

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ γ – ИЗЛУЧЕНИЯ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru

Поступила в редакцию: 07.07.2020

Аннотация. Целью работы является изучение влияния γ -лучей на клетки дрожжей путем регистрации изменений параметров флуоресценции пирена в мембранах. С использованием метода флуоресцентных зондов проведена оценка микровязкости мембран клеток дрожжей при действии γ -облучения в дозе 5-150 Гр. По данным спектров флуоресценции пирена определяли микровязкость липидного бислоя и зон белок-липидных контактов. Показано, что различные дозы по-разному изменяют такие физические параметры мембраны как микровязкость и полярность липидного бислоя. Согласно полученным результатам, показано, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик мембран являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что процессы адаптации при большой дозе облучения (75-100 Гр) клеток дрожжей, очевидно, завершаются в более ранние сроки.

Ключевые слова: микровязкость, клетки дрожжей, γ -излучение, пирен, полярность

ВВЕДЕНИЕ

Биологическим мембранам отводиться любая из основных функций которой является для клетки жизненно необходимой (барьерная, транспортная, рецепторно-сигнальная, регуляторно-ферментативная). По мере увеличения дозы γ -излучения наблюдается подавление механизмов активного и пассивного транспорта, нарушается проницаемость ионов калия. Любой вид ионизирующего излучения приводит к широкому спектру биологических изменений в организме. Основным свойством γ -лучей является их способность разрушать сложность биологических реакций, их взаимосвязь, порядок, повреждать регуляторные функции системы [18]. По мере усложнения биологической организации γ -лучи способствуют образованию и действию активных радикалов воды и липидов, радиотоксинов, усилению автолитических процессов, нарушению клеточной и нейрогуморальной систем регуляции [8, 12, 17]. Таким образом, результатом действия ионизирующих излучений могут быть как функциональные, так генетически значимые события в клетке [14, 19].

Показано, что различные дозы и характер облучения (хроническое или острое) по-разному изменяют такие физические параметры мембраны как микровязкость и полярность липидного бислоя [3, 9].

Некоторыми авторами основываясь на результатах, полученных в модельных мембранных системах, показано, что развитие постлучевых изменений в мембранах эритроцитов организмов, облученных в малых дозах и с низкой мощностью происходит вследствие нарушения белок-белковых, белок-липидных и липид-липидных взаимодействий. Известно, что для оценки изменений подвижности элементов мембранной структуры как липидов, так и белков, можно использовать такой интегральный показатель, как вязкость [4, 11].

Булановой Е.Б. с соавторами, был проведен широкий комплекс биохимических и биофизических исследований клеток органов животных (мышей), подвергнутых γ -облучению (^{137}Cs) низкой интенсивности [4, 6]. В отличие от структурных характеристик ДНК (адсорбция) микровязкость обеих фаз мембран на нитроцеллюлозных фильтрах значительно отличается от контроля в интервале доз 6-9,6 сГр [18]. Обращает на себя внимание сравнимый масштаб синхронных структурных сдвигов, происходящих в ДНК и мембранах под влиянием столь малых доз излучения низкой интенсивности. Предлагаемое авторами объяснение природы нелинейной бимодальной зависимости эффекта от дозы основывается на представлениях о том, что существует разрыв между дозами, вызывающими повреждения в биообъектах и иницирующими системы их восстановления. В связи с этим пока системы восстановления (или адаптации) не работают с полной интенсивностью, биоэффект нарастает с увеличением дозы [4, 12].

Таким образом, для воздействия физических факторов, а именно низкоинтенсивного ионизирующего излучения характерны закономерности: нелинейная, немонотонная, бимодальная зависимость эффекта от дозы, наличие «мертвой зоны», изменение чувствительности к действию эндогенных и экзогенных факторов, обратная зависимость от интенсивности облучения [2, 5]. Выявлено, что воздействие γ -излучения и пучков ускоренных альфа-частиц на эритроциты человека в диапазоне доз выше величины ~ 1 кГр приводит к гибели облученных клеток непосредственно сразу после облучения [15, 16]. Показано количество центров повреждения в биологической мембране при действии γ -излучения в малых дозах. При воздействии γ -излучения в малых дозах (1-35 Р) на суспензию эритроцитов наблюдается зона нестабильности биологического отклика [1]. В литературе имеются данные, посвященные механизмам радиорезистентности жизнеспособности и способности колониеобразования у дрожжей [6, 19].

