



Биолог. журн. Армении, 4 (63), 2011

## ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АДЕНИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТКАХ

А. Л. НАВАСАРДЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии  
arpinenasardyan@gmail.com

Определялась активность ферментов, дезаминирующих аденин, аденозин и адениновые нуклеотиды в экстрактах необлученных, облученных рентгеновскими лучами и репарированных дрожжей *Candida guilliermondii*. Было показано, что при облучении резко падает активность АТФ-деаминазы, а активность АДФ-деаминазы возрастает. После пострadiaционной репарации клеток наблюдался рост активности всех исследованных дезаминирующих ферментов.

*Аденаза – аденозиндеаминаза – АМФ-аза – АДФ-аза – АТФ-аза – дрожжи –  
рентгеновское облучение*

Որոշվել է ադենինը, ադենոզինը և ադենինային նուկլեոտիդները դեզամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունը չճառագայթված, ճառագայթված և ռեպարացված *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջների էքստրակտներում: Ցույց է տրվել, որ ճառագայթման դեպքում կտրուկ ընկնում է ԱԵՖ-դեզամինազի ակտիվությունը, իսկ ԱԴՖ-դեզամինազի ակտիվությունը աճում է: Բջիջների հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո դիտվում է բոլոր հետազոտված ֆերմենտների ակտիվության աճ:

*Ադենազ – ադենոզինդեզամինազ – ԱՄՖ-ազ – ԱԴՖ-ազ – ԱԵՖ-ազ – խմորասնկեր – ռենտգենյան ճառագայթում*

The investigation of activity of deamination enzymes of adenine, adenosine, and adenine nucleotides (AMP, ADP and ATP) was implemented. It has been shown, that after exposure to X-radiation the activity of ATP-deaminase was decreased, while activity of ADP-deaminase was increased. After the postradiation repair of cells the increase in activities of all investigated enzymes took place.

*Adenase – adenosindeaminase – AMP-deaminase – ADP-deaminase –  
ATP-deaminase – X-rays*

Одним из важнейших задач радиационной биохимии является выяснение молекулярных механизмов образования повреждений в клетках под воздействием радиации, что имеет не только теоретическое, но и важное прикладное значение, так как целенаправленное влияние на радиочувствительность и мутагенез возможен только посредством выявления механизмов влияния радиации на клетки. Негативное воздействие внешней среды на организм осуществляется, в первую очередь, на уровне генома клетки и, конечно, на уровне продуктов экспрессии генов - белков.

Воздействие ионизирующего облучения на организмы осуществляется, в первую очередь, на уровне ДНК. Однако недавние исследования показали, что жизнеспособность клеток, подвергшихся облучению, обусловлена повреждением белков под влиянием облучения. Согласно новой модели возникновения поражений, индуцированных облучением, в клетках, чувствительных к облучению, белки восстанавливающие повреждения ДНК, разрушаются быстрее, чем возникают значительные повреждения в ДНК. После облучения в клетках, стабильных к облучению, белки продолжают эффективно действовать, так как они защищены специальным химическим механизмом с участием двухвалентного магния [7].

В настоящее время проводятся комплексные исследования катаболизма и синтеза белка в дрожжевых клетках, а также структуры хроматина в различных экстремальных условиях (голодание, термошок, ионизирующая радиация и др.) [3,4]. Показано, что под влиянием рентгеновского облучения на дрожжи в ДНК образуются структурные повреждения, которые в течение пострadiaционной инкубации полностью не восстанавливаются [5].

При рентгеновском облучении дрожжевых клеток повреждаются также различные ферменты, в том числе и ферменты репаративной системы клетки, в результате чего в процессе репарации не только не восстанавливаются структурные повреждения ДНК (при облучении), но, возможно, происходит их «неправильная репарация» [2].

Таким образом, возникла необходимость исследования механизмов действия и изменения активности ферментов, участвующих в синтезе и катаболизме ДНК и нуклеотидов в норме, а также при облучении и репарации клеток. В настоящее время в литературе имеется значительное количество данных об активности ферментов, дезаминирующих азотистые основания, нуклеозиды и нуклеотиды [6,9]. В частности, в области медицины изучена человеческая аденозиндезаминаза, так как недостаток или избыток активности этого фермента вызывает различные заболевания. Путь генной терапии, осуществляемой гемопоэтическими стволовыми клетками, приводит к успешному преобразованию иммунной функции у детей [8].

Целью настоящей работы было исследование дезаминирования адениновых соединений у необлученных, облученных, а также репарированных дрожжевых клеток *C. guilliermondii* НП-4.

**Материал и методика.** В качестве объекта исследований использовались кормовые дрожжи *C. guilliermondii* НП-4, выращенные в жидкой питательной среде [1].

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

**Пострадиационное восстановление (репарации) дрожжевых клеток.** Часть облученных дрожжей была подвергнута дальнейшей инкубации в условиях, способствующих репарации (температура 30°C, наличие 100 мкМ глюкозы), в том же составе жидкой синтетической питательной среды, в тех же условиях, при которых инкубировались клетки до облучения.

**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 20 мин, после чего экстракт центрифугировали при 15000 г в течение 20 мин. Супернатант декантировали и определяли его объем.

**Определение активности ферментов, дезаминирующих нуклеотиды и нуклеозиды.** Активность ферментов, дезаминирующих адениновые соединения, определяли 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 после чего определяли количество выделенного NH<sub>3</sub>. Ферментативную активность выражали в мкМ выделенного NH<sub>3</sub> в 1 г свежей дрожжевой биомассы.

*Определение аммиака.* Количество аммиака определяли микродиффузионным методом Зелингсона на ФЭК КФК-2-МН при длине волны 400 нм[10].

**Результаты и обсуждение.** Определялась активность ферментов, дезаминирующих аденин, аденозин и адениновые нуклеотиды в экстрактах необлученных, облученных рентгеновскими лучами и репарированных дрожжей *S.guilliermondii* НП-4. Полученные данные представлены в табл. 1. Согласно приведенным данным, в нативных дрожжевых клетках *S.guilliermondii* НП-4 наблюдается очень низкая активность ферментов адениндезаминаза (аденаза), аденозиндезаминаза и АМФ-дезаминаза (наблюдаются лишь следы активности). Сравнительно высокая активность у ферментов, дезаминирующих АДФ и АТФ, причем активность АДФ-дезаминазы примерно в 7 раз выше таковой АТФ-дезаминазы.

**Таблица 1.** Активность ферментов, дезаминирующих адениновые нуклеотиды в экстрактах дрожжей *S.guilliermondii* НП-4 (мкМ NH<sub>3</sub> в 1 г свежей биомассы)

Субстрат	Ферментативная активность		
	Необлученные клетки	Облученные клетки	Репарированные клетки
АТФ	0,98(0,08)	0.3(0,02)	4.3(0.2)
АДФ	7.04(0.4)	11.2(0,6)	9.6(0.5)
АМФ	-	-	1.24(0.1)
Аденин	-	-	1.08(0.09)
Аденозин	-	-	1.03(0.09)

В экстракте дрожжей, подвергнутых рентгеновскому облучению, сохраняется низкий уровень активности адениндезаминазы, аденозиндезаминазы и АМФ-дезаминазы. Примерно 3 раза падает активность АТФ-дезаминазы. В случае АДФ-дезаминазы наблюдается повышение ее примерно в 1.6 раза по сравнению с необлученными клетками.

После пострадиационной репарации наблюдается активность дезаминирующих ферментов всех исследованных субстратов, причем для адениндезаминазы и аденозиндезаминазы наблюдаются примерно одинаковые уровни активности, которые значительно ниже по сравнению с таковой ферментов, дезаминирующих адениновые нуклеотиды. Активность АТФ-дезаминазы в репарированных клетках резко возрастает (примерно в 14.3 раза), превышая значение, полученное для облученных, и 4.4 раза - для необлученных дрожжей. Что касается АДФ-дезаминазы, то активность этого фермента по сравнению с облученными клетками падает в 1.2 раза, но остается довольно высокой и в 1.37 раза превышает уровень активности, полученный для необлученных клеток.

Таким образом, рентгеновское облучение дрожжевых клеток приводит к изменению всего спектра активности ферментов, дезаминирующих адениновые соединения. При облучении резко падает активность АТФ-дезаминазы, а активность АДФ-дезаминазы возрастает. После пострадиационной репарации клеток наблюдается рост активности всех исследованных дезаминирующих ферментов, что может быть связано с активацией метаболических процессов в ответ на экстремальное воздействие на клетки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Նալաաիրյան Լ.Հ., Մարտիրոսյան Ս.Վ. Խմորասնկային բջիջներից հիստոնային սպիտակուցների և ԴՆԹ-ի անջատումը և ֆլյուորեսցենտային ցուցանիշների համեմատական ուսումնասիրումը (ուսումնամեթոդական ձեռնարկ), ԵՊՀ հրատարակչություն, 40 էջ, 2006թ.:
2. Глазунов А.В. Роль репарации двунитевых разрывов ДНК в радиорезистентности дрожжевых клеток. Радиобиология, 30, вып.1, стр.3-16, 1990.
3. Давтян М.А., Навасардян Л.А., Барсебян Э.Х., Арируни Н.А., Марутян С.В., Григорян Р. Белковые фракции организмов при экстремальных состояниях. Труды III Международного Симпозиума “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии”, посвященной 100-летию со дня рожд. академика Н.М. Сисакяна, Дубна, с.289-297, 2007.
4. Навасардян Л.А. Биосинтез водорастворимых белков дрожжей *C.guilliermondii* ВКМ У-42. Ученые записки ЕГУ, вып.1, стр.145-147, 2003г.
5. Навасардян Л.А., Марутян С.В., Давтян М.А. Изменение флюоресцентных показателей ДНК дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4 под влиянием рентгенов-ского облучения и репарации. 2 Международный симпозиум “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии. Труды”, 2, Москва-Дубна, стр.121-125, 2002.
6. Calis M, Ates F, Yazici C, et al. Adenosine deaminase enzyme levels, their relation with disease activity, and the effect of colchicine on adenosine deaminase levels in patients with Behcet's disease. Rheumatol Int., 25, 452-6, 2005.
7. Daly MJ, Galdamkova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhal M, et al. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. PLoS Biol 5(4): e92 doi:10.1371/journal.pbio.0050092, 2007.
8. Gaspar HB, Bjorkegren E, Parsley K et al. Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. Mol. Ther., 14, 505-13, 2006.
9. Iwaki-Egawa S, Namiki C, et al. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal aminoacid sequence. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mil. Biol., 137, 247-54, 2004.
10. Zelingson D., Zelingson H.J. Microdiffusion method for determination nitrogen liberated as ammonia. Lab. Clin. Med., 38, 1951.

Поступила 14.07.2011