ակտիվությունը խիստ ընկճվում, նույնիսկ՝ վերանում է: Իսկ ռեպարացիայի շրջանում այն նորից դրսևորում է, բայց շատ ավելի ցածր աստիճանով՝ համեմատած չճառագայթված բջիջների հետ:
3. Նուկլեոտիդները, նուկլեոզիդները և ազոտային հիմքերը դեզամինացնող ֆերմենտները, ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ինկուբացիոն փուլերում փոխում են ակտիվությունները յուրաքանչյուրը իրեն բնորոշ չափով և հաճախ տարբեր ուղղվածությամբ (ակտիվացում, արգելակում կամ անփոփոխ վիճակ):
4. Ադենինը, ադենոզինը և ԱՄՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտները դրսևորում են հետքային ակտիվություն չճառագայթված և ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությանը ենթարկված խմորասնկային բջիջներում, իսկ ԱԵՖ-ը և ԱԿՖ-ը երկու վիճակներում էլ դեզամինացվում են: Ճառագայթված բջիջներում ԱԵՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտի ակտիվությունը զգալիորեն ճնշվում է, իսկ ԱԿՖ-ի դեզամինացման դեպքում դիտվում է հակառակ պատկերը: Ռեպարացիոն շրջանում ակտիվություններ դրսևորել են վերը նշված բոլոր ֆերմենտները:
5. Գուանինը, գուանոզինը և ԳՄՖ-ը դեզամինացնող ֆերմենտները չճառագայթված խմորասնկային բջիջներում ակտիվություն չեն դրսևորել, իսկ ԳԵՖ-ի և ԳԿՖ-ի դեպքում նկատվում է դեզամինացում: Ճառագայթված

խմորասնկային բջիջներում դեզամինացման մակարդակ դրսևորվել է միայն ԳԿՖ-ի և գուանինի դեպքում: Հետճառագայթային ինկուբացիոն շրջանում ակտիվություններ դրսևորել են վերը նշված բոլոր միացությունները դեզամինացնող ֆերմենտները, բացառությամբ գուանոզինդեզամինազի: Ռեպարացիոն շրջանում նշված ադենինային և գուանինային միացությունների շարքում դեզամինացման ամենաբարձր մակարդակ ցուցաբերել է ԳՄՖ-ը:

6. Հետազոտվող խմորասնկային բջիջների մոտ առկա է ադենինը և գուանինը, ինչպես նաև՝ նրանց ածանցյալները, դեզամինացնող ֆերմենտների լայն հավաքածու, որոնք նախապատրաստում են այդ միացություններին՝ ընդգրկվելու «փրկության» ուղիների մեջ:
7. Ռենտգենյան ճառագայթման ժամանակ *Candida guillermondii* խմորասնկային բջիջներում հանդես են գալիս մետաքրոմատիկ գրանուլներ՝ վոլյուտիններ, որոնց քանակությունը կտրուկ շատանում է և տարածվում բջջի ողջ ցիտոպլազմայում: Վոլյուտինը, լինելով մակրոէրգիկ պոլիֆոսֆատների կուտակում, կարող է ֆոսֆագենների նման ֆոսֆորիլացնել ԱԿՖ-ին՝ վերածելով ԱԵՖ-ի, դրանով իսկ պահովելով բջջին ռեպարացիոն շրջանում խիստ անհրաժեշտ էներգիայով:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցուցակը

1. Նավասարդյան Ա.Լ., Մարության Ս.Վ.,.Նավասարդյան Լ.Հ,. Դավթյան Մ.Ա, Ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված *C.guilliermondii НП-4* խմորասնկային բջիջների կենսական ակտիվության համեմատական ուսումնասիրությունը:// ԵՊՀ գիտական տեղեկագիր, 2011, հ.3, էջ 46-49:
2. Навасардян А.Л. Влияние рентгеновского облучения на дезаминирование адениновых соеди-нений в дрожжевых клетках.//Биологический журнал Армении, 2011, т. LXIII, 4, стр. 57-60.
3. Овнанян К.О., Навасардян А.Л., Саргсян К.А., Овнанян М.К., Навасардян Л.А., Марутян С.В. Изучения влияния рентгеновского облучения на ультраструктурную организацию и волютинобразова-ние у *Candida guilliermondii.*//Вестник МАНЭБ, 2011, т.16, #5, вып.2, стр.34-37.
4. Navasardyan L.A., Marutyan S.V., Navasardyan A.L. Protein synthesis of yeasts Candida under some extremal conditions. // “The 2nd International Conference “Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology and Evolution” ded. to the 105th ann. of N.W. Timofeeff-Ressovsky, 2005, Yerevan, Sept.8-11, p.203.
5. Hovnanyan K.O., Sargsyan Ch.A., Navasardyan A.L., Hovnanyan M.K. Ultrastructural analysis of after-stress reparation on model *Candida*

guilliermondii. Proc. // “MCM 2011-10th Multinational Congress on Microscopy”. Urbiono University “CarloBo”, Italy, Sept. 4-9, 2011, p. 315.

6. Овнанян М.К., Навасардян А.Л., Овнанян Н.Л., Саргсян К.А., Овнанян К.О. Электронномикроскопический анализ волютинообразования у некоторых видов бактерий, дрожжей и простейших при действии стресс факторов.// "XXIV Российская конференция по электронной микроскопии", (с междун. участием) Черноголовка, 2012г.,стр. 455-456.

НАВАСАРДЯН АРПИНЕ ЛЕВОНОВНА

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТЕЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ, ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ НУКЛЕОТИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ, А ТАКЖЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ ПОЛИФОСФАТОВ У ДРОЖЖЕЙ *Candida guilliermondii* В ТЕЧЕНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: репарация, нуклеотиды, нуклеозиды, азотистые основания, жизненная активность, волютин

У низших эукариотов и прокариотов недостаточно изучены вопросы влияния ионизирующего излучения на особенности дезаминирования адениновых и гуаниновых нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований. Известно, что в процессе пострадиационной репарации дезаминирующие ферменты играют важную роль в «спасении» нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований путем их включения в ресинтез нуклеиновых кислот.

В работе представлены данные о влиянии рентгеновского облучения и репарации на активность дезаминирования пуриновых нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований у дрожжей *Candida guilliermondii.* Данные свидетельствуют, что изучаемые ферменты широко представлены у исследуемых дрожжей.

В нашей лаборатории ранее изучались вопросы радиорезистентности [Навасардян Л.А., 2003], и жизнеспособности [Մարությյան Ս.Վ., 1999] этих дрожжей. Наши исследования посвящени жизненной активности дрожжевых клеток *Candida.* До этого жизненная активность была исследована только у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [Kuřec M., et al., 2009]. Наши исследования показали, что при аэробно-анаэробном переходе показатели жизненной активности дрожжевых клеток *Candida* достаточно высоки по сравнению с показателями у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.*

Представленые данные электронно-микроскопических исследований дрожжей *Candida* четко показывают, что при радиации и в репарационном периоде резко увеличивается количество волютинов (полифосфатов), которые аккумулируются в клетке и играют важную роль в осморегуляции [Shirama K., et al.,

1996, McGrath, et al., 2000, Docampo R., et al., 2010]. Волютиновые гранулы, очевидно, являются запасными макроэргическими соединениями, типа креатинфосфата (фосфагенов) и в состоянии, подобно полифосфаткиназе [Korenberg A., 1956] и полифосфатглюкокиназе [Марьян Ш., 1956], фосфорилировать АДФ в АТФ за счет энергии полифосфатов.

Таким образом, можем утверждать, что изучаемые дрожжи рода *Candida* обладают достаточно высокой жизненной активностью и соответственно широкими возможностями для эффективного течения репарационных процессов в пострадиационном периоде. Поэтому с одной стороны, в пострадиационном периоде дезаминирующие ферменты переводят нуклеотиды, нуклеозиды и азотистые основания в более доступные соеденения для «спасения», т. е., для вовлечения в ресинтез нуклеиновых кислот, с другой стороны, повышенные количества полифосфатов при помощи указанных ферментов расходуются для фософорилирования АДФ и таким образом покрывают дефицит АТФ.

Обобщая, можем сказать, что у изучаемых дрожжей имеется полный набор ферментов, которые превращают пуриновые нуклеотиды, нуклеозиды и азотистые основания в доступные для их «спасения» соединения, необходимые для ресинтеза нуклеиновых кислот. Энергия обеспечивается полифосфатами при помощи полифосфаткиназы и полифосфатглюкокиназы, обеспечивающих фосфорилирование АДФ в АТФ.

Участие полифосфатов в указанных обменных процессах представляет большой интерес и подчеркивает перспективность исследований в этих направлениях.

NAVASARDYAN ARPINE LEVON'S

THE CHANGES OF THE VITALITY, DEAMINATION OF THE NUCLEOTIDES AND THEIR DERIVATIVES AND THE QUANTITIVE CHANGES OF THE PHOLYPHOSPHATES IN YEASTS *Candida guilliermondii* DURING X-RADIATON AND REPEIR

SUMMARY

Keywords: repair, nucleotides, nucleosides, purine bases, vitality, volutin

There are not enough studies on the peculiarities of the deamination of the adenine and guanine nucleotides, nucleosides and nitrogen bases under the influence of the X-rays on eukaryotes and prokaryotes. It is known, that during post-radiation repair through inclusion of nucleotides, nucleosides and nitrogen bases in the resynthesis of nucleic acids, deaminases play an important role in «salvage».

In work presented data influence of X-rays and repair on the activity of deamination of nucleotides, nucleosides and purine bases in yeasts *Candida guilliermondii*. The data are indicated, that the mentioned enzymes are widely represented in the studied yeasts.

In our laboratory previously studied the problems of radioresistance [Навасардян Л.А., 2003] and viability [Մարությյան Ս.Վ., 1999] of this yeast. Our investigations devoted to the vitality of yeasts *Candida*. Before this, vitality has been studied only in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast [Kuřec M., et al., 2009].

Our investigations have shown that the vitality of the cells are sufficiently expressed in the mentioned conditions, particularly it was demonstrated, that during the aerobic-anaerobic transition the rates of vitality in yeasts *Candida* are relatively high compared with rates in yeasts *Saccharomyces cerevisia*e.

It is also presented the electron-microscopic studied of the yeast *Candida*, where clearly mention increased amount of volutines (polyphosphates) in period of radiation and post-radiation, which are accumulated in cells and play an important role in osmoregulation [Shirama K., et al., 1996, McGrath, et al., 2000, Docampo R., et al., 2010]. Obviously, volutin granules are spare energy compounds and as a kreatinphosphat (phosphagen), such enzymes polyphosphatkinase [Korenberg A., 1956] and polyphosphatglukokinase [Марьян Ш., 1956] can phosphorylate ADP to ATP, due to the energy of polyphosphates.

Thus, we can affirm, that the studied yeast *Candida* have sufficiently high vitality and accordingly wider possibilities for an effective current of the repair processes in the post-radiation period. For this purpose, on the one hand, deaminated enzymes make nucleotides, nucleosides and bases more accessible to «salvage», involving them in resyntesis of nucleic acids, on the other hand, increased amount of pholyphosphates are spend for phosphorilation of ADP and thus cover the deficiency of ATP by thease enzymes.

Summerizing, we can say, that in studied yeasts are complete set of enzymes that convert purine nucleotides, nucleosides and bases connections available for «salvage», needed for resynthesis of nucleic acids. The energy provided by polyphosphates ensured posphorylation of ADP to ATP by polyphosphatkinase and polyphosphatglukokinase.

Participation of polyphosphates in these metabolic processes has great interest and emphasizes in prospectivity research in these areas.