То есть биота на нашей планете использует малые дозы радиации и нуждается в них [14]. Этот вывод, с одной стороны, хорошо согласуется с многочисленными работами, показавшими, что γ -облучение в небольших

дозах стимулирует развитие растений [12, 19], а с другой – находится в противоречии с общепринятым положением в радиобиологии о вредности любой дозы радиации для биоты.

Существенная роль в регуляции процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их микровязкости комплексному показателю, который отражает как структурные, так и функциональные (диффузионные) аспекты липидной составляющей мембраны. Изменения микровязкости мембраны тесно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в клетке [4, 7].

Настоящая работа посвящена изучению влияния гамма лучей на клетки дрожжей путем регистрации изменений параметров флуоресценции пирена в мембранах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Клетки дрожжей выращивали на сусло-агаре, в термостате при температуре 28⁰С. Опыты проводили с суспензией 3-х дневной культуры (1×10⁸ кл/мл). Облучение клеток дрожжей осуществляли γ -квантами на установке ⁶⁰Со. Доза облучения составляла 5Гр-150Гр.

1 мл суспензии, выравненной по содержанию белка помещали на магнитную мешалку и добавляли 10⁻³ М раствор пирена в этаноле: 0,001мл в суспензию клеток. Через 1 мин (время полного растворения пирена в липидной фазе мембран) измеряли флуоресценцию проб на спектрофлуориметре при максимуме волны возбуждающего света 334 нм для оценки микровязкости липидного бислоя. Пик флуоресценции эксимера пирена F_Э регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера F_м при длине волны эмиссии 393 нм.

Коэффициент эксимеризации пирена F_Э/F_м (334) отражающий микровязкость липидного бислоя, выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена F_Э (в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$ нм) к величине максимума флуоресценции мономеров пирена F_м ($\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$ нм) при λ возбуждения 334 нм. Коэффициент эксимеризации пирена F_Э/F_м (282), отражающий микровязкость зон белок-липидных контактов, также выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена (в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$ нм) и мономеров пирена в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$ нм) при λ возбуждения 334 нм. Отношение интенсивности флуоресценции эксимеров к мономерам F_Э/F_м обратно пропорционально микровязкости липидного бислоя и прямо пропорционально его текучести.

Полярность липидной фазы мембран (F₃₇₂/F₃₉₃(334)) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_м пирена при длине волны возбуждения 334 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм. Полярность зон белок-липидных контактов (F₃₇₂/F₃₉₃(282)) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_м пирена при длине волны возбуждения 282 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм [5].

В настоящей работе изучено влияние γ -облучения на развитие процессов ПОЛ в клетках *Candida guilliermondii*. О скорости перекисного фотоокисления липидов в мембранах судили по накоплению одного из продуктов окисления малонового диальдегида (МДА), концентрацию которого определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК «Sigma»), измеряя оптическую плотность комплекса МДА-ТБК в максимуме спектра его поглощения при 532 нм ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Масло зародышей пшеницы использовали в концентрации 20 нл на 10⁸ кл/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия студента.

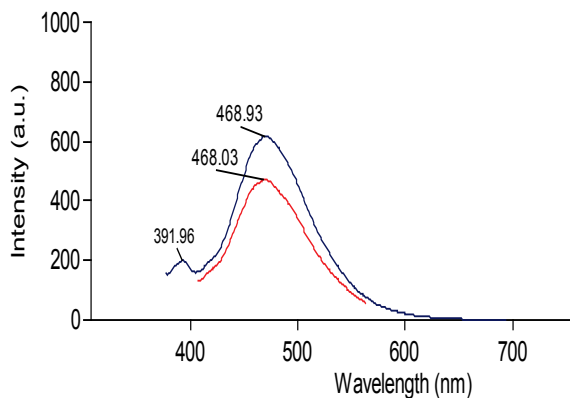
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

γ -облучение клеток дрожжей в дозе 5-50 Гр судя по коэффициенту эксимеризации, приводила к увеличению микровязкости (уменьшению текучести) общего липидного бислоя мембран. Аналогