

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент Олексій Юрійович Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____2024 р.

**ВПЛИВ РІВНЯ ФОСФОРУ НА ДИФЕРЕНЦІАЦІЮ КЛІТИН В
КОЛОНІЯХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності 091 Біологія
ОП «Біоінформатика та структурна біологія»
Коберник Вікторії Андріївни

Науковий керівник
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Нипорко Олексій Юрійович

Робота виконана у відділі фізіології промислових організмів
Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
під керівництвом к.б.н. **Грецького І.О**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Загальна характеристика процесу диференціювання клітин <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.1.1. Характеристика біологічних особливостей представників виду <i>Saccharomyces cerevisiae</i> як модельного організму вивчення клітинного диференціювання.. ..	9
1.1.2. Фази розвитку культури та типи морфологічного диференціювання клітин сахароміцетів.	13
1.2. Загальна характеристика поліфосфатів, та їх участь у регуляції клітинного метаболізму сахароміцетів.	18
1.2.1. Загальна характеристика поліфосфаткіназ, екзополіфосфаткіназ та ендополіфосфаткіназ.	20
1.3. Загальна характеристика методів, які застосовуються для вивчення диференціювання клітин.....	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
2.1. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі.....	33
2.2. Характеристика штамів, використаних у роботі, та умови їхнього культивування.....	34
2.3. Визначення структури та особливостей ендо(екзо)фосфатази сахароміцетів	35
2.4. Визначення швидкості радіального росту колоній, а також розміру клітин сахароміцетів і наявності гранул методом проточної цитофлуориметрії.....	36
2.5. Статистична обробка результатів.....	37
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	39
3.1 Дослідження впливу різної концентрації фосфору в середовищі культивування на якісні та кількісні характеристики клітин батьківського та мутантного штамів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
3.1.1. Характеристика морфологічних особливостей та швидкості радіального росту колоній сахароміцетів.....	40

3.1.2. Дослідження залежності розміру та внутрішньоклітинної організації від концентрації фосфору в клітинах сахароміцетів за різної фази розвитку..	47
3.2. Дослідження еволюційних зв'язків основних поліфосфатів сахароміцетів.....	56
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	58
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	61
Додаток 1.....	69

АНОТАЦІЯ

Коберник В.А. Вплив рівня фосфору на диференціацію клітин в колоніях *Saccharomyces cerevisiae* – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП “Біоінформатика та структурна біологія”.

У роботі було досліджено вплив різної концентрації фосфору на клітинне диференціювання клітин представників *Saccharomyces cerevisiae*. Для дослідження цього було обрано 2 штами, один з яких є батьківським, інший мутантним, в геномі якого наявний дефектний ген *ppn1*, продуктом експресії якого є (ендо-)екзополіфосфатаза PPN1. Встановлено, що за підвищення концентрації фосфору в середовищі культивування відбувається пришвидшений перехід із експоненціальної фази розвитку в стаціонарну, і відповідно пришвидшується диференціювання клітин на спеціалізовані. Також збільшення вмісту фосфору впливає на підвищення внутрішньоклітинної складності та розмірів цих клітин. Така залежність була встановлена для клітин батьківського штаму за концентрації фосфору 0,25 г/л, натомість для клітин мутантного штаму подібну ситуацію спостерігали за концентрації фосфору 0,5 г/л. Отримані результати можуть бути використані для пошуку нових методів та речовин, які можуть допомогти контролювати міжклітинні комунікації і, відповідно, етапи в сигнальних шляхах клітини.

Ключові слова: поліфосфати, клітинне диференціювання, проточна цитофлуориметрія, L-клітини, U-клітини, міжклітинні комунікації.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСМ	– атомна силова мікроскопія
Полі(Ф)	– поліфосфати
VTC	– вакуолярний шаперон-транспортний комплекс (<u>V</u> acuolar <u>T</u> ransporter <u>C</u> haperone)
FSC	– детектор прямого розсіювання (<u>F</u> orward <u>s</u> catter)
SSC	– детектор бічного розсіювання (<u>S</u> ide <u>s</u> catter)
YPD	– декстрозо-пептон-дріжджовий агар (<u>Y</u> east extract <u>P</u> eptone <u>D</u> extrose)

ВСТУП

Аналіз і моделювання структури поліфосфатів є важливим напрямом досліджень, оскільки поліфосфати виконують ключову роль у регуляції енергетичного обміну клітин. Поліфосфати, завдяки своїм унікальним хімічним властивостям і здатності до накопичення енергії у вигляді макроергічних зв'язків, виступають важливими регуляторами багатьох клітинних процесів, включаючи метаболізм, сигнальні шляхи та стресові реакції. Аналіз структури поліфосфатів включає вивчення їхньої хімічної будови, зокрема кількості фосфатних залишків, типів зв'язків між ними та просторової конфігурації. Використання спектроскопічних методів (наприклад, ядерного магнітного резонансу або інфрачервоної спектроскопії) дозволяє отримати детальну інформацію про структурні особливості поліфосфатів у клітинах різних організмів. Моделювання структури поліфосфатів включає застосування комп'ютерних методів, таких як молекулярна динаміка та квантово-механічні розрахунки, для передбачення поведінки поліфосфатних ланцюгів у різних фізіологічних умовах. Такі моделі допомагають зрозуміти механізми стабільності поліфосфатів, їх взаємодію з іншими молекулами та їхній вплив на енергетичний обмін.

Прогнозування стану енергетичного обміну на основі аналізу поліфосфатів є перспективним підходом, оскільки зміни у вмісті та структурі поліфосфатів можуть бути маркерами метаболічного стану клітини. Наприклад, високий рівень поліфосфатів може свідчити про активну фази анаболічних процесів, тоді як їхнє зниження може вказувати на катаболічний стрес або енергетичний дефіцит. Таким чином, моніторинг поліфосфатів може бути використаний для ранньої діагностики метаболічних розладів або

адаптаційних реакцій на стресові умови. Актуальність цього напрямку досліджень зумовлена широким спектром застосувань у біології та медицині. Розуміння ролі поліфосфатів у регуляції енергетичного обміну відкриває нові можливості для розробки терапевтичних стратегій при захворюваннях, пов'язаних з метаболічними порушеннями, таких як цукровий діабет, ожиріння та нейродегенеративні захворювання. Крім того, ці знання можуть бути застосовані у біотехнології для оптимізації виробничих процесів, що вимагають регуляції енергетичних ресурсів клітин. Особливо важливо керувати процесами міжклітинних взаємодій, які необхідні для розробки сучасних методів боротьби з різними патологіями та захворюваннями еукаріотичних організмів, а також для створення методик зміни характеру міжклітинних комунікацій і, відповідно, керування механізмами передачі сигналів між клітинами. Вивчення комунікаційних процесів дозволить ефективно впливати на широкий спектр біологічних явищ, включаючи біотехнологічні виробництва. Розв'язання проблеми міжклітинних взаємодій є важливим як для теоретичної, так і для практичної біології та медицини, оскільки воно дозволяє вирішувати такі питання, як морфогенез, онкогенез, формування біоплівки тощо [1]. Вивчення кооперативної поведінки клітин ускладнюється через принципові відмінності експериментальних даних, отриманих в умовах *in vivo* та *in vitro*. Наприклад, клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* є найбільш простою моделлю для дослідження поведінки еукаріотичних клітин [2]. Завдяки цьому вони можуть бути використані для вивчення механізмів міжклітинної взаємодії. Зокрема, клітини у колоніях цих дріжджів мають різну локалізацію та функціональну активність, що дозволяє колонії існувати як єдина цілісна структура [3].

На сьогоднішній день відомо багато сигнальних молекул, які беруть участь у міжклітинних взаємодіях. Однак, залишається актуальним питання вивчення молекул, які є еволюційно консервативними (хімічно однаковими для організмів різного рівня організації) та беруть участь у комунікаційних процесах клітин. Можливо, поліфосфати, завдяки своїй

поліфункціональності та наявності у вигляді поліфосфатних гранул в організмах різного еволюційного рівня, можуть бути універсальними молекулами, що регулюють міжклітинні взаємодії. Це припущення підтверджується дослідженнями Brown і Kornberg [1], які встановили участь поліфосфатів у формуванні біоплівки, системі хімічної комунікації та інших процесах.

Серед сучасних методів дослідження, що можуть бути ефективно використані для вивчення комунікаційних відносин між клітинами в колоніях дріжджів, особливо виділяється проточна цитофлуориметрія. Цей метод дозволяє аналізувати структуру популяції, явища апоптозу та некрозу [4].

З огляду на вищеперераховане метою нашої роботи було встановлення впливу різної концентрації фосфору на диференціацію клітин в колоніях штамів представників виду *Saccharomyces cerevisiae*.

Для виконання цієї мети були поставлені такі завдання:

- 1) провести якісне та кількісне дослідження ізольованих колоній сахароміцетів впродовж різних фаз розвитку за різної концентрації фосфору;
- 2) дослідити вплив зміни вмісту фосфору в середовищі культивування на розміри та внутрішньоклітинну складність батьківського та мутантного штамів представників виду *Saccharomyces cerevisiae*;
- 3) надати характеристику щодо функціональності окремих органел клітин обоз штамів за різної концентрації фосфору;
- 4) побудувати філогенетичне дерево поліфосфатів сахароміцетів на основі амінокислотної та нуклеотидної послідовності для розуміння їх еволюційних зв'язків.

Експериментальну частину роботи було виконано у відділі фізіології промислових організмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під керівництвом к.б.н. Грецького І.О. та відділі біохімії, фізіології та молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика процесу диференціювання клітин *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1. Характеристика біологічних особливостей представників виду *Saccharomyces cerevisiae* як модельного організму вивчення клітинного диференціювання. Вид *Saccharomyces cerevisiae* належить до царства *Fungi*, типу *Ascomycota*, класу *Saccharomycetes*, порядку *Saccharomycetales*, родини *Saccharomycetaceae*, роду *Saccharomyces* [2]. До представників цього виду належать понад 1000 штамів, 65 % з яких відносяться до природнього типу, що були виділені із різних об'єктів.

Представники вищезгаданого виду належать до мікроскопічних одноклітинних грибів, їх клітини утворюють скупчення в результаті брунькування або рідше розташовуються поодинокі [3]. Клітини сахароміцетів можуть мати різні форми, такі як куляста, овальна, видовжена, циліндрична, еліпсоподібна або грушоподібна, і їх розмір зазвичай коливається від 5 до 10 мікрометрів (рис. 1.1) [5,6]. Морфологія клітин може змінюватися внаслідок маніпуляцій, які здійснюються в процесі селекції комерційних штамів *S. cerevisiae*, а також через зміну фаз життєвого циклу. Наприклад, гаплоїдні клітини розміром 4 мікрометри набувають сферичної форми, тоді як діаметр диплоїдних клітин, які мають еліпсоїдну форму, зазвичай становить від 5 до 6 мікрометрів [3]. Клітини сахароміцетів не

утворюють істинних гіфів, але можуть формувати псевдогіфи, які вважаються рудиментарними [5].



Рисунок 1.1. Сканувальна електронна мікрофотографія скупчення клітин штаму *S. cerevisiae* Yg, що виростили на середовищі YEPG за концентрації кисню 60 % [3].

Життєвий цикл *S. cerevisiae* складається з двох фаз, гаплоїдної та диплоїдної, які чергуються залежно від наявності харчових ресурсів та змін умов навколишнього середовища [7]. При наявності достатньої кількості поживних речовин переважає гаплоїдний цикл життя [8]. Під час цього циклу клітини розмножуються вегетативно шляхом утворення бруньок. Останні з'являються як виростки з материнської клітини поруч або на протилежних полюсах [3]. В утвореній дочірній клітині спочатку відбувається поділ ядра, потім формується клітинна стінка, і нарешті відбувається поділ клітини, коли брунька досягає певних розмірів [3,5]. Зрілою вважається материнська клітина, яка утворила більше ніж 20-30 бруньок [3]. Гаплоїдні клітини поділяються на два мейтингові типи: a та α [3,5,7,8]. Клітини типу a синтезують феромони типу a , тоді як клітини типу α виробляють феромони типу α . На поверхні клітин сахароміцетів є відповідні рецептори, які взаємодіють з феромонами протилежного типу, що сприяє процесу спарювання. [3,7]. Особливістю цього процесу є те, що можуть продукуватися лише спори одного мейтингову типу, а не обох [8]. Коли клітини розпізнають одна одну, вони починають утворювати вирости, що зустрічаються один з одним, створюючи форму, що називається "шму". Після

цього клітини зливаються, утворюючи диплоїдну клітину, яка містить значну кількість глікогену [3,7]. Це позначає початок диплоїдної фази життєвого циклу, під час якої диплоїдні клітини переходять в стан спокою [7]. Для збільшення площі доступу до поживних речовин, кількість яких зменшилась під час гаплоїдної фази, диплоїдні клітини формують псевдогіфи. Для збільшення доступу до поживних речовин, кількість яких зменшилась під час гаплоїдної фази, диплоїдні клітини формують псевдогіфи. Однак, при зменшенні кількості поживних речовин, необхідних для життєдіяльності клітин, активується преміотична S-фаза, і диплоїди проходять мейоз з утворенням 4 гаплоїдних аскоспор, які локалізуються в асках [5,7]. Це означає початок процесу споруляції, спричиненого зниженням кількості поживних речовин. Аскоспори можуть проростати за умов підвищення кількості харчового субстрату в середовищі (рис. 1.2) [3,7].

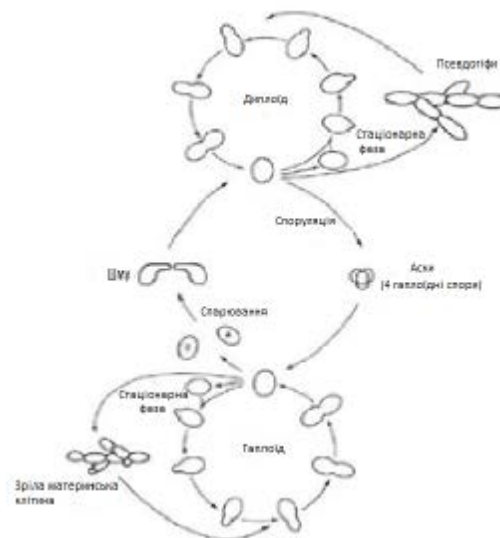


Рисунок 1.2. Схематичне зображення життєвого циклу *S. cerevisiae*.
Адаптовано з [3].

Клітинний цикл сахароміцетів складається із 4 фаз поділу – G1, S, G2, М (рис. 1.3) [10]. Коли клітина досягає мінімально необхідного розміру за участі цАМФ-залежної протеїнкінази, відбувається активування поділу – перша точка контролю (так званий “старт”) [7]. Клітинний цикл розпочинається із активації циклінів фази G1 (пресинтетичний розрив) під

дією циклінзалежної кінази (*cdc2/cdc13*), яку, своєю чергою, активує циклін *Cig2/cdc2* [7]. Відбувається фосфорилування специфічних білків-мішеней, що приводить до активування S фази. Протягом цієї фази відбувається ріст бруньки, який можна спостерігати в результаті мікроскопічного аналізу, а також реплікація ДНК та подвоєння тіл полюсів веретена поділу [10]. Під час постсинтетичного розриву (фаза G2) відбувається контроль реплікації ДНК (тобто, друга точка контролю) [7,10,11]. Цей процес також перебуває під контролем комплексу *cdc2/cdc13*. Якщо реплікація ДНК відбулася без помилок, то клітина переходить у стадію мітозу [10,11]. У випадку, коли веретено поділу сформувалося цілком та хромосоми приєдналися до нього правильно, тоді клітинний цикл підходить до завершення [10,11]. Тобто, під час входження в анафазу реалізується третя точка контролю [11]. За будь-яких проблем, що виникають під час клітинного циклу, в клітинах дріжджів функціонують 4 білки, які регулюють активність *cdc2/cdc13* – *Slp1*, *Ste9*, *Rim1*, *Wee1* [10]. Вони сприяють зупинці всього процесу до того моменту, поки всі помилки не будуть виправлені [10]. Зміна умов навколишнього середовища впливає на перемикання фаз життєвого циклу мікроскопічних одноклітинних грибів і пов'язана з клітинним диференціюванням, тобто утворенням нових спеціалізованих угруповань клітин, які є прототипом багатоклітинності.

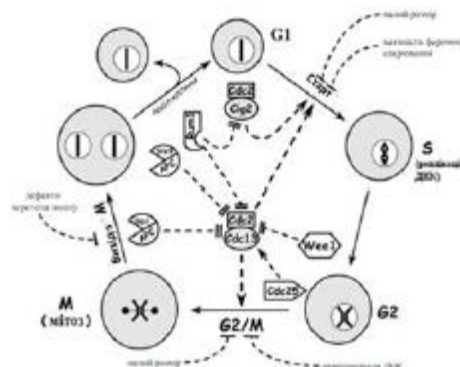


Рисунок 1.3. Схематичне зображення основних подій, переходів та контрольних точок, наявних в клітинному циклі сахароміцетів. Адаптовано з [10].

Модельним організмом для досліджень колоніального росту є представники *S. cerevisiae*, які є добре вивченими і є загальноприйнятим об'єктом для дослідження еукаріотичних організмів, адже клітини сахароміцетів містять всі основні органели, притаманні тваринній і рослинній клітинам та мають універсальну структуру.

1.1.2. Фази розвитку культури та типи морфологічного диференціювання клітин сахароміцетів. Впродовж розвитку культури дріжджів відбуваються зміни фаз життєвого циклу, що призводить до появи нових клітин. Дочірні клітини постійно утворюють скупчення, внаслідок чого формуються колонії мікроорганізмів, що є свідченням нормального розвитку культури. На ріст мікроскопічних одноклітинних грибів впливає низка чинників, зокрема таких як: наявність поживних речовин в середовищі, температура культивування та рівень рН. Оптимальна температура росту культури *S. cerevisiae* коливається в межах від 27 °С до 37 °С за слабокислого рН 4,2 - 5,0 [6]. Як джерело вуглецю сахароміцети використовують глюкозу, мальтозу, лактозу [6], джерело азоту – нітриту, нітрати, казеїн, аміак або сірчаноокислий амоній [6,7], а джерело фосфору – неорганічний фосфат [11]. Зміна будь-яких із цих показників призводить до збоїв у життєвому циклі клітин представників виду *S. cerevisiae*, внаслідок чого порушується розвиток культури. Зважаючи, що *S. cerevisiae* – це факультативні анаероби, наявність чи відсутність кисню суттєво не впливає на ріст їхніх клітин [6].

Ріст сахароміцетів у періодичній культурі, як і інших мікроорганізмів, описується чотирма основними фазами (лаг-фазою, логарифмічною, стаціонарною фазою та фазою відмирання культури) і може бути зображений типовою кривою росту (рис. 1.4) [12]. Під час трьох останніх фаз відбувається диференціювання клітин, в результаті чого з'являються спеціалізовані клітини дріжджів, яким притаманні унікальні функції. Зокрема, забезпечення взаємозв'язку між сформованими угрупованнями клітин [13]. Типи цих клітин залежать від характеристики середовища, на

якому культивуються *S. cerevisiae* [14]. У рідких середовищах залежно від фази розвитку культури можуть утворюватися Q- та NQ-клітини, тоді як на щільних середовищах – формуються L- і U-клітини [14,15].

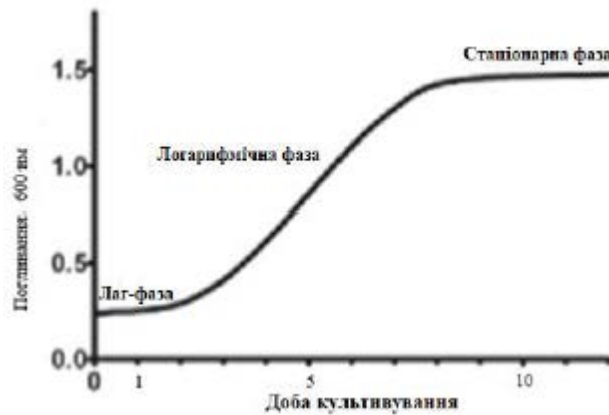


Рисунок 1.4. Типова крива росту *S. cerevisiae*. Адаптовано з [12].

Лаг-фаза – це фаза, під час якої клітини адаптуються до умов середовища. Тривалість цієї фази може бути різною і коливається в межах від 12 до 24 годин з моменту висіву клітин [14,15]. Відсутність в середовищі джерел карбону, азоту та фосфору призводить до порушення метаболічних та адаптаційних процесів. В результаті цього клітини не пристосовуються до умов середовища та гинуть.

Логарифмічна фаза може тривати від однієї (у випадку культивування в рідкому середовищі) до 4 - 5 діб (за культивування на щільному живильному середовищі). Це найактивніша фаза розвитку культури, під час якої клітини накопичують поживні речовини, що приводить до збільшення їхніх розмірів та активування поділу клітин. В експоненційній фазі окремо виділяють ще фази пришвидшеного та сповільненого росту. Під час фази пришвидшеного росту переважає мітохондріальне дихання клітин, в якому беруть участь спеціалізовані NQ-клітини, які отримали назву “неспокійних клітин” [14]. Ці клітини утворюються в рідких середовищах і містять незначну кількість глікогену та білків. На початку експоненційної фази відбувається перше динамічне вивільнення аміаку в середовище, що призводить до підвищення його концентрації [16]. Тому культуральна рідина на цій фазі розвитку культури характеризується лужним рН, що слугує сигналом для подальшого

виділення в середовище клітинами сахароміцетів значної кількості аміаку. Останній впливає на зміну фаз життєвого циклу клітин *S. cerevisiae*, а саме через зміну рівня рН з кислого на лужний і навпаки [13,17.]. Відбувається поступовий перехід від овальної форми клітин, які знаходяться на межах колоній, до утворення псевдогіфів із монополярним брунькуванням [13]. Появу бруньок у клітин сахароміцетів пов'язують із метаболічною фіксацією вуглекислого газу, який утворюється під час метаболізму глюкози [13,18]. Гетеротрофна фіксація CO₂ відбувається під час карбоксилювання фосфотріози під впливом карбоангідази, в результаті чого утворюється оксалоацетат [13,18], який в подальшому використовується в наступних фазах розвитку культури. За зниження рівня аміаку не відбувається утворення диплоїдних клітин, відповідно псевдогіфи також не утворюються, тобто колонії залишаються в попередніх розмірах. На ріст культури також певною мірою може впливати зміна концентрацій фосфору в середовищі культивування. За зниження концентрації фосфору в середовищі культивування клітини сахароміцетів не поділяються, але продовжують рости. Це призводить до порушення клітинного циклу, адже клітина, що утворилася, має занадто великий об'єм [14]. В результаті цього порушується перехід у наступну фазу росту – стаціонарну фазу.

Далі настає фаза сповільненого росту, яка потім переходить у ранню стаціонарну фазу. Перехід клітин у фазу сповільненого росту зумовлений виснаженням поживних речовин у середовищі культивування, адже після стрімкого збільшення кількості клітин вичерпується вільний субстрат. Оксалоацетат, який утворився під час фази прискореного розвитку культури, включається в цикл Кребса, що дозволяє клітинам мікроскопічних одноклітинних грибів адаптуватися та рости на середовищах з мінімальною кількістю поживних речовин [18]. Під час фази сповільненого розвитку ріст клітин гальмується та відбувається перемикання дихання із використанням глюкози на альтернативний варіант, за якого активується дихальний ланцюг [13-15]. Протягом цієї фази клітини *S. cerevisiae* за умов культивування на

щільних середовищах активно диференціюються, в результаті чого формуються верхній та нижній шари колоній. На цьому етапі є дуже важливим рівень вуглекислого газу в оточуючому середовищі, адже він може впливати на зміни в диференціювання клітин. Так, наприклад, за підвищення концентрації CO₂ клітини верхнього шару колоній синтезують карбоангідразу, що забезпечує метаболічну підтримку клітин нижнього шару та відповідно збільшення розмірів цього шару і рівня його адаптації [13].

На 4 - 10-ту добу культивування відбувається перехід клітин в стаціонарну фазу розвитку культури, під час якої кількість поживних речовин у середовищі зменшується. Клітини припиняють активний поділ і починають споживати накопичені поживні речовини. В результаті підвищується кількість продуктів життєдіяльності, що утворюються в процесі метаболізму. Під час цієї фази виникає другий динамічний імпульс виділення аміаку клітинами сахароміцетів у середовище культивування [16]. Це є наслідком адаптації клітин до стресу, тобто відбувається кардинальне перепрограмування метаболізму культури в цілому. Клітини починають споживати половину метаболітів, які були виведені клітинами у середовище, в тому числі і на попередніх фазах розвитку культури [16,19]. Ці явища пов'язують із пристосуванням клітин до довгострокового існування.

Під час стаціонарної фази розвитку культури в рідких середовищах переважають Q-клітини, або клітини спокою, які можуть синхронно входити в мітоз та ділитися [14,15]. Тобто, на відміну від NQ-клітин, Q-клітини набагато стійкіші та витриваліші [14]. На 7 – 10-ту добу розвитку культури на щільних середовищах за участі аміаку відбувається зміна рН з кислого на лужний, в результаті чого колонії розшаровуються на два чітко розмежовані шари [14,17,19,20]. Тобто, для утворення чіткої лінії розмежування потрібна достатня концентрація виділеного в середовище аміаку. Нижній шар колоній товщиною 200 мкм складається із L-клітин, які за розмірами дрібні (3 – 4 мкм) та містять одну вакуоль [17.]. Ці клітини чутливі до стресу та мають низьку життєздатність. Разом з тим вони служать харчовим субстратом для

верхнього шару, а також беруть участь в активуванні гліконеогенезу [15,17]. Верхній шар колоній складається із великих за розміром U-клітин (5 – 7 мкм), які містять кілька вакуолей та характеризуються значним вмістом глікогену [17]. Ці клітини стресостійкі та більш довговічні, ніж клітини нижнього шару [21,22]. За переходу клітин в стаціонарну фазу розвитку культури у верхньому шарі колоній утворюються спори. U-клітини верхнього шару, що утворюють спори, синтезують аміак у великій кількості, а клітини, локалізовані у нижньому шарі, не синтезують аміак і, відповідно, не утворюють спор [22]. На 15-ту добу культивування 50 % U-клітин та лише 10 % L-клітин можуть формувати нові колонії [17]. Властивості Q- та U-клітин є практично ідентичними, тобто накопичують глікоген та беруть участь в активуванні аутофагії. Однак U-клітини, на відміну від Q-клітин, залишаються метаболічно активними [14,15,17,20].

Фаза відмирання культури настає тоді, коли вичерпується субстрат для росту клітин. Під час цієї фази у клітин відбувається запрограмована клітинна загибель [23]. Вона може відбуватися шляхом апоптозу або аутофагією. Аутофагія – це регульована система загибелі клітин, внаслідок якої підтримується баланс між синтезом, деградацією внутрішньоклітинних компонентів і подальшим використанням метаболітів [29]. Апоптоз, на відміну від аутофагії, є природнім консервативним процесом і не призводить до порушення гомеостазу. Якісною ознакою збільшення кількості мертвих клітин в культурі є зміна кольору колоній від білого до коричневого в результаті зниження концентрації аденіну в середовищі [5,6].

Клітини вихідних штамів *S. cerevisiae* можуть формувати високо організовані структури, що забезпечують стійкість клітин до умов довкілля [13]. Прикладом таких складно організованих клітинних асоціацій є біоплівка, яка формується внаслідок адгезії клітин між собою та до різноманітних поверхонь [13,24]. Цей процес забезпечують адгезини, які характеризуються амілоїдними та гідрофобними взаємодіями [24]. В результаті чого формуються мікроколонії, клітини яких синтезують

екзополісахариди та інші сполуки, з яких формується позаклітинний матрикс [13,24.]. Після формування матриксу біоплівка дозріває [13]. Мікроколонії, що сформували біоплівки та позаклітинний матрикс, прийнято називати псевдогіфами. Останні забезпечують більш стійке прикріплення до субстрату та міцність біоплівки [13,24].

Представники виду *S. cerevisiae* є ідеальним об'єктом для дослідження клітинного диференціювання, адже клітини сахароміцетів утворюють різноманітні спеціалізовані структури, які забезпечують міжклітинний взаємозв'язок та пристосованість клітин в колоніях до різних умов навколишнього середовища.

1.2. Загальна характеристика поліфосфатів, та їх участь у регуляції клітинного метаболізму сахароміцетів.

Поліфосфати (поліФ) структурно надзвичайно прості, які складаються від 3 тисяч фосфатних залишків, з'єднаних високоенергетичними фосфоангідридними зв'язками [24-26]. За рН (фізіологічного) кожна фосфатна одиниця має одновалентний негативний заряд, що приводить до того, що поліФ характеризується як аніонний полімер (рис. 1.5). ПоліФ є дуже поширеним в органічному світі та входять до складу як прокариотичних, так і еукаріотичних клітин у вигляді гранул завдяки своїй хімічній структурі [24]. Ці поліфосфатні включення є багатофункціональними та грають вирішальну роль у багатьох біологічних процесах. Особливу роль поліФ відіграють в адаптивній реакції та відповіді на стрес у мікроорганізмів [31]. Вони залучені до транспорту речовин всередину клітини, а також впливають на експресію генів.

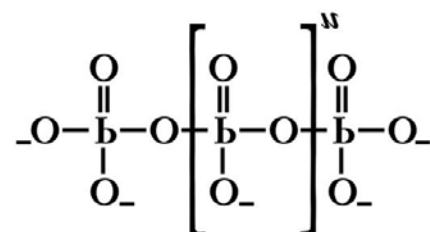


Рисунок 1.5. Структура неорганічного поліФ [25].

Еволюційно вони походять з абіотичного періоду та притаманні усім живим істотам від бактерій до людини [1]. Дані з давніх джерел вказують на те, що поліфосфати називали молекула-резервуар внутрішньоклітинного фосфату [26]. Наявність макроергічного зв'язку в цих біополімерах забезпечувало мікроорганізми енергією на початкових етапах розвитку життя на Землі. Згодом участь поліфосфатів в енергетичному обміні була пов'язана з утворенням АТФ [27,28]. Останній процес допомагав мікроорганізмам накопичувати поліФ під час голодування та стресу від негативних наслідків змін в екології [25]

Присутність поліфосфатних гранул в клітинах організмів, що перебувають на різних етапах еволюційного розвитку, засвідчує та підкреслює їхню важливу роль як регуляторних молекул у корекції клітинного метаболізму на генетичному і ензиматичному рівнях [29,30]. У бактерій поліФ бере участь у стрес-реакції, вірулентності, клітинній рухливості, формування біоплівки, функціонує як універсальний металохелатуючий агент, бере участь в синтезі полі-3-гідроксибутирату, у дріжджів – бере участь в реакції на окислювальний стрес, забезпечує фосфатним резервом та стресову відповідь клітини, у ссавців – слугують резервом фосфору для утворення та формування кісток, відіграє роль в згортанні крові, бере участь в каскадах передачі сигналів [26,31]. Це вказує на те, що поліФ займає вагому ланку у регулюванні процесами, які відбуваються в організмах різних еволюційних рангів. Слід зауважити, що поліфосфати реагують на зміни умов середовища [27]. Зокрема, досліджено зміни їхньої активності за дефіциту джерел фосфору та карбону [32,33].

Також, вони беруть участь у перемиканні генетичних програм, наприклад, за переходу популяції до стаціонарної фази розвитку і виживанні клітин у стресових умовах [34-37]. Окрім того, поліфосфати можуть взаємодіяти із сигнальними молекулами, зокрема JAK/STAT сигнального

шляху, змінюючи їхню активність і тим самим опосередковано впливати на перебіг відповідних сигнальних шляхів [37,38].

1.2.1. Загальна характеристика поліфосфаткіназ, екзополіфосфаткіназ та ендополіфосфаткіназ. Ферменти, які відповідають за біосинтез та відщеплення фосфатних залишків від поліФ-ланцюгів називаються поліфосфаткінази (синтез) і ендо- та екзополіфосфатази (деградація). Ці ферменти були знайдені як в клітинах прокариотів, так і в еукаріотів. Було встановлено, що вони вищезгадані ферменти відіграють важливу роль у енергетичному обміні. Дефекти в генах, які кодують поліфосфатази, можуть призвести до втрати клітинними таких властивостей, як рухливість, формування біоплівки, вірулентність, реакції та стрес та інші [39,40]. У бактерій шлях метаболізму поліфосфатів вивчений достатньо добре, однак у дріжджових клітинах він залишається недостатньо зрозумілим, особливо щодо особливостей їхнього синтезу та участі в процесах клітинної комунікації. Були виявлені біологічні особливості полі(Ф)-залежних ферментів у прокариотів та еукаріотів. Деякі з цих ферментів присутні лише у прокариотичних організмів, тоді як інші - у еукаріотичних організмів [41].

Поліфосфати у клітинах сахарміцетів в основному синтезуються та накопичуються у вакуолях, а також в незначній кількості – в ядрі, мітохондріях та цитозолі. Синтез, зберігання та деградація поліФ в клітинах дріжджів відбувається за допомогою вакуолярного шаперон-транспортного комплексу (**V**acuolar **T**ransporter **C**haperone, VTC) [26,42]. Цей комплекс є інтегральним мембранним гетеролігомером, до складу якого входить чотири білкових субодиниці: Vtc1, Vtc2, Vtc3, Vtc4 (рис. 1.6). [26,42,43]. Невелика субодиниця Vtc1 складається із 3 трансмембранних α -спіральных білків. На відміну від 3 інших субодиниць, до складу Vtc1 не входить гідрофільний N-кінцевий домен [42]. Всі три субодиниці Vtc2, Vtc3, Vtc4 є схожими та

містять трансмембранний домен (основний), 2 гідрофільні цитоплазматичні домени та N-кінцеві домени [44]. Субодиниця Vtc4 каталітично активна та має високу спорідненість до АТФ, за рахунок чого відповідає за синтез поліфосфатів з АТФ за участі іонів металів (Mn^{2+}) [42,43]. Обидві субодиниці Vtc2, Vtc3 відіграють подібну функціональну роль в цьому комплексі, а саме регулюють рівень активності каталітичної субодиниці. Основна відмінність між двома вищезгаданими субодиницями полягає у різній заміні залишку лізину в 458 положенні, який бере участь в каталізі Vtc4. У другій субодиниці залишок лізину в 458 положенні замінений на ізолейцин, а в третій субодиниці – на лейцин [42,43]. VTC комплекс може існувати у вигляді 2 субкомплексів, які відрізняються між собою за локалізацією і, відповідно, виконують різні функції [43,44]. Перший Vtc1/Vtc3/Vtc4 підкомплекс локалізований на вакуолярній мембрані та є основним, оскільки забезпечує фосфатне живлення клітини. Другий Vtc1/Vtc2/Vtc4 підкомплекс здебільшого розташований на мембрані ендоплазматичної сітки або ядерній оболонці та відповідає за активність топоізомерази 1 [42]. Також останній комплекс може локалізуватися у вакуолі за умови недостатньої кількості джерел фосфору [44]. Також існує додаткова Vtc5 субодиниця, з якою асоціюється ядро комплексу [45]. Було досліджено, що Vtc5 фізично взаємодіє з комплексом VTC і прискорює накопичення синтезованого ним поліР, а саме видалення VTC5 зменшує накопичення поліФ *in vivo* та *in vitro* [46].

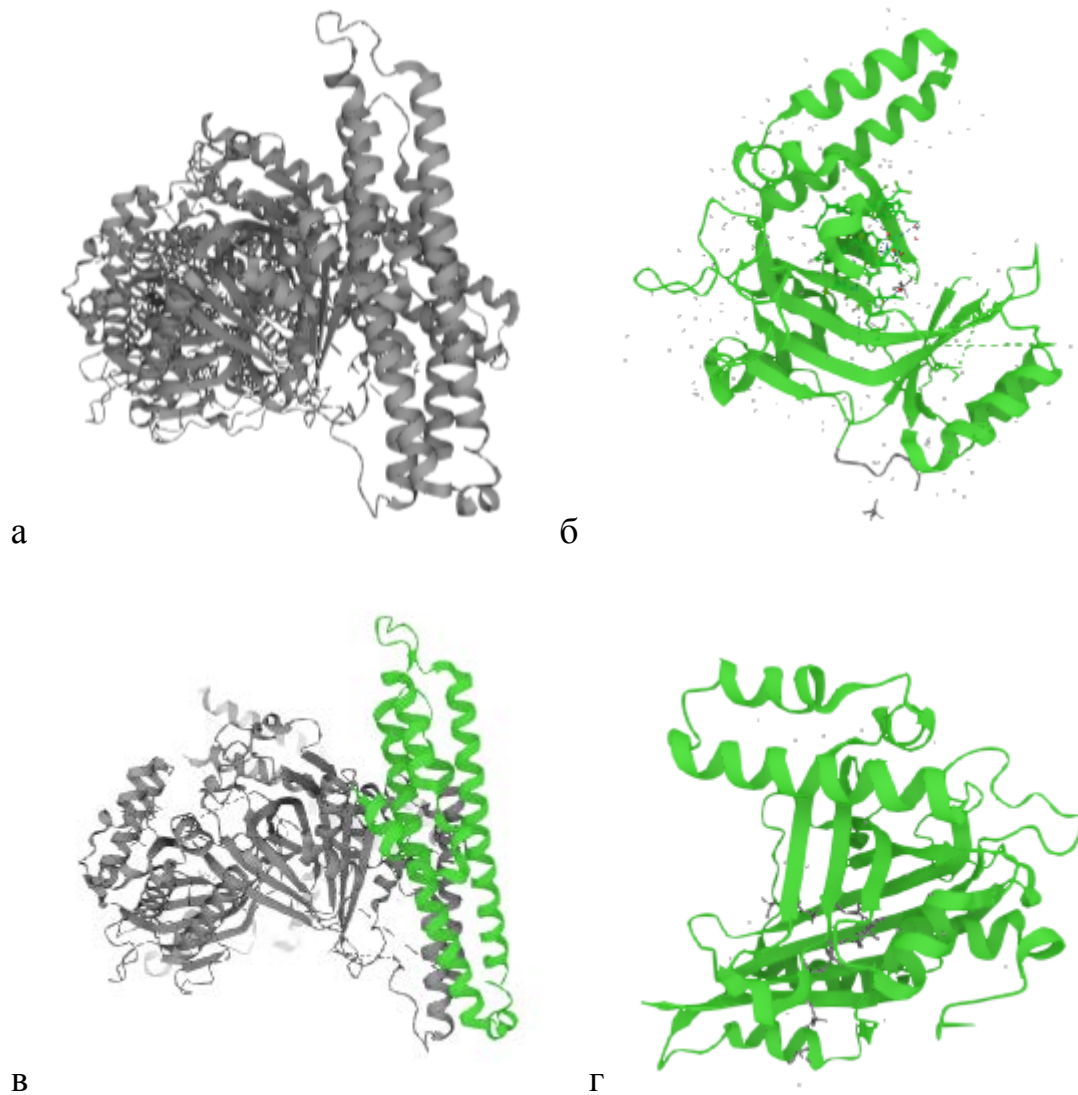


Рисунок 1.6. 3-D структура білкових субодиниць компелксу VTC. а – Vtc1; б – Vtc2 (зеленим позначена подібний домен до домену Vtc3); в – Vtc3 (зеленим позначена подібний домен до домену Vtc2); г - – Vtc3 (зеленим позначений основний домен).

До системи деградації поліфосфатів у сахароміцетів також входять різні ферменти, які відрізняються між собою за екзо- та ендополіфосфатазною активністю. Першими загальновідомими екзо- та ендополіфосфатазами були , Ppx1 та Ppn1, відповідно [47]. До екзополіфосфатаз цих мікроорганізмів належить фермент Ppx1, який відповідає за відщеплення залишків фосфатів з кінця полімерного ланцюга з утворенням фосфатидилінозитулу Pi та пірофосфату PPi [37,42]. Цей ензим складається з однієї субодиниці з 397 амінокислотних залишків

молекулярною масою 40-45 кДа та належить до родини фосфоестераз ДНН (рис. 1.7) [47,48]. Було виявлено, що субодиниця Ppx1 має два структурні домени, N- та С-кінцеві домени, між якими є канал, до складу якого входять позитивно заряджені амінокислоти. Останні в свою чергу є провідниками для поліФ та їх місцем гідролізу [47]. Цей ензим здебільшого локалізований в цитоплазмі або ядрі, та забезпечує зменшення кількості поліфосфатів в клітині, а також за захист від окисного стресу за рахунок гідролізу цАМФ.



Рисунок 1.7. 3-D структура Ppx1.

Іншим ферментом системи деградації поліфосфатів у сахароміцетів є ензим Ppn1, який має екзо- та ендополіфосфатазною активність. Остання активується за рахунок АДФ, але інгібується АТФ [49]. За будовою цей фермент є гомотетрамером, що містить один N-кінцевий трансмембранний домен з молекулярною масою 33-35 кДа (рис. 1.8) [42,47,48]. До складу субодиниці Ppn1 входять кілька передбачуваних сайтів глікозилювання та убіквітування [47]. Цей ензим має різні функціональні активності, зокрема забезпечує: гідроліз гуазинтетрафосфатів, цАМФ, ГТФ та дАТФ [48]. Фермент Ppn1 локалізується здебільшого в мембрані вакуолі, однак, під час переході із стаціонарної фази росту до утворення бруньок за надлишку фосфатів та глюкози цей фермент може приймати цитоплазматичну форму [50]. Ендополіфосфатаза 1 надходить до вакуолі за участі мультивезикулярних тілець, які руйнуються за дії вакуолярних протеаз, в результаті чого вивільняється цей фермент [42]. Останній розщеплює

ланцюги поліфосфатів переважно по центру, утворюючи більш короткі ланцюги. Також розщеплення полі(Ф)-ланцюгів може відбуватися за механізмом, який використовують екзополіфосфатази. Однак, на відміну від ферменту Ppx1, кінцеві продукти реакції розщеплення за участі вищеописаного езиму є фосфатидилінозитол P_i та трифосфат P₃ [42]. Синтез ферменту активується за фосфатного голодування клітин сахароміцетів.

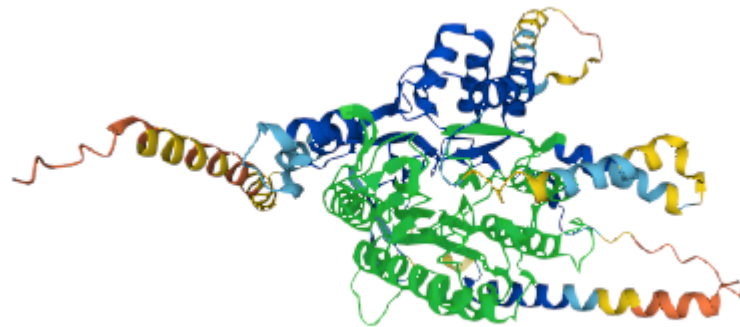


Рисунок 1.8. 3-D структура Ppn1.

Для дослідження ролі поліфосфатів у життєвих та клітинних процесах зазвичай використовують клітини сахароміцетів, адже вони вважаються дешевим матеріалом та надзвичайно швидко розмножуються. Штами, в геномі яких наявні мутації за генами ppx1 та ppn1, характеризуються низькою життєздатністю [39], однак ендополіфосфатази сахароміцетів можуть частково або повністю компенсувати активність ферментів Ppx1 та Ppn1. Обидва згадані ферменти беруть участь в JAK/STAT сигнальному шляху, що забезпечує передачу інформації від позаклітинних сигналів до промоторів генів в ядрі з подальшим активуванням процесу трансляції [51]. Хоча, ензим Ppn1 в цьому сигнальному шляху відіграє більш важливу роль, оскільки інгібує SOCS1 та дефосфорилує STAT1 в ядрі [51].

Тобто, злагоджена функціональна активність цих двох ферментів забезпечує нормальне протікання JAK/STAT сигнального шляху, в результаті якого формується відповідь клітин на певний зовнішній сигнал, тобто адаптацію цих клітин до змін в навколишньому середовищі.

Клітини *S. cerevisiae* мають високий рівень неорганічного поліфосфату та метаболічну систему, яка складається з багатьох компонентів [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31175919/>] Крім вищезгаданих ферментів до ендополіфосфатаз належить ще два ферменти – Ddp1 та Ppn2. Ендополіфосфатази розщеплюють поліфосфати інакше, а саме гідролізують полі(Ф)-ланцюги по центру, в результаті чого утворюються коротші ланцюги, які потім знову розщеплюються, внаслідок чого утворюються триполіфосфати [49]. Особливістю згаданих ендополіфосфатаз є те, що вони можуть компенсувати активність інших ферментів сахароміцетів. Фермент Ddp1 – це білок, який складається з однієї субодиниці, та належить до родини гідролаз Nudix [42,48]. Andreeva і співавтори [48] охарактеризували цей ензим як дифосфоінозитолполіфосфат фосфогідролазу з молекулярною масою 21 кДа [48]. Цей фермент бере участь в метаболізмі інозитолпарофосфатів. Він локалізується переважно в цитоплазмі, хоча в незначній кількості може бути наявний в ядрі [42]. Ендополіфосфатаза 2 була описана відносно нещодавно та віднесена до надродини металофосфатаз [48]. Вона складається з однієї субодиниці з молекулярною масою 37 кДа. Основна функція цього ферменту полягає у деполімеризації поліфосфатних включень у вакуолях, де він безпосередньо локалізований [43].

1.3. Загальна характеристика методів, які застосовуються для вивчення диференціювання клітин

Коли розвиток культури переходить із однієї фази в іншу, відбуваються розшарування колоній, тобто горизонтальне та вертикальне диференціювання клітин, які мають різну морфологічну форму та фізіологічні показники. Тому для вивчення клітинного диференціювання в колоніях сахароміцетів потрібно вивчати клітини із центра та периферії колонії окремо та порівнювати отримані показники.

Для вивчення морфології та фізіологічної активності клітин, взятих із різних шарів колонії, застосовують метод атомно-силової мікроскопії (АСМ).

АСМ – це інструмент з високою роздільною здатністю, який використовується для сканування та отримання зображення молекул та окремих атомів на поверхні зразка [50,51]. АСМ був винайдений у 1986 році Г. Біннінгом, К. Куейтом і К. Гербером [51]. Принцип дії АСМ полягає у виникненні атомно-силових сил між мікроскопичним наконечником та поверхнею досліджуваного зразка. Наконечник зазвичай виготовляється з керамічного напівпровідникового матеріалу (найчастіше монолітний кремній) та прикріплюється до вільного кінця кантилеверу (рис. 1.9) [50,52]. Разом вони працюють як датчик АСМ, за рух якого відповідає механічний привід. Завдяки тому, що мікрокантилевери дуже тонкі і виготовлені із кремнію або нітриту, за рахунок цього вони дуже гнучкі, що дозволяє кантилеверу прогинатися в момент, коли кінчик проходить по нерівній поверхні [50].

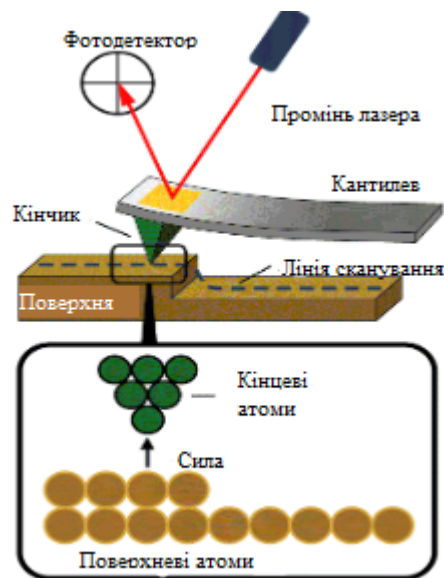


Рисунок 1.9. Принцип роботи атомного силового мікроскопу. Адаптовано з [52].

Існує два режими роботи АСМ, а саме, коли кінчик м'яко торкається поверхні (статичний) і коли коливається над нею (динамічний) [50]. Під час руху наконечника по поверхні між ними відбувається взаємодія, в результаті якої діють сили притягання та відштовхування (Ван-дер-Ваальсові, електростатичні, електромагнітні, сольватаційні та капілярні) [50,52]. Ця

взаємодія викликає позитивний або негативний вигин кантилеверу. Кут та амплітуда цього вигину виявляється за допомогою лазерного променя, що відбивається від зворотного боку кантилеверу [52]. Після отримання певних значень перетворювач надсилає їх до регулятора зворотнього зв'язку, який порівнює отримані дані із фактичними, які були встановлені на початку [50]. Результатом цього є створення 2-D та 3-D зображення, які дозволяють візуалізувати дуже дрібні елементи на поверхні зразка, а також охарактеризувати саму поверхню (дефекти, шорсткість, наявність плівки і т.д.)

АСМ характеризується високою роздільною здатністю, однак для того, щоб його використовувати, потрібні спеціальні навички. Однак, метод АСМ вважається одним із найточніших та найпоширеніших інструментів мікроскопії, адже він може передавати інформацію про найменші відомі науці частинки. За допомогою АСМ за різних умов середовища можна одразу отримати якісні показники, під час дослідження яких можливо вносити зміни та безпосередньо керувати ними.

Для дослідження диференціювання клітин універсальним методом вважають проточну цитофлуориметрію. Проточна цитофлуориметрія – це метод, за допомогою якого можна визначати кількісні та якісні характеристики клітин [4,53-55]. Під час застосування цього методу можна визначати розмір, кількість і життєздатність клітин, а також функціональну активність окремих органел і наявність РНК та ДНК [54]. Крім того, в процесі дослідження можна розділяти клітини за морфологічними показниками [4]. На сьогоднішній день існують різноманітні варіанти проточної цитофлуориметрії, що відрізняються між собою тим, з якою метою вони застосовуються. Наприклад, для дослідження параметрів (несортувальна) чи для сортування клітин (сортувальна).

Проточна цитофлуориметрія це метод, який полягає у виявленні здатності клітин, що спрямовано проходять через потік рідини в капілярі, розсіювати світло, яке падає на ці клітини, в результаті чого виникає

флуоресценція [4,55]. Випромінювання флуоресценції та її інтенсивність дозволяє оцінити структурні та морфологічні особливості клітин [55]. Проточний цитофлуориметр складається з трьох основних систем: капіляри з рідиною, оптична система та електронне забезпечення (рис. 1.10) [53]. Гідродинамічна система, до складу якої входить рідина в капілярі, в якому створюється тиск, що дозволяє спрямовувати потік рідини, в якій містяться досліджувані клітини. Зазвичай в якості рідини використовується буферний фізіологічний розчин [4]. Потім за допомогою потоку рідини дослідний матеріал потрапляє до проточної комірки, де клітини розташовуються послідовно, а на них спрямовується лазерний промінь. Лазерний промінь фокусується лише на одній клітині [4,53]. Розсіяне світло аналізується за допомогою детекторів прямого (Forward scatter, FSC) та бічного (Side scatter, SSC) розсіювання (див. рис. 1.10) [53,54]. FSC дозволяє виміряти інтенсивність світла в напрямку оптичного шляху джерела падіння, що розташовується в напрямку досліджуваних зразків, і прямопропорційне їхньому розміру та площі поверхні [53,54]. SSC ж дозволяє виміряти кут заломлення, що виникає між відбитим та заломленим світлом, і пропорційне складності внутрішньої організації клітини [53]. Детектори забезпечують отримання інформації про морфологічні та структурні особливості досліджуваних зразків [54]. У оптичну систему також входять флуоресцентні детектори (FL1, FL2, FL3), які мають різні спектри поглинання, відповідно до спектрів поглинання використаних барвників [53,54]. Нині існує до 50 параметрів (детектори прямого та бічного розсіювання та 48 флуорисцентних параметрів), які входять до оптичної системи, однак, вони не дуже поширені [56]. До найбільш поширених флуорисцентних детекторів відносяться: 488 нм (синій), 405 нм (фіолетовий), 532 нм (зелений), 561 нм (зелено-жовтий), 640 нм (червоний) і 355 нм (ультрафіолет) [56]. Також до цієї системи входять дихроїчні фільтри, які спрямовують флуоресцентне світло, яке випромінює клітина на конкретні детектори [56]. Коли розсіяне світло потрапляє на FL1 – FL3, флуорохроми, що є частиною цих детекторів,

поглинають світло. Це призводить до випромінювання, інтенсивність якого визначає довжину хвилі, характерну для спектра поглинання флуорохрому [53,56]. Диффракційні фільтри – це фільтри з певною довжиною хвилі, які пропускають коротші або довші довжини випромінюваного світла [56].

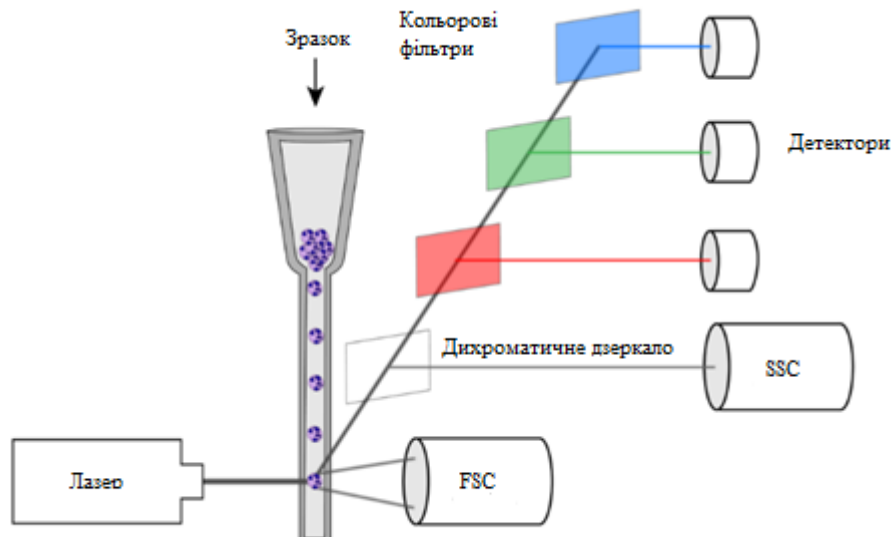


Рисунок 1.10. Схематичне зображення проточного цитофлуориметра. Адаптовано з [57].

Після отримання сигналів детектори перетворюють їх у електричний струм, який подається на аналого-цифрові перетворювачі (АЦП). Потім ця інформація передається на лінійні та логарифмічні підсилювачі. Після цього дані зберігаються за допомогою комп'ютерної системи у стандартному форматі проточної цитометрії, який включає опис аналізованої клітини за чотирма параметрами (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3) [4,53-55].

Проточна цитофлуориметрія відрізняється високою чутливістю, що досягається завдяки різноманітним детекторам, які можуть бути використані під час аналізу. Цей метод має широке застосування через свою універсальність, яка спрощує проведення досліджень. Зокрема, використовуючи проточну цитофлуориметрію, можна досліджувати проліферацію клітин з використанням флуоресцентних барвників, таких як

карбоксіфлуоресцеїн сукцинімідилового ефіру, інтенсивність яких зменшується з кожним поділом [54].

Також до найбільш сучасних методів дослідження та порівняння компонентів клітини, зокрема білків та генів відносяться біоінформатичні методи дослідження, що включають використання різних баз даних для пошуку інформації, вирівнювання послідовностей (наприклад, амінокислотних) та їх вирівнювання. І це тільки мінімальна частина того, що можна зробити за допомогою цих методів. До найбільш відомої бази даних, в якій наявна вся відома інформація в прикладному науковому світі на сьогоднішній день, відноситься база Національний центр біотехнологічної інформації (National Centre for Biotechnology Information, NCBI). NCBI був створений як підрозділ Національної медичної бібліотеки (НМБ) у 1988 році [58]. NCBI було створено з метою розробки передових обчислювальних інструментів і ресурсів для молекулярно-біологічних досліджень. Одним з основних завдань NCBI була інтеграція GenBank з іншими базами даних та розробка зручних інтерфейсів для полегшення доступу до даних та їх аналізу. NCBI розробив численні бази даних і ресурси, такі як PubMed, PubMed Central, Protein, BLAST і пошукова система Entrez, які стали незамінними інструментами для дослідників у всьому світі [58]. Сьогодні NCBI продовжує відігравати ключову роль у просуванні біомедичних досліджень, надаючи вільний доступ до великої кількості інформації з молекулярної біології та розробляючи інноваційні інструменти і технології для підтримки наукових відкриттів. Принцип роботи цієї бази полягає в простоті, доступності до інших баз даних та безкоштовним користуванням основного функціоналу.

Програму BLAST використовують як початковий інструмент для скринінгу отриманих даних із лабораторії. BLAST необхідний для того, щоб науковець мав уявлення про те, з чим працює, особливо, коли зразок невідомого походження [59]. BLAST поділяється на 4 групи: нуклеотидну “blastn” (порівняння нуклеотидної послідовності із базою даних секвенованих), білкову “blastp” (порівняння амінокислотної послідовності

білка з наявною в базах даних), транслюючи “blastx, tblastn, tblastx” (транслювання нуклеотидні послідовності в амінокислотні) та геномну (порівняння нуклеотидної послідовності будь-яких організмів) [59,60]. Принцип його роботи полягає в тому, що до послідовності, яка досліджується, визначаються гомологи за допомогою евристичного методу. Спочатку пошукова система знаходить короткі збіги по відомих базах даних, після чого система починає локальне вирівнювання по цих збігах. Відбувається поєднання слів сусідів, які отримали оцінку не менше T (матриця оцінок BLOSUM62) [59,60]. Тобто, слово та слова-сусіди об'єднуються та далі вже пошук проводиться по ним. Після цього відбувається подовження слова в обидві сторони до максимально можливого (коли оцінка не опускається нижче) [59]. Далі програма видає найкращі результати, тобто, збіги [60,61].

До найбільш відомих баз даних білкових послідовностей належить Банк даних білків (Protein database bank, PDB), UniProt, Swissprot, PSD-PIR, ENZYME, MMDB, структура яких дуже подібна. Серед вищезгаданих баз даних найбільш широкоживаною є база UniProt. UniProt це сховище даних для функціональної інформації про послідовність білків з точними назвами, описами, класифікацією, цитуванням і т.д [60,61]. Бази даних UniProt мають 3 рівні: архів (UniParc), база знань (UniProt), бази даних (UniRef) [61,62]. Перший рівень забезпечує загальнодоступну колекцію ненадлишкових білкових послідовностей та посилання на інші бази даних [62]. Наступний рівень є центральним і відповідає за білкові послідовності з точною послідовністю та інформацією про них і їх функціональні властивості [61,62]. База знань складається з двох частин UniProtKB/Swiss-Prot (високоякісні анотації білків, що виконані вручну) та UniProtKB/TrEMBL (вся відома інформація та високоякісні анотації про певний білок, що виконані комп'ютерними системами) [61]. Останній, третій рівень збирає всю інформацію із двох попередніх рівнів та забезпечує повноту інформації щодо послідовностей з різною роздільною здатністю [62]. UniRef складається з

трьох компонентів (100, 90,50), які об'єднують записи про послідовність за ідентичністю 100 %, 90 % і більше, 50 % і більше, відповідно [61].

Отже, аналіз літературних даних привів до вироблення нового методичного підходу до розв'язання вже відомої проблеми кооперативної поведінки клітин. Наші дослідження вказують на те, що фосфорні сполуки можуть відігравати ключову роль як еволюційно ранні сигнальні молекули у міжклітинних взаємодіях. Ця система, на нашу думку, може бути універсальною для клітин різних організмів на різних рівнях організації. Оскільки *S. cerevisiae* є широко використовуваною моделлю для досліджень багатьох процесів у еукаріотичних організмах, вона може слугувати для вивчення кооперативної дії клітин, зокрема у рості їхніх колоній. З урахуванням усього вищезазначеного було сформульовано мету наших досліджень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі

Під час виконання роботи було використано такі реактиви:

- органічні речовини: 96 % C₂H₅OH (“чда”, Кілафф, Україна), глюкоза (“чда”, Китай), пептон ферментативний (“чда”, Україна), екстракт дріжджовий (“чда”, Фармактив, Україна), агар мікробіологічний (“чда”, Іспанія);

- неорганічні речовини: натрій хлористий NaCl (“хч”, Юрія Фарм, Україна);

- барвники: акридин жовтий (“чда”, Home Sunshine Pharma, Китай, 470/550 нм), пропідіум йодид (“чда”, Sigma-Aldrich Co, Ltd, США, 493/636 нм).

У роботі також використовували середовища для культивування сахароміцетів такого складу (г/л):

- декстрозо-пептон-дріжджовий агар (Yeast extract Peptone Dextrose, YPD): глюкоза – 2, пептон – 2, дріжджовий екстракт – 1, агар-агар – 2. Концентрація фосфору в середовищі 0,1;

- YPD з фосфором 1: глюкоза – 2, пептон – 2, дріжджовий екстракт – 1, агар-агар – 2. Буферний розчин такого складу: KН₂РО₄ – 0,0575, К₂НРО₄– 0,0045. Концентрація фосфору в середовищі 0,25;

- YPD з фосфором 2: глюкоза – 2, пептон – 2, дріжджовий екстракт – 1, агар-агар – 2. Буферний розчин: KH_2PO_4 – 0,115, K_2HPO_4 – 0,009. Концентрація фосфору в середовищі 0,5.

У роботі було використане такі прилади та обладнання: центрифуга Eppendorf MiniSpin (Хімтест, Україна) зі стандартним ротором 230 В/50 Гц, термостат лабораторний сухоповітряний ТВ-80 MICROmed (Хімстатус, Україна), ваги електронні лабораторні (RADWAG, Польща) серії PS 210/C/1; проточний цитофлуориметр COULTER EPIC XL (Beckman, США), механічні дозатори (Sartorius Proline, Німеччина) 1, 5, 0, 100-1000, концентраційний фотоелектричний колориметр КФК-2 MICROmed (Хімстатус, Україна).

Також під час виконання роботи було використані дві основних бази даних, NCBI (Protein) та UniProt, для отримання структур білків та дослідження амінокислотних послідовностей (Blast). Також був використаний програмний пакет MEGA 11 для побудування філогенетичного дерева поліфосфатів сахароміцетів.

2.2. Характеристика штамів, використаних у роботі, та умови їхнього культивування

У роботі було використано штами *Saccharomyces cerevisiae* C3 та C5, що підтримуються та зберігаються в колекції дріжджів відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України на скошеному YPD за температури 6 °С. *S. cerevisiae* C3 є вихідним штамом, який характеризується нормальним перебігом метаболізму фосфору. Штам *S. cerevisiae* C5, дефектний за геном *ppn1*, який кодує фермент ендосфосфатазу Ppn1, внаслідок чого порушується метаболізм поліфосфатів [63].

Для визначення впливу фосфору за різної концентрації в середовищі на перебіг метаболізму фосфору, використовували культури сахароміцетів, які культивували за таких умов. Посівним матеріалом були штами *S. cerevisiae*

C3 та C5, які культивували на скошеній агаризованій поверхні YPD за температури 36 °C протягом 3 дб. Після закінчення часу культивування клітини штамів *S. cerevisiae* C3 та C5 висівали технікою уколу в 5 умовних квадратів (1 см²) паралельно на три щільні середовища різного складу, зокрема: YPD, YPD з фосфором 1 та YPD з фосфором 2. Штами *S. cerevisiae* C3 та C5 культивували протягом двох дб та 3, 5, 7 та 10 дб за температури 36 °C. Культури як вирощували упродовж 7 та 10 дб використовували у подальшій роботі для визначення наявності диференціювання клітин *S. cerevisiae*.

2.3. Визначення структури та особливостей ендо(екзо)фосфатази сахароміцетів

Для визначення характеристик ферменту PPN1 було використано базу UniProt та її функціональні можливості. Для початку дослідили дані про амінокислотну послідовність ендо(екзо)фосфатази PPN1, її функцій, локалізацію в клітині та за яких обставин вона може змінюватися. Далі дослідили каталітичні центри та з якими іншими біологічними молекулами ця фосфатаза може взаємодіяти. Після цього за допомогою Blast ідентифікували функціональні домени у послідовності фосфатази PPN1. Також дослідили еволюційні зв'язки між цим ензимом та іншими білками, що мають важливе значення для розуміння походження та функцій цієї фосфатази. Також далі нашим завданням було за допомогою різних баз даних підтвердити загальні характеристики, функції та властивості фосфатази PPN1.

2.4. Визначення швидкості радіального росту колоній, а також розміру клітин сахароміцетів і наявності гранул методом проточної цитофлуориметрії

Після закінчення часу культивування для визначення швидкості радіального росту колоній (мм/добу) вимірювали діаметр кожної окремої колонії (мм) у двох взаємно перпендикулярних площинах [64]. Швидкість росту розраховували за формулою 2.1 [64]:

$$V_r = \frac{a-b}{t_1-t_0}, \quad (2.1)$$

де a – радіус колонії наприкінці росту (мм); b – радіус колонії на початку фази лінійного розвитку (мм); t_1-t_0 – тривалість лінійного росту (доба).

Після зняття вимірів, відбирали клітини штамів *S. cerevisiae* C3 та C5 з центру та периферії однієї ізольованої колонії. До відібраних клітин асептично додавали фізіологічний розчин NaCl. Вимірювали оптичну густину отриманої суспензії клітин за $\lambda = 540$ нм на КФК-2 та стандартизували до показників екстинції 0,1, як описано в підрозд. 2.2. Зі стандартизованої суспензії клітин асептично відбирали аліквоти об'ємом 350 мкл, до яких додавали по 100 мкл відповідного барвника (див. підрозд. 2.1) і витримували за кімнатної температури протягом 20 хв. Після закінчення часу експозиції з барвниками до суспензії зафарбованих клітин для фіксації вносили 150 мкл 96 % етилового спирту та витримували впродовж 20 хв. Отриману суміш центрифугували за 2000 об/хв протягом 2 хв. Видаляли надосадову рідину, а до осаду знову додавали 150 мкл 96 % етилового спирту. Після цього кожен зразок досліджували за допомогою проточної цитофлуориметрії. Останній використовували для визначення розмірів клітин мікроорганізмів, зміну оптичних показників клітин дріжджів, які вирощувалися за умов різної концентрації фосфору в середовищі.

Аналіз розмірів клітин дріжджів проводили шляхом фіксації показників прямого детектора світлорозсіювання (FSC), Оптичні показники клітин сахароміцетів вивчали за показниками бічного світлорозсіювання (SSC) і флуоресценції на світлофільтрі FL2 із частотним спектром від 600 до 760 нм. Показник FL2 був обраний для зафарбованих клітин, оскільки цей світлофільтр в детекторі забезпечує зчитування червоного кольору. Безпосередньо перед аналізом до суспензії незафарбованих клітин дріжджів додавали водний розчин пропідіум йодиду (10 мг/мл) у співвідношенні 1 : 100, таким чином кінцева концентрація пропідіум йодиду в суспензії клітин становила 0,1 мг/мл.

Після аналізу отримані дані порівнювали за кожним параметром окремо в межах одного штаму, однієї доби, але за різних концентрацій фосфору в середовищі. Потім порівнювали клітини з центру та периферії одного штаму, однієї доби та за однією і різними концентраціями фосфору в середовищі. Також аналізували наявність впливу фосфору, порівнюючи обидва штами *S. cerevisiae* C3 та C5, які вирощували на ідентичних за складом живильних середовищах та однакового часу культивування. Як контроль для визначення розмірів та гранулярності використовували незафарбовані клітини штамів *S. cerevisiae* C3 та C5, які культивували за умов аналогічних дослідним.

2.5. Статистична обробка результатів

Отримані показники розподіляли в групи за певними ознаками: штаму, доба, концентрація фосфору в середовищі та барвник. Розподіли в кожній групі перевіряли на нормальність за допомогою критерію Шапіро-Вілка [65], який розраховували за формулою 2.2:

$$W = \frac{b^2}{(n-1)S^2}, \quad (2.2),$$

де W - значення W -критерію Шапіро-Вілка; b коефіцієнт; S^2 значення суми квадратів відхилення значень вибірки від середнього арифметичного; n – об'єм вибірки.

Після цього перевіряли альтернативну гіпотезу, тобто, якщо $W_{\text{факт}} < W_{\text{табл}}$, то розподіл не був нормальним, якщо навпаки $W_{\text{факт}} > W_{\text{табл}}$ – розподіл нормальний. Зважаючи на те, що розподіл у всіх вибірках був нормальним, тому для встановлення наявності різниці між двома групами використовували параметричний однофакторний парний критерій Стьюдента [66] на обох рівнях значущості (0,01 та 0,05). Коли $t_{\text{факт}} > t_{\text{табл}}$, то різниця доведена, якщо навпаки – різниця відсутня. Критерій Стьюдента визначали за формулою 2.3 [66]:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}}, \quad (2.3),$$

де t – значення критерію Стьюдента; \bar{x} – значення вибіркового середнього; s^2 – об'єднана оцінка дисперсії, n – обсяг вибірки.

Для встановлення різниці одночасно між трьома групами використовували поправку Бонфероні. В результаті отримували змінену формулу 2.4 критерію Стьюдента з поправкою Бонфероні [66] за рівня значущості 0,017:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{s_{\text{вну}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{вну}}^2}{n_2}}}, \quad (2.4),$$

де t – значення критерію Стьюдента; \bar{x} – значення вибіркового середнього; $s_{\text{вну}}^2$ – внутрішньогрупова дисперсія, n – обсяг вибірки.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження впливу різної концентрації фосфору в середовищі культивування на якісні та кількісні характеристики клітин батьківського та мутантного штамів *Saccharomyces cerevisiae*

Для дослідження участі поліфосфатних груп у клітинних процесах було обрано два штами *S.cerevisiae* C3 та C5. Мутантний штам C5 має в геномі дефектний ген *ppn1*, продуктом експресії якого є поліфосфатаза PPN1. Ця поліфосфатаза була обрана тому, що вона володіє як ендо- так і поліфосфатазною активністю і належить до ферментів, які відповідають за біосинтез та деградацію поліфосфатів [49]. Останні є основним джерелом фосфору для клітин сахароміцетів [11]. Також цей фермент бере участь в JAK/STAT сигнальному шляху, що відповідає за реагування на стресові чинники та адаптації клітини [49]. Для того, щоб з'ясувати чи належить фосфор до первинних авторегуляторів сигнальних процесів, які відбуваються в клітинах, на цьому етапі роботи побудували філогенетичне дерево

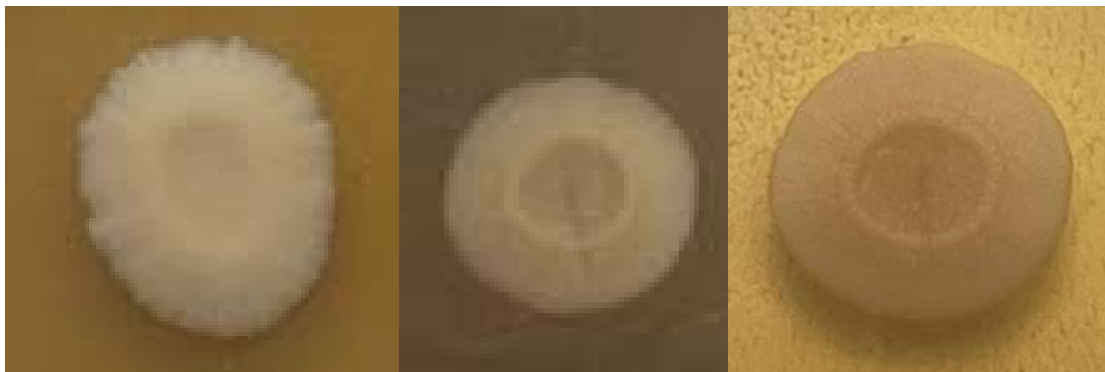
поліфосфатів дріжджів, вивчали швидкість радіального росту колоній, а також визначали залежність розміру, гранулярності та функціональності окремих органел клітин (ядра та лізосом) від концентрації фосфатів у середовищі культивування.

3.1.1. Характеристика морфологічних особливостей та швидкості радіального росту колоній сахароміцетів. Культура сахароміцетів впродовж свого розвитку проходить 4 фази росту, під час кількості поживних речовин у середовищі зменшується [11]. Це призводить до утворення спеціалізованих клітин, на диференціацію яких впливає наявність джерел карбону, нітрогену та фосфору [13]. Останній бере участь у перемиканні фаз життєвого циклу клітин та переході у стаціонарну фазу розвитку культури [14]. Під час логарифмічної фази клітини масово накопичують поживні речовини у вигляді включень різної хімічної природи [19]. Це приводить до збільшення біомаси клітин та, відповідно, висоти та діаметру сформованих колоній. Під час переходу в інші фази розвитку колонії збільшуються лише за лінійним розміром і утворюється чітка видима межа між утвореними шарами, що свідчить про диференціювання клітин [19]. Для дослідження впливу концентрації фосфору в середовищі на диференціацію клітин проводили якісну та кількісну оцінку ізольованих колоній. Ми обрали колонію, яка росла в умовному центрі середовища культивування, оточену іншими. Таке рішення було прийняте для того, щоб мати можливість дослідити вплив фосфору на міжклітинну комунікацію. За допомогою показників швидкості радіального росту колоній встановлювали залежність нормального розвитку культури та життєвого циклу клітин від різних концентрацій фосфору в середовищі культивування.

Нами було встановлено, що всі сформовані на середовищі культивування колонії були округлими з гладкою поверхнею. Згідно літературних даних такі колонії утворюються за фізіологічного вмісту джерел карбону та нітрогену [5,6]. Також було показано, що колонії

мутантного штаму *S. cerevisiae* C5, порівняно з вихідним, мали більш шорстку поверхню, що є його особливістю.

За культивування на середовищі з концентрацією фосфору 0,1 г/л клітини батьківського штаму мали хвилясті краї, що також було встановлено і для колоній мутантного штаму. За культивування на середовищі із концентрацією фосфору 0,25 г/л колонії вихідного штаму вже мали рівні краї, за цієї ж концентрації фосфору – краї колоній мутантного штаму були хвилястими. Підвищення концентрації фосфору до 0,5 г/л привело до того, що краї колоній як батьківського, так і мутантного штаму були рівними. За культивування на середовищах з усіма дослідженими концентраціями фосфору протягом 7-10 діб колонії обох штаму мали характерне підвищення в центрі. Особливо чітка межа, яку можна побачити неозброєним оком, була на 10 добу розвитку культури. Це свідчить про формування нижнього шару, в якому локалізовані L-клітини, та верхнього шару, що складається з U-клітин (рис. 3.1). Ми встановили, що за концентрації фосфору 0,25 г/л в середовищі культивування у вихідного штаму пришвидшується диференціювання клітин, оскільки спостерігали дуже чітку межу між утвореними шарами колоній. Подібну залежність було встановлено також для мутантного штаму, але за умов культивування в середовищі за концентрації фосфору 0,5 г/л. Однак, для підтвердження наявності чіткого розмежування між цими шарами необхідне проведення більш детального дослідження.



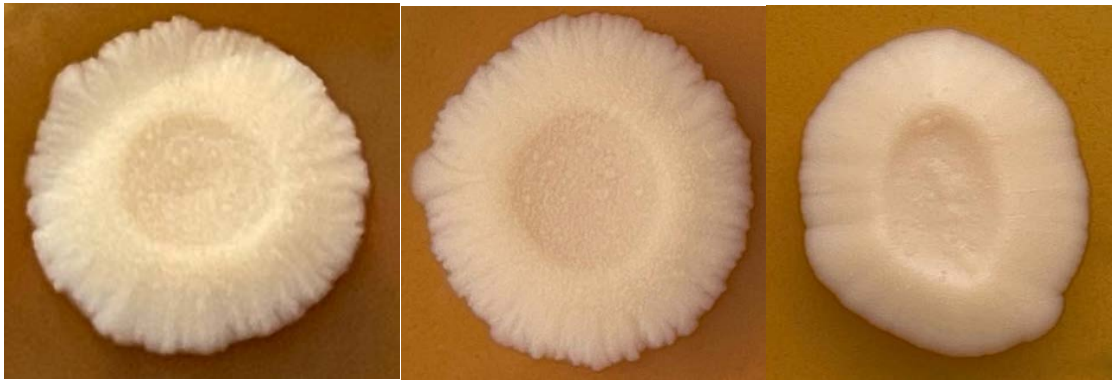


Рисунок 3.1. Фото ізолюваних колоній штамів *S. cerevisiae* C3 та C5 за умов культивування протягом 10 діб на середовищі із різною концентрацією фосфору: 1 – *S. cerevisiae* C3 (0,1 г/л фосфору); 2 – *S. cerevisiae* C3 (0,25 г/л фосфору); 3 – *S. cerevisiae* C3 (0,5 г/л фосфору); 4 – *S. cerevisiae* C5 (0,1 г/л фосфору); 5 – *S. cerevisiae* C5 (0,25 г/л фосфору); 6 – *S. cerevisiae* C5 (0,5 г/л фосфору).

Колонії обох досліджених штамів за культивування на середовищах з різною концентрацією фосфору мали однорідну кремоподібну консистенцію та білий колір, що вказувало на достатній вміст поживних речовин та аденіну в живильному середовищі [5,6]. Колонії цих штамів мали щільну консистенцію та складну морфологічну організацію. На думку Granek і співавторів [DOI: 10.1371/journal.pgen.1000823.] таку організацію колоній зумовлює висока концентрація азоту та глутамату в поживному середовищі. Також культури обох штамів мали характерний запах дріжджів. Це свідчить про те, що відбувається нормальний процес синтезу таких речовин: етанолу, н-гексанолу, н-пропанолу та діацетилу [5,6].

Також нами було встановлено, що підвищення вмісту фосфору в середовищі приводить до того, що певні ізолювані колонії батьківського штаму утворювали вирости, які були спрямовані до інших колоній (рис. 3.2). Це може свідчити про те, що фосфор та фермент PPN1 безпосередньо впливає на міжклітинну комунікації, в нашому випадку комунікацію між клітинами сусідніх колоній. Ці вирости можуть утворюватися в результаті того, що сахароміцети можуть виділяти різні хімічні сигнали, такі як феромони, амінокислоти, гормони тощо, для сприяння комунікації з іншими

клітинами. Ці сигнали можуть впливати на інші колонії, так як всі колонії розташовані достатньо близько до один одного та культивуються в ізольованому просторі [9,69]. Також, іншою версією може бути те, що сахароміцети можуть виділяти екстрацелюлярні молекули, такі як ендogenous метаболіти або екзопродукти метаболізму. Ці молекули можуть впливати на ріст та розвиток сусідніх клітин, регулюючи їхню функцію або активність [9,69].



Рисунок 3.2. Фото ізольованих колоній батьківського штаму *S. cerevisiae* C3 культивованих за підвищеної концентрації фосфору в середовищі: 1- *S. cerevisiae* C3 (0,25 г/л фосфору); 2 – *S. cerevisiae* C3 (0,5 г/л фосфору);

Для визначення швидкості радіального росту було обрано колонії 2, 5 та 7 діб, адже згідно літературних на 2 і 5 добу культивування відбувається активний початок і пік логарифмічної фази, відповідно, на 7 добу фаза розвитку культури переходить в стаціонарну [13,15]. Також, 10 доба культивування не була використана для визначення швидкості радіального росту, бо після того, як культура сахароміцетів перейшла в стаціонарну фазу між 7 і 10 добою культивування відбувається активна диференціація клітин, а не збільшення біомаси культури. Під час визначення швидкості радіального росту клітин ми встановили, що за культивування клітин батьківського

штаму за концентрації фосфору 0,1 г/л, тобто контроль на другу добу ці показники становили 1,23 мм/добу, на п'яту добу – 0,86 мм/добу та на сьому добу – 0,87 мм/добу. Натомість за концентрації фосфору 0,25 г/л вищезазначені показники становили 1,92 мм/добу, 0,89 мм/добу та 0,66 мм/добу на 2, 5 та 7 добу, відповідно. За культивування клітин штаму *S. cerevisiae* C3 показники швидкості радіального росту на другу добу становили 1,71 мм/добу, на п'яту добу – 0,87 мм/добу та на сьому добу – 0,69 мм/добу.

Порівнюючи отримані результати, ми бачимо, що з підвищенням вмісту фосфору в середовищі на 0,15 г/л показник швидкості радіального росту зростає (табл. 3.1). Натомість, при додаванні 0,5 г/л фосфору до середовища культивування це показник, в порівнянні з попереднім, падає. На 5 добу культивування різниці між цим показником за умови культивування на середовищі з різною концентрацією не визначено. Однак, якщо порівняти результати, які були отримання на 7 добу культивування, то можемо побачити, що за підвищення концентрації фосфору в поживному середовищі швидкість радіального росту знижується. Також, найбільш суттєва різниця виявлена між показниками на 2, 5 та 7 добу культивування за концентрації фосфору 0,25 г/л. Саме за вищезгадану концентрацію показник швидкості радіального росту на 2 добу є найвищими, однак на 5 та 7 добу різко знижуються. Це може свідчити про те, що відбувається пришвидшений розвиток культури, адже відбувається прискорений перехід культури в стаціонарну фазу, коли збільшення біомаси припиняється, адже поживне середовище виснажується, та клітини починають активно диференціюватися.

Для клітин мутантного штаму *S. cerevisiae* C5 за концентрації фосфору 0,1 г/л показники радіального росту на 2 добу становили 1,17 мм/добу, на 5 добу – 0,69 мм/добу та на 7 добу – 0,5 мм/добу. В той час як за концентрації фосфору 0,25 г/л ці показники були 1,88 мм/добу, 0,75 мм/добу та 0,61 мм/добу на 2, 5 та 7 добу, відповідно. За найвищої концентрації фосфору в середовищі культивування показники радіального росту для клітин

мутантного штаму на другу добу становили 2,07 мм/добу, на п'яту добу – 0,87 мм/добу та на сьому добу 0,69 мм/добу. Ці результати показують, що для мутантного штаму з підвищенням концентрації фосфору в середовищі за 2 доби культивування показники в порівнянні з контролем збільшилися в 1,6 та 1,1 рази, відповідно, за 5 доби – в 1,1 та в 1,3 разів, відповідно, в той час як на 7 добу – в 1,4 та 1, 2 рази. Також, ми встановили, що найбільш значуща різниця між показниками швидкості радіального росту є показники, які ми отримали за культивування клітин мутантного штаму на середовищі із найвищим вмістом фосфору. Саме за цих умов різниця з розвитком культури між показниками є найбільш вагома різниця, хоча швидкість радіального росту на 7 добу найменший.

Таблиця 3.1

Показники швидкості радіального росту колоній штамів *S. cerevisiae* С3 та С5 за різної концентрації фосфору в середовищі культивування

Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	Доба культивування		
		2 доба	5 доба	7 доба
		Швидкість радіального росту, мм/добу		
<i>S. cerevisiae</i> С3	Контроль (0,1)	1,23	0,86	0,87
	0,25	1,92	0,89	0,66
	0,5	1,71	0,87	0,69
<i>S. cerevisiae</i> С5	Контроль (0,1)	1,17	0,69	0,5
	0,25	1,88	0,75	0,61
	0,5	2,07	0,87	0,69

Все вищеперераховане вказує на те, що для батьківського штаму за концентрації фосфору 0,25 г/л, і для мутантного штаму за концентрації фосфору 0,5 г/л відбувається пришвидшення накопичення біомаси під час експоненціальної фази розвитку. Також в результаті порівняльного аналізу

швидкості радіального росту штаму *S. cerevisiae* C3 та C5 ми дослідили, що підвищення концентрації фосфору призводить до її зниження під час переходу із логарифмічної фази розвитку в стаціонарну. З цього слідує, що період фаз розвитку культури скоротився, та культура раніше переходить в стаціонарну фазу розвитку. Адже, згідно літературних даних, саме під час стаціонарної фази розвитку, а саме її початку, кількість поживних речовин в середовищі зменшується, скорочується швидкість радіального росту, адже клітини перестають активно ділитися та відбувається розшарування колоній і пришвидшена диференціація клітин. Також під час метаболізму фосфору з поліфосфатів утворюються інозитолпірофосфат та діаденозин поліфосфат, які під дією поліфосфатфосфатази беруть участь в проліферації клітин та їхній адаптації до умов оточуючого середовища [10]. Це дає нам підстави зробити попередній висновок, що фосфору у допустимій концентрації сприяє не тільки адаптації клітин до змін в навколишньому середовищі, а й бере участь в прискоренні як фаз розвитку культури, так і в активації механізму утворення спеціалізованих клітин, L- та U-клітин, які притаманні розвиненій колонії сахароміцетів. Також за наявності підвищеної концентрації фосфору в середовищі ми спостерігали більш чітку межу між утвореними шарами колоній, в яких локалізуються спеціалізовані клітини. Ця межа та її утворення вказує на пришвидшення фаз розвитку культури. На підставі цих даних, ми можемо припустити, що відбулося скорочення фаз розвитку для батьківського штаму за концентрації фосфору 0,25 г/л, в то час як для мутантного штаму – 0,5 г/л. Тобто, ці концентрації фосфору можуть використовуватися для отримання великої кількості біомаси клітин штаму *S. cerevisiae* C3 та C5 за короткий період часу. Втім, для вихідного штаму у випадку довготривалих досліджень більш оптимальним є використання декстрозо-пептон-дріжджового агару за концентрації фосфору 0,1 г/л. Це середовище універсальним для культивування клітин *S. cerevisiae* в лабораторних умовах [5,6]

3.1.2. Дослідження залежності розміру та внутрішньоклітинної організації від концентрації фосфору в клітинах сахароміцетів за різної фази розвитку. З переходом культури сахароміцетів в різні фази розвитку відбувається диференціювання клітин. Останній процес найбільш помітний на 7-10 добу культивування. Для визначення залежності зміни розміру та внутрішньоклітинної складчастості від різної концентрації фосфору в середовищі культивування у батьківського та мутантного штамів застосовували метод проточної цитофлуориметрії. Цей метод був взятий за основний, так як за допомогою нього можна отримати інформацію щодо зовнішніх та внутрішніх особливостей досліджених клітин. Покладаючись на цю інформацію ми вивчали клітини, взяті із центру та периферії, за різного часу культивування (2, 3, 5, 7 та 10 доба) обох досліджених штамів за культивування у присутності різних концентрацій фосфору.

Для початку визначали залежність показників розміру клітин вихідного штаму за 2 доби культивування, які за концентрації фосфору 0,1 г/л, 0,25 г/л та 0,5 г/л становили 3,2 мкм (центр та край), 3,4 мкм (центр) і 3,5 мкм (край) та 3,3 мкм (центр) і 3,45 мкм (край), відповідно (табл. 3.2). Ми встановили, що з підвищенням концентрації фосфору не відбулося ніяких змін розміру клітин. Проте ці показники для мутантного штаму за концентрації фосфору 0,1 г/л, 0,25 г/л та 0,5 г/л були 3,4 мкм (центр) і 3,43 мкм (край), 3,4 мкм (центр) і 3,5 мкм (край) та 3,3 мкм (центр) і 3,45 мкм (край), відповідно. Тобто, клітини, які були взяті із центру колоній за найвищого вмісту фосфору в середовищі збільшилися в 1,15 разів в порівнянні із контролем, однак для клітин із периферії колоній статистичної різниці доведено не було. За 3 доби культивування зі зростанням концентрації фосфору розмір клітин для штаму *S. cerevisiae* C3 отримували такі значення: 3,4 мкм (центр) і 3,25 мкм (край), 3,47 мкм (центр) і 3,6 мкм (край) та 3,4 мкм (центр) і 3,48 мкм (край). В той час як для штаму *S. cerevisiae* C5 значення були такі: 3,5 мкм (центр) і 3,57 мкм (край), 3,7 мкм (центр) і 3,52 мкм (край) та

3,98 мкм (центр) і 3,65 мкм (край). Нами було доведено, що різниці між 2 і 3 добою культивування немає, і залежність збільшення розмірів клітин із підвищення концентрації подібна для клітин обох діб. Під час логарифмічної фази розвитку, тобто на 5 добу культивування розмір клітин вихідного штаму за концентрації фосфору 0,1 г/л, 0,25 г/л та 0,5 г/л становив 4,9 мкм (центр) і 4,5 мкм (край), 5,2 мкм (центр) і 5,05 мкм (край) та 4,7 мкм (центр) і 4,45 мкм (край), відповідно. Для клітин мутантного штаму за тих самих умов культивування значення були: 4,8 мкм (центр) і 4,4 мкм (край), 4,9 мкм (центр) і 4,6 мкм (край) та 5,8 мкм (центр) і 5,2 мкм (край), відповідно. Тобто, ми бачимо, що збільшується різниця в показниках розміру клітин із центру та периферії колонії. Також, за концентрації фосфору 0,25 г/л розмір клітин батьківського штаму найвищий. Подібну залежність було встановлено і для клітин мутантного штаму, але за концентрації фосфору 0,5 г/л.

За концентрації фосфору 0,1 г/л, 0,25 г/л та 0,5 г/л показники розміру клітин вихідного штаму за 7 доби культивування, становили 5,7 мкм (центр) і 4,8 мкм (край), 6,1 мкм (центр) і 4,2 мкм (край) та 5,8 мкм (центр) і 4,9 мкм (край), відповідно. Однак ці показники для мутантного штаму за концентрації фосфору 0,1 г/л, 0,25 г/л та 0,5 г/л були 5,1 мкм (центр) і 4,25 мкм (край), 5,4 (центр) і 4,27 мкм (край) та 6,2 мкм (центр) і 4,1 мкм (край), відповідно. За умов культивування в середовищі з вмістом фосфору 0,25 г/л у клітин вихідного штаму розміри клітин із центру колонії були найбільшими, а також клітини із краю колоній в майже 1,5 разів менші за центральні, що є найвищим показником. Подібну ситуацію ми можемо спостерігати у клітин мутантного штаму, але за концентрації фосфору 0,5 г/л. За 10 доби культивування зі зростанням концентрації фосфору розмір клітин для штаму *S. cerevisiae* С3 отримували наступні значення: 5,76 мкм (центр) і 4,15 мкм (край), 5,9 мкм (центр) і 3,8 мкм (край) та 5,8 мкм (центр) і 4,1 мкм (край). Для штаму *S. cerevisiae* С5 за таких самих умов культивування значення були такі: 5,2 мкм (центр) і 4,05 мкм (край), 5,6 мкм (центр) і 4 мкм (край) та 5,86 м (центр) і 3,6 мкм (край). Залежність показників розміру

подібна на 10 добу культивування подібна до 7 доби культивування. Однак, зростає різниця між розмірами клітин із центру та периферії колонії.

Таблиця 3.2

Показники розміру клітин штамів *S. cerevisiae* C3 та C5 за різної концентрації фосфору в середовищі культивування

Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	Доба культивування									
		2 доба		3 доба		5 доба		7 доба		10 доба	
		центр	край	центр	край	центр	край	центр	край	центр	край
Розмір клітин, мкм											
<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	3,2	3,2	3,4	3,25	4,9	4,5	5,7	4,8	5,76	4,15
	0,25	3,4	3,5	3,47	3,6	5,2	5,05	6,1	4,2	5,9	3,8
	0,5	3,3	3,45	3,4	3,48	4,7	4,45	5,8	4,9	5,8	4,1
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	3,4	3,43	3,5	3,57	4,8	4,4	5,1	4,25	5,2	4,05
	0,25	3,6	3,45	3,7	3,52	4,9	4,6	5,4	4,27	5,6	4
	0,5	3,9	3,6	3,98	3,65	5,8	5,2	6,2	4,1	5,86	3,6

Під час проведення порівняльного аналізу, ми встановили, що за умов культивування на середовищі із вмістом фосфору 0,25 г/л та 0,5 г/л для батьківського та мутантного штаму, відповідно, розмір клітин із центру колоній є найвищим. Під час порівняння розмірів вищих штамів, клітини штаму *S. cerevisiae* C5, в порівнянні із C3, є вищими. Ми припускаємо, що клітини мутантного штаму накопичують фосфор із середовища набагато інтенсивніше. Розмір збільшується, однак, так як *S. cerevisiae* C5 має в геномі дефектний ген *ppn1*, який продукує ензим PPN1, то розчеплення накопиченого фосфору відбувається не так ефективно та швидко, як у клітинах вихідного штаму. Також ми встановили, що культура вихідного штаму, на відміну від мутантного, трохи раніше переходить у стаціонарну фазу розвитку, адже між 7 і 10 добою культивування розміри центральних клітин колоній батьківського штаму зменшувалися і збільшувалася різниця з клітинами із краю колонії. Це вказує на те, що L-клітини наближалися до переходу у фазу відмирання, коли почалося виснаження субстрату, а U-клітини починали інтенсивніше використовувати накопичений глікоген, який отримували за рахунок глюконеогенезу, в якому беруть участь клітини

нижнього шару [13,17,20]. В той час як розміри клітин мутантного штаму, які були взяті із центру колоній, між 7 і 10 добою культивування збільшувалися, що вказує на те, що відбувався остаточний перехід в стаціонарну фазу та активна диференціація клітин (збільшувалася відсоткова різниця між розмірами клітин двох шарів). Адже згідно з літературними даними клітини штамів з дефектами в активності поліфосфатази PPN1 цілком нормально функціонують, але рівень їхньої пристосованості до існування в навколишньому середовищі знижується під час переходу в стаціонарну фазу розвитку культури [29,30]. Ми припускаємо, що збільшення концентрації фосфору в середовищі позитивно впливає на клітини мутантного штаму, адже якщо фосфору недостатньо, то клітини та колонії, відповідно, значно менші за розмірами, в порівнянні їх батьківським штамом. Це сходиться із літературними даними, адже клітини штамів з дефектами в активності поліфосфатази Ppn1 цілком нормально функціонують, але рівень їхньої пристосованості до існування в навколишньому середовищі знижується під час переходу в стаціонарну фазу розвитку культури [29,30].

Для визначення гранульованості клітин обох штамів використовували метод проточної цитофлуориметрії, а саме показники детектора бічного розсіювання (SSC), який для клітин вихідного штаму за концентрації фосфору в середовищі 0,1 г/л становив 83 V. Чим вищий показник SSC, тим більш складна структурна складчастість. Залежно від штаму, часу культивування та вмісту фосфору в середовищі показники гранулярності для всіх клітин коливалися в межах 83-154 V (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Показники внутрішньоклітинної складчастості клітин штамів *S. cerevisiae* C3 та C5 за різної концентрації фосфору в середовищі культивування

Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі	Доба культивування									
		2 доба		3 доба		5 доба		7 доба		10 доба	
		центр	край	центр	край	центр	край	центр	край	центр	край
		р	й	р	й	р	й	р	й	р	й

	, г/л	SSC, V									
<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	83	83,1	83,7	83,65	130,1	110,2	154,15	121,2	144,4	115,8
	0,25	83,5	83,4	84,1	84,14	141,5	105,1	110,1	100,6	101,3	89,78
	0,5	83,2	83,13	83,76	83,7	152,3	130,7	141,1	127,5	135,7	120,1
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	89,7	89,9	91	91,1	156,1	147,5	119,9	105,2	119,9	103,1
	0,25	93	92,8	93,2	93,1	107,2	102,1	126,7	116,1	127,2	112,5
	0,5	95,2	95,15	95,8	95,83	119,7	111,6	138,2	112,8	140,1	109,3

За концентрації фосфору 0,1 г/л в середовищі культивування, показники гранулярності клітин вихідного штаму, які були взяті із центру та периферії колонії на другу добу становили 83 V і 83,1 V, на третю добу – 83,7 V і 83,65 V, на п'яту добу – 130,1 V та 110,2 V, на сьому добу 154,15 V і 121,2 V та на 10 добу - 144,4 V і 115,8 V, відповідно. Для клітин мутантного штаму за цих самих умов показники гранулярності на другу добу були 89,7 V і 89,9 V, на третю добу – 91 V і 91,1 V, на п'яту добу – 156,1 V та 147,5 V, на сьому добу 119,9 V і 105,2 V та на 10 добу - 119,9 V і 103,1 V, відповідно. Втім за концентрації фосфору 0,25 г/л показники внутрішньої складчастості центральних і периферійних клітин штаму *S. cerevisiae* C3 на другу добу культивування були 83,5 V і 83,4 V, на третю добу – 84,1 V і 84,14 V, на п'яту добу – 141,5 V та 105,1 V, на сьому добу 110,1 V і 100,6 V та на 10 добу - 101,3 V і 89,78 V, відповідно. Для клітин штаму *S. cerevisiae* C5 вищезгаданий показник на другу добу культивування був 93 V і 92,8 V, на третю добу – 93,2 V і 93,1 V, на п'яту добу – 107,2 V та 102,1 V, на сьому добу 126,7 V і 116,1 V та на 10 добу - 127,2 V і 112,5 V, відповідно. За наявності найвищого вмісту фосфору в середовищі показники гранулярності клітин із центра та краю колоній батьківського штаму на другу добу були 83,2 V і 83,13 V, на третю добу – 83,76 V і 83,7 V, на п'яту добу – 152,3 V та 130,7 V, на сьому добу 141,1 V і 127,5 V та на 10 добу - 135,7 V і 120,1 V, відповідно. Втім для клітин мутантного штаму за тих самих умов культивування ці показники на другу добу становили 95,2 V і 95,15 V, на третю добу – 95,8 V і 95,83 V, на п'яту добу – 119,7 V та 111,6 V, на сьому добу 138,2 V і 112,8 V та на 10 добу - 140,1 V і 109,3 V, відповідно. Ми дійшли висновку про те, що підвищення концентрації фосфору призводить

до збільшення гранулярності клітин обох штамів під час експоненціальної фази розвитку. Підтвердженням цьому є те, що показники гранулярності між 3 і 5 добою культивування приблизно в 1,5 рази. Також ми підтвердили те, що починаючи із 5-7 доби культивування, тобто перехід в стаціонарну фазу розвитку із підвищенням концентрації фосфору в середовищі збільшується різниця в гранулярності між клітинами, які були отримані із центра та периферії колонії. Це вказує на те, що відбувається диференціювання на U- та L-клітини. Це збігається із літературними даними, адже клітини верхнього шару містять кілька вакуолей та мають значний вміст глікогену та включені, на відміну від клітин нижнього шару, які мають всього одну вакуоль і є метаболічно неактивними [13,15,19]. Також в результаті порівняльного аналізу ми встановили, що клітини мутантного штаму, на відміну від батьківського, мають більший показник гранульованості. Ми припускаємо, що це пов'язано із тим, що клітини штаму *S. cerevisiae* C5, у зв'язку із своїм дефектом в геномі, інтенсивніше накопичують фосфат у зв'язку з тим, що використовують його у адаптації до навколишнього середовища, адже мають низьку життєдіяльність. Після переходу в стаціонарну фазу розвитку, гранулярність клітин вихідного штаму, які культивувалися на середовищі з концентрацією фосфору 0,25 г/л, зменшувалася. Це може означати, що відбулося розщеплення поліфосфатних гранул поліфосфатазами, які активуються під дією АДФ та інактивуються за участі АТФ [49]. Можливо, також відбувається зворотнє переретворення АДФ з АТФ, який утворюється в результаті гліколізу [7]. Тобто, вміст вуглеводів зменшується, що також впливає на зниження гранулярності клітин. На відміну від клітин вихідного штаму, клітини мутантного штаму мають обернені результати. Тобто, клітини мутантного штаму із дефектами функціональності поліфосфатази адаптуються за концентрації фосфору 0,1 г/л. Для адаптації клітинам потрібно набагато більше енергії, ніж за звичайного стану, тобто кількість накопичених поживних речовин зменшується – внутрішня складність клітини знижується. Однак, за підвищення концентрації фосфору в

середовищі культивування екзо- та ендополіфосфатази (Ppx1, Ddp1 та Ppn2), які функціонують нормально, забезпечують фізіологічний перебіг життєвого циклу клітин. Тобто, клітини мутантного штаму поступово накопичують поживні речовини. На підставі цих результатів, ми припускаємо, що фосфор бере участь не тільки в резерві важливо необхідних речовин для росту та нормального функціонування клітин, а також пришвидшує диференціацію клітин для обох досліджених штамів.

3.1.3. Дослідження залежності функціональності окремих органел клітин обох штамів *Saccharomyces cerevisiae* за різної фази розвитку від концентрації фосфору в середовищі культивування. Метаболічне перепрограмування клітин супроводжується зміною функціональності окремих органел. Поліфосфати можуть впливати на ці зміни, оскільки беруть участь у метаболізмі фосфору, що відповідає за різноманітні процеси в клітині (проліферацію, реакцію на стрес, синтезі клітинної стінки та ін.) [10]. Для визначення активності окремих органел клітин (мітохондрій та ядра) визначали співвідношення живих і мертвих клітин, а також показники інтенсивності зафарбованих клітинних структур штамів *S. cerevisiae* C3 та C5. Для цього клітини аналізували за FL2_log показником (інтенсивність забарвлення). Залежно від штаму, доби культивування та концентрації фосфору в середовищі значення отриманих показників значення Fl2_log клітин зафарбованих пропідіум йодидом та акридином жовтим варіювали від 4,35 V до 69,15 V, що також залежить від умов культивування штамів та використаного барвника (Дод.1).

Аналізуючи показники інтенсивності забарвлення клітин, ми дійшли висновку, що клітини по-різному накопичують барвники. Визначення інтенсивності зафарбованих акридином жовтим клітин вихідного штаму *S. cerevisiae* C3, засвідчує, що за концентрації фосфору 0,1 г/л показники інтенсивності забарвлення клітин, які були взяті із центру (краю) колонії на другу добу культивування становили 9,2 V (9,1 V), на третю добу –4,6 V

(4,5 V), на п'яту добу – 18,67 V (16,65 V), на сьому добу - 12,8 V (9,7 V) та на десяту добу - 11,7 V (8,9 V), відповідно. Однак, за концентрації фосфору 0,25 г/л встановили, що на другу, третю, п'яту, сьому та десяту добу показники становили 4,6 V (4,5 V), 4,5 V (4,35 V), 8,6 V (5,62 V), 10,4 V (5,7 V) та 9,4 V (3,2 V), а за концентрації фосфору в середовищі 0,5 г/л – 13,4 V (13,2 V), 13,38 V (13,3 V), 10,4 V (8,3 V), 16,7 V (14,7 V) та 14,7 V (13,2 V), відповідно. Показники інтенсивності зафарбованих акридином жовтим клітин із центру (краю) колоній мутантного штаму *S. cerevisiae* C5, що перебувають на різних фазах розвитку, за концентрації фосфору 0,1 г/л на другу добу культивування становили 16 V (16,85 V), на 3 добу – 16,05 V (16 V), на 5 добу – 16,9 V (14 V), на 7 добу – 16,8 V (13,75 V) та на 10 добу – 15,5 V (12,8 V), відповідно. За концентрації фосфору 0,25 г/л значення інтенсивності забарвлення клітин на другу добу культивування становили 19,8 V (19,75 V), на 3 добу – 19,7 V (19,65 V), на 5 добу – 10,37 V (7,35 V), на 7 добу – 10,1 V (7 V) та на 10 добу – 12,2 V (6,8 V), відповідно. Втім, за концентрації фосфору 0,5 г/л в середовищі ці показники на що на другу, третю, п'яту, сьому та десяту добу становили 21,5 V (21,38 V), 21,9 V (21,85 V), 32,85 V (26,8 V), 18,5 V (10,4 V) та 17,5 V (9,1 V), відповідно.

При порівняльному аналізі ми встановили, що статично значущої різниці між показниками забарвленості клітин обох досліджених штамів між 2 і 3 добою культивування немає. Під час логарифмічної фази мітохондріальна активність клітин вихідного штаму зросла майже вдвічі за концентрації фосфору 0,1 та 0,25 г/л. Втім для мутантного штаму ці показники за концентрації фосфору 0,25 г/л зменшилась майже в 1,9 разів. Це може означати, що колонії старіють та кількість мертвих клітин зростає. Однак, різниця між функціональна активність мітохондрій клітин, які були взяті із різних частин колоній, збільшувалася за концентрації фосфору 0,25 г/л для вихідного штаму та 0,5 г/л для мутантного штаму на 7 добу культивування зростала \approx в 1,8 рази. На 10 добу культивування за вищезгаданих умов різниця між мітохондріальною активністю клітин

батьківського штаму верхнього шару та нижнього зросла в 2,9 разів, а для мутантного штаму – майже в 2 рази. Це може вказувати на те, що відбувалося остаточне диференціювання в L- та U-клітини. Останні є метаболічно активними [15,17]. Тобто, це підтверджує, що за достатньої концентрації фосфору в середовищі активування переходу з одного типу дихання клітин на інший відбувається за малий проміжок часу, а кількість мертвих клітин зростає. На підставі цього ми припускаємо, що однією з речовин, яка забезпечує клітинне метаболічне перепрограмування клітин є фосфор, про що йдеться у роботах інших авторів [1].

Показники інтенсивності зафарбованих пропідіум йодидом клітин, які були взяті із центру (периферії) колоній вихідного штаму *S. cerevisiae* C3 на різних стадіях розвитку за концентрації фосфору 0,1 г/л становили на другу добу культивування 19 V (18,7 V), на 3 добу – 20,2 V (20,1 V), на 5 добу – 30,2 V (41,1 V), на 7 добу – 35,2 V (47,1 V) та на 10 добу – 40,1 V (50,2 V), відповідно. За концентрації фосфору в середовищі 0,25 г/л значення інтенсивності забарвлення клітин 2-добової культури були 15 V (15,1 V), 3-добової культури – 16,5 V (16,1 V), 5-добової культури – 56,15 V (46,1 V), 7-добової культури – 69,15 V (57,3 V) та 10-добової культури – 72,1 V (64,5 V), відповідно. Втім, за концентрації фосфору 0,5 г/л показники інтенсивності на другу, третю, п'яту, сьому та десятю добу культивування становили, відповідно, 25,1 V (24,9 V), 24,5 V (24,4,7 V), 54,5 V (48,4 V), 55 V (49,3 V) та 57,2 V (50,1 V). Показники інтенсивності зафарбованих пропідіум йодидом центральних (периферійних) клітин мутантного штаму *S. cerevisiae* C5 за концентрації фосфору 0,1 г/л становили на другу добу культивування 23,1 V (22,0 V), на третю добу – 23 V (23,1 V), на 5 добу – 43 V (43,1 V), на 7 добу – 44,2 V (47,37 V) та на 10 добу – 47,2 V (49,9 V), відповідно. Втім, за концентрації фосфору 0,25 г/л показники інтенсивності були встановлені тільки для клітин, які фарбували пропідіум йодидом, і, відповідно, на другу добу культивування становили 22,5 V (22,4 V), на 3 добу – 22,7 V (22,75 V), на 5 добу – 42,7 V (42,75 V), на 7 добу – 41,7 V (48,8 V) та на 10 добу – 47,3 V

(51,1 V). За концентрації фосфору 0,5 г/л інтенсивність забарвлення клітин 2-добової культури була 12 V (12,5 V), 3-добової культури – 11,95 V (11,9 V), 5-добової культури– 20,9 V (31,95 V), 7- добової культури– 40,9 V (51,95 V) та 10-добової культури – 50,9 V (66,7 V), відповідно.

В результаті порівняльного аналізу ми встановили, що концентрації фосфору в середовищі 0,5 г/л для клітин вихідного штаму не є робочими. Адже за цієї концентрації фосфору апоптичних клітин набагато більше, в порівнянні з іншими. Також при переході клітин із експоненціальної фази розвитку в стаціонарну не було виявлено значної різниці між клітинами, які були взяті із центра колонії та краю. Це вказує на те, що не відбулося диференціювання клітин на L- та U-клітини. Адже згідно літературних даних кількість мертвих клітин нижнього шару має бути менше, бо вони є субстратом для клітин верхнього шару і є менш життєздатними [13,15,17.]. Подібну ситуацію спостерігали і для клітин мутантного штаму, але за концентрації фосфору 0,1 г/л та 0,25 г/л. Натомість, ми виявили, що найкращий показник прискорення життєвого циклу та перехід із однієї фази розвитку в іншу з пришвидшеною диференціацією клітин притаманний для клітин вихідного штаму за наявності концентрації фосфору в середовищі 0,25 г/л, в той час як для клітин мутантного штаму - 0,5 г/л. Це пояснюється тим, що саме за таких умов культивування кількість клітин є найвищою, та різниця між клітинами із центру та краю колонії становить майже 1,25 рази. Тобто, відбувається пришвидшений перехід із логарифмічної фази розвитку в стаціонарну, адже кількість мертвих клітин збільшується, що вказує на прискорений перехід у фазу аутофагії. Особливо це чітко видно у клітинах вихідного штаму за концентрації фосфору 0,25 г/л.

3.2. Дослідження еволюційних зв'язків основних поліфосфатів сахароміцетів

Філогенетичне дерево поліфосфатів сахароміцетів є інструментом, який використовується для вивчення еволюційних зв'язків між цими мікроорганізмами та їхніми генетичними характеристиками, пов'язаними з метаболізмом поліфосфатів. Поліфосфати грають важливу роль у біологічних процесах, таких як зберігання енергії, регуляція рН та інші. Філогенетичне дерево може допомогти встановити, як еволюційно різні види сахароміцетів використовують поліфосфати і як цей метаболізм може відрізнитися між ними (рис. 3.3).

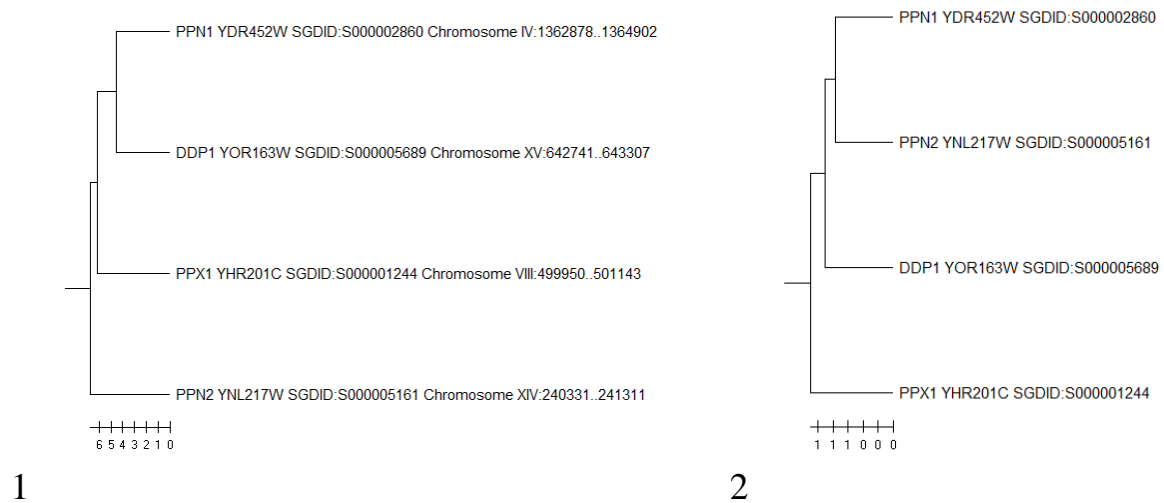


Рисунок 3.3. Філогенетичне дерево поліфосфатів сахароміцетів на основі нуклеотидної послідовності (1) та амінокислотної послідовності (2).

Під час аналізу філогенетичного дерева поліфосфатів сахароміцетів ми встановили, що ензим Ppn1 пройшов найбільш довгий еволюційний шлях від спільного предка поліфосфатів роду *Saccharomyces*. Це означає те, що цей ензим міг грати важливу роль у пристосуванні сахароміцетів до різних середовищ. Найбільш довгий еволюційний шлях може вказувати на те, що цей ензим був підданий інтенсивній доборові дії впродовж часу. вказувати на те, що у різних видів *Saccharomyces* цей ензим міг підтверджуватися різним варіантам підбору. Також це може бути наслідком різноманітність функцій цього ензиму в різних видів або штаммах сахароміцетів. З іншого боку, це також може свідчити про те, що функція ензиму Ppn1 дуже консервативна,

тобто вона важлива для біологічних процесів *Saccharomyces*, і тому вона збереглась протягом тривалого періоду еволюції без значних змін. Тобто, з цього слідує, що поліфосфат Ppn1 є дійсно одним із важливих полі(ф) метаболізму поліфосфатів, який є основним для підтвердження функції фосфору в міжклітинних взаємодіях.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Диференціація клітин на міжклітинні комунікації є одним із необхідних напрямів дослідження для знаходження проблем порушення клітинного та життєвого циклу клітин. Це може допомогти подолати онкологічні захворювання та різні патології. На сьогоднішній день більшість наукових робіт спрямовано на дослідження речовин, які можуть регулювати міжклітинні комунікації. Ми припустили, що само поліфосфати завдяки своїм властивостям та структурі, а також присутності в організмах, які перебувають на різних еволюційних рівнях, можуть бути консервативними та первинними молекулами, які регулюють ці процеси. Це рішення було також прийняте на підставі того, що поліфосфати беруть участь в багатьох клітинних процесах, наприклад, експерсія генів, клітинний транспорт речовин реакції на стрес. Для того, щоб перевірити вплив фосфору на диференціацію клітин, як об'єкт дослідження ми обрали *Saccharomyces cerevisiae*. Адже згідно літературних даних цей представник сахароміцетів є ідеальним об'єктом для дослідження багатьох біологічних процесів, таких як, вивчення основних принципів генетики, механізмів контролю клітинного поділу та поділу хромосом, шляхи передачі сигналів всередині клітини та між клітинами, аналіз основних шляхів метаболізму глюкози і т.д [17]. Тому для вивчення впливу різної концентрації фосфору на диференціювання

клітин ми обрали 2 штами *S. cerevisiae* C3, який є батьківським штамом, та C5 – мутантний штам, який дефектний за геном *ppn1*, який кодує фермент ендософсфатазу Ppn1, внаслідок чого порушується метаболізм поліфосфатів [63].

На підставі аналізу літератури ми обрали проточну цитофлуориметрію для дослідження впливу фосфору на структурні зміни клітин обох штамів. Ми встановили, що із підвищення концентрації фосфору в середовищі внутрішньоклітинна складність підвищується. На підставі отриманих результатів ми припускаємо, що фосфор може брати важливу участь в резерві життєво необхідних речовин для нормального росту та функціонування клітини. Також з підвищенням вмісту фосфору мітохондріальна активність клітин зростала, що може свідчити про активний поділ клітин, а також їх диференціювання на спеціалізовані L- та U-клітини. Підтвердженням цього є також те, що за підвищення концентрації фосфору в середовищі культивування перехід в стаціонарну фазу розвитку культури обох штамів пришвидшився. Ми спостерігали збільшення накопичення біомаси колоній та дуже чітку межу між шарами, в яких локалізуються відповідні вищезгадані спеціалізовані клітини. На підставі цих даних ми можемо зробити попередній висновок, що фосфору дійсно бере пряму участь в клітинній диференціації клітин. Також, при зростанні концентрації фосфору в середовищі культивування на деяких колоніях ми спостерігали, як колонії спрямовано росли одна до одної. Тобто, це може означати, що фосфор дійсно може бути одним із первинних регуляторів сигнальних шляхів клітин, що беруть участь в міжклітинних комунікаціях.

ВИСНОВКИ

1. Із підвищенням вмісту фосфору до 0,25 г/л в середовищі культивування відбувається збільшення накопичення біомаси та утворюється більш чітка межа між шарами, які містять L- та U-клітини вихідного штаму. Водночас, подібну ситуацію спостерігаємо у клітин мутантного штаму, однак за концентрації фосфору 0,5 г/л.
2. Із зростанням концентрації фосфору в середовищі збільшувалися розміри та гранулярність клітин штаму *S. cerevisiae* C3 та C5.
3. Збільшення вмісту фосфору в середовищі культивування позитивно впливало на мітохондріальну активність клітин як і батьківського, так і мутантного штамів. Це свідчить про активну диференціації клітин на відповідні спеціалізовані клітини.
4. Дослідження філогенетичних зв'язків поліфосфатів сахароміцетів підтвердило те, що поліфосфат Ppn1 є основним полі(Ф) для підтвердження функції фосфору в міжклітинних взаємодіях.
5. За концентрації фосфору 0,25 г/л в середовищі культивування клітини батьківського штаму мали найкращі якісні та кількісні показники. Натомість для клітин мутантного штаму така залежність спостерігалася за концентрації фосфору 0,5 г/л.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Brown MRW, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National academy of science* [Internet]. 2004 Dec [cited 2024 April];101(46):160985-7. DOI: 10.1073/pnas.0406909101.
2. Belda I, Ruiz J, Santos A, Wyk N, Pretorius I. *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in genetic* [Internet]. 2019 Dec [cited 2024 April];35(12):956-957. DOI: 10.1016/j.tig.2019.08.009.
3. Kovacevic M. Morphological and physiological characteristics of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells differing in the life span [Master thesis]. Zagreb. University of Zagreb. 2015. 87 p.
4. McKinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology* [Internet]. 2018 Feb [cited 2024 March];120:5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.
5. Salem AZM, Kholif AE, Puniya AK, editors. *Yeast Additive and animal production*. India. PubBioMed central research publishing services. 2016. Chapter 2. Yeast: description and structure. p. 4-13. ISBN: 978-93-83312-02-3.

6. Sulmiyati S, Said NS, Fahrodi DU, Malaka R, Maruddin F. The Characteristics yeast isolated from commercial kefir grain. *Hasanuddin [Internet]*. 2019 May [cited 2023 Dec];1(1):26-37. DOI: 10.20956/hajas.v1i1.6519.
7. Dickinson RJ, Schweizer M, editors. *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. 2nd ed. London. Taylor and Francis Ltd. 2004. 476 p. ISBN: 9780415299008.
8. Fischer G, Liti G, Llorente B. The budding yeast life cycle: more complex than anticipated? *Yeast extracts [Internet]*. 2020 Nov [cited 2023 Nov];38(1):5-11. DOI: 10.1002/yea.3533.
9. Smith TJ, White JW, Hua H, Schneider LB. Yeast lifespan variation correlates with cell growth and SIR2 expression. *PLoS One [Internet]*. 2018 Jul [cited 2024 Feb];13(7):e0200275. DOI: [10.1371/journal.pone.0200275](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200275).
10. Svecizer A, Tyson JJ, Novak B. Modelling the fission yeast cell cycle. *Briefings in functional genomics and proteomics [Internet]*. 2004 Mar [cited 2024 March];2(4):298-307. DOI: 10.1093/bfgp/2.4.298.
11. Horst F. *Yeast molecular and cell biology*. 2nd ed. Perpustakaan UI. Willey- Blackwell. 2012. 464 p. ISBN: 978-3-527-33252-6.
12. Alshaim H, Vojisavljevic, Pirogova E. Effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *IFMBE proceedings [Internet]*. 2013 Jan [cited 2023 Nov];39:48-51. DOI: 10.1007/978-3-642-29305-4_14.
13. Palková, Z, & Váchová, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Seminars in cell and developmental biology [Internet]*. 2016 Sep [cited 2023 Oct];57:110-19. pp. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.04.006.
14. Palková Z, Wilkinson D, Váchová L. Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS yeast research [Internet]*. 2014 Feb [cited 2024 Jan];14(1):96-108. DOI: 10.1111/1567-1364.12103.

15. Váchová L, Čáp M, Palková Z. Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxidative medicine and cellular longevity* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Dec];45. DOI: 10.1155/2012/601836.
16. Váchová L, Váchová L. Aging and longevity of yeast colony populations: metabolic adaptation and differentiation. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2011 [cited 2023 Aug];39 (5): 1471–1475]. DOI: 10.1042/BST0391471
17. Čáp M, Stěpánek L, Harant K, Váchová L, Palková Z. Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Molecular cell* [Internet]. 2012 May [cited 2023 Sep];46(4):436-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.04.001.
18. Volodyaev IV, Krasilnikova EN, Ivanovsky RN. CO₂ Mediated Interaction in Yeast Stimulates Budding and Growth on Minimal Media. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr [cited 2024 Jan] 8(4):e62808. DOI: 10.1371/journal.pone.0062808.
19. Compagno C, Piskur J, editors. *Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism*. Heidelberg. Springer. 2014. 326 p. ISBN: 978-3-642-55012-6 hors.
20. Piccirillo S, Morales R, White MG, Smith K, Kapros T, Honigberg SM. Cell differentiation and spatial organization in yeast colonies: role of cell-wall integrity pathway. *Genetics* [Internet]. 2015 Dec [cited 2023 Nov];201(4):1427-38. DOI: 10.1534/genetics.115.180919.
21. Váchová L, Čáp M, Palková Z. Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxidative medicine and cellular longevity* [Internet]. 2012 Aug [cited 2024 Feb];45. DOI: 10.1155/2012/601836,16.
22. Palková, Z, & Váchová, L. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Seminars in cell and developmental biology* [Internet]. 2016 Sep [cited 2024 Feb];57:110-19. pp. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.04.006,16.

23. Wloch-Salamon DM, Bem AE. Types of cell death and methods of their detection in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology* [Internet]. 2012 Sep [cited 2023 Aug]; 114(2):287-98. DOI: 10.1111/jam.12024. Epub 2012 Oct 29.
24. Zara G, Budroni M, Mannazzu I, Fancello F, Zara S. Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World journal of microbiology and biotechnology* [Internet]. 2020 Aug [cited 2024 Jan]; 36(9):134. DOI: 10.1007/s11274-020-02911-5.
25. Morrissey JH, Choi SC, Smith SA. Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Blood* [Internet]. 2012 Jun [cited 2023 Aug]; 119(25): 5972–5979. DOI: [10.1182/blood-2012-03-306605](https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-306605)
26. Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* [Internet]. 2016 Aug [cited 2023 Sep]; 101(3):367-80. DOI: 10.1111/mmi.13396.
27. Achbergerová L, Nahálka J. Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial Cell Factories* [Internet]. 2011 Aug [cited 2023 Jul]; 10:63. DOI: 10.1186/1475-2859-10-6.
28. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1999 [cited 2024 Jan]; 68:89-125. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.89.
29. Beauvoit B, Rigoulet M, Guerin B, Canioni P. Polyphosphates as a source of high energy phosphates in yeast mitochondria: A ³¹P NMR study. *FEBS Lett* [Internet]. 1989 [cited 2023 Jul]; 252(1–2):17-21. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80882-8.
30. Sethuraman A, Rao NN, Kornberg A. The endopolyphosphatase genes: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* [Internet]. 2001 Jul [cited 2023 Sep]; 98(15):8542-7. DOI: 10.1073/pnas.151269398.

31. The Reduced Level of Inorganic Polyphosphate Mobilizes Antioxidant and Manganese-Resistance Systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* [Internet]. 2019 May [cited 2023 Sep];8(5):461. DOI: 10.3390/cells8050461.
32. Albi E, Serrano A. Two exopolyphosphatases with distinct molecular architectures and substrate specificities from the thermophilic green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* TLS. *Microbiology* [Internet]. 2014 Sep [cited 2023 Sep];160(Pt 9):2067-78. DOI: 10.1099/mic.0.080952-0.
33. Andreeva NA, Kulakovskaya TV, Kulaev IS. High molecular mass exopolyphosphatase from the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PPN1 gene. *Biochemistry* [Internet]. 2006 Sep [cited 2023 Sep];71(9):975-7. DOI: 10.1134/s0006297906090045.
34. Albi T, Serrano A. Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2016 Feb [cited 2023 Oct];32(2):27. DOI: 10.1007/s11274-015-1983-2.
35. Rao NN, Liu S, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: The phosphate regulon and the stringent response. *Journal of bacteriology* [Internet]. 1998 [cited 2023 Nov]; 180(8): 2186-93. DOI: 10.1128/JB.180.8.2186-2193.1998.
36. Rashid MH, Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of bacteriology* [Internet]. 2000 Jan [cited 2023 Oct];182(1):225-7. DOI: 10.1128/JB.182.1.225-227.2000.
37. Azevedo C, Saiardi A. Functions of inorganic polyphosphates in eukaryotic cells: A coat of many colours. *Biochemical society transactions* [Internet]. 2014 Feb [cited 2023 Dec];42(1):98-102. DOI: 10.1042/BST20130111.
38. Oliveira AP, Ludwig C, Picotti P, Kogadeeva M, Aebersold R, Sauer U. Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Molecular systems biology* [Internet]. 2012 [cited 2023 Nov];8:623. DOI: 10.1038/msb.2012.55.

39. Chasman D, Ho YH, Berry DB, Nemeč CM, MacGilvray ME, Hose J, Merrill AE, et al. Pathway connectivity and signaling coordination in the yeast stress-activated signaling network. *Molecular systems biology* [Internet]. 2014 Nov [cited 2023 Dec];10(11):759. DOI: 10.15252/msb.20145120.
- 40.. Kulakovskaya T, Pavlov E, Dedkova EN. Inorganic polyphosphates in eukaryotic cells. New York: Springer International Publishing. 2016. 243 p.
41. Gerasimaite R, Mayer A. Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles. *Biochemical society transactions* [Internet]. 2016 Feb [cited 2024 Jan] ;44(1):234-9. DOI: 10.1042/BST20150213.
42. Freimoser FM, Hürlimann HC, Jakob CA, Werner TP, Amrhein N. Systematic screening of polyphosphate (poly P) levels in yeast mutant cells reveals strong interdependence with primary metabolism. *Genome biology* [Internet] 2006 Nov [cited 2022 May];7:R109. DOI:10.1186/gb-2006-7-11-r109.
43. Hothorn M, Neumann H, Lenherr ED, Wehner M, Rybin V, et al. Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science* [Internet]. 2009 Apr [cited 2023 Dec];24;324(5926):513-6. DOI: 10.1126/science.1168120.
44. Desfougères Y, Gerasimaitė RU, Jessen HJ, Mayer A. Vtc5, a Novel Subunit of the Vacuolar Transporter Chaperone Complex, Regulates Polyphosphate Synthesis and Phosphate Homeostasis in Yeast. *Biol Chem* [Internet]. 2016 Oct [cited 2023 Dec];14;291(42):22262-22275. DOI: 10.1074/jbc.M116.746784.
45. DeSousa AB, Downey M. Vtc5 Is Localized to the Vacuole Membrane by the Conserved AP-3 Complex to Regulate Polyphosphate Synthesis in Budding Yeast. *mBio* [Internet]. 2021 Oct [cited 2024 Jan];26;12(5):e0099421. DOI: 10.1128/mBio.00994-21.

46. Andreeva N, Lichko L, Trilisenko L, Kulakovskiy IV, Kulakovskaya T. Yeast Polyphosphatases PPX1 and PPN1: Properties, Functions, and Localization. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan];10(3): e0119594. DOI: 10.1371/journal.pone.0119594.
47. Andreeva N, Ledova L, Ryazanova L, Tomashevsky A, Kulakovskaya T, Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases. *Biochimie* [Internet]. 2019 Aug [cited 2023 Dec];163:101-107. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.06.001.
48. Ryazanova L, Ledova L, Andreeva N, Zvonarev A, Eldarov M, Kulakovskaya T. Inorganic polyphosphate and physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* yeast overexpressing Ppn2. *Biochemistry* [Internet]. 2020 Apr [cited 2024 Apr];85(4):516-22. DOI: 10.1134/S0006297920040124.
49. Southwest Center for Microsystems Education (SCME). Atomic Force Microscope. 2017. 17 p.
50. Schreiber F. Atomic Force Microscope. Institut für Angewandte Physik - Universität Tübingen.
51. Agrawal DH. A Portable Experimental set-up for AFM to work at cryogenic temperature. 2012 May [cited 2024 Jan]; 1447(1):531-532. DOI: 10.1063/1.471011.
52. Drive Q, Jose S. Introduction to flow cytometry. USA. Becton, Dickinson and company. 2002. 58 p. ISBN: 11-11032-03.
53. Bajgelman MC. Principles and applications of flow cytometry. Academic press [Internet]. 2019 Mar [cited 2023 Nov];8:119-24. DOI: 10.1016/B978-0-12-816548-5.00008-3.
54. Manohar SM, Shah P, Nair A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. *Bioanalysis* [Internet]. 2021 Feb [cited 2024 Feb];13(3):181-98 DOI: 10.4155/bio-2020-0267.

55. Fox A, Dutt TS, Karger B. Cyto-feature engineering: a pipeline for flow cytometry analysis to uncover immune populations and association with disease. *The Journal of Immunology* 204(1_Supplement) [Internet]. 2020 May [cited 2024 Feb];159.27-159.27. DOI: 10.4049/jimmunol.204.Supp.159.27.
56. Flow Cytometers. LearnHaem [Internet]. 2021 Jun [cited 2024 Mar]. Available from: <https://www.learnhaem.com/courses/flow-cytometry/lessons/flow-cytometers/>
57. Gauthier J, Vincent AT, Charette S, Derome N. A Brief History of Bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics* [Internet]. 2018 Aug [cited 2024 Jan];(bby063):1-16. DOI: 10.1093/bib/bby063
58. Bioinformatics explained: BLAST. CLCbio [Internet]. 2007 Mar [cited 2024 Jan];11. Available from: https://www.ccg.unam.mx/~vinaesa/tlem/pdfs/Bioinformatics_explained_BLAST.pdf.
59. Горобець СВ, Горобець ОЮ, Дем'яненко ІВ. Біоінформатика практикум. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського 2020. 86 с.
60. Горобець СВ, Горобець ОЮ, Булаєвська МО. Біоінформатичні бази даних. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського 2020. 117 с.
61. Arweiler R, Vairoch A, Wu CH, Barker WC, Bockmann B, Ferro S, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Jan [cited 2024 Feb];32: D115–D119. DOI: 10.1093/nar/gkh131
62. Voychuk S, Gromozova EN. The Functional Role of PPN1 and PPX1 Polyphosphatases under Stresses Action and for Adaptive Response Development. *Mikrobiol* [Internet]. 2020 Feb [cited 2023 Oct];82(1):3-1. DOI: 10.15407/mikrobiolj82.01.003.
63. Бухалов АС. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка. 1998. 177 стр.

64. King AP, Eckersley RJ. Inferential statistics IV: choosing a hypothesis test. *Statistics for biomedical engineers and scientists* [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep]; 7:147-71. DOI: 10.1016/B978-0-08-102939-8.00016-5.
65. Glantz SA. *Primer of biostatistics* [Internet]. New York: McGraw-Hill; 1994 [cited 2024 Jan] 462 p. Available from: <http://medstatistic.ru/articles/glantz.pdf>. ISBN^ 5-89816-009-4, 0-07-024268-2.
66. Baen J, Boumasmoud M, Kouyos RD, Zinkernagel AS, Vulin C. Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Scientific reports* [Internet]. 2020 Sep [cited 2023 Dec]; 10(1):16084. DOI: 10.1038/s41598-020-72979-4.

Додаток 1

Показники FI2_log зафарбованих клітин штамів *S. cerevisiae* C3 та C5 за різної концентрації фосфору в середовищі культивування

Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	2 доба культивування			
		центр	край	центр	край
		Акридин жовтий		Пропідіум йодид	
		FI2_log			
<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	9,2	9,1	19	18,7
	0,25	4,6	4,5	15	15,1
	0,5	13,4	13,2	25,1	24,9
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	16	15,85	23,1	22,0
	0,25	19,8	19,75	22,5	22,4
	0,5	21,5	21,38	12	12,15
Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	3 доба культивування			
		центр	край	центр	край
		Акридин жовтий		Пропідіум йодид	
		FI2_log			

<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	9,25	9,2	20,2	20,1
	0,25	4,5	4,35	16,15	16,1
	0,5	13,38	13,3	24,5	24,4
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	16,05	16	23	23,1
	0,25	19,7	19,65	22,7	22,75
	0,5	21,9	21,85	11,95	11,9
Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	5 доба культивування			
		Центр	Край	центр	край
		Акридин жовтий		Пропідіум йодид	
		Fl2_log			
<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	18,67	16,65	30,2	41,1
	0,25	8,6	5,62	56,15	46,1
	0,5	10,4	8,3	54,5	48,4
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	16,9	14	43	43,1
	0,25	10,37	7,35	42,7	42,75
	0,5	32,85	26,8	20,9	31,95
Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	7 доба культивування			
		центр	Край	центр	край
		Акридин жовтий		Пропідіум йодид	
		Fl2_log			
<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	12,8	9,7	35,2	47,1
	0,25	10,4	5,7	69,15	57,3
	0,5	16,7	14,7	55	49,3
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	16,8	13,75	44,2	47,3
	0,25	10,1	7	41,7	48,8
	0,5	18,5	10,4	40,9	51,95
Рід, вид, штам	Концентрація фосфору в середовищі, г/л	10 доба культивування			
		центр	Край	центр	край
		Акридин жовтий		Пропідіум йодид	
		Fl2_log			
<i>S. cerevisiae</i> C3	Контроль (0,1)	11,7	8,9	40,1	50,2
	0,25	9,4	3,2	72,1	64,5
	0,5	14,7	13,2	57,2	50,1
<i>S. cerevisiae</i> C5	Контроль (0,1)	15,5	12,8	47,2	49,9
	0,25	12,2	6,8	47,3	51,1

	0,5	17,5	9,1	50,9	66,7
--	-----	------	-----	------	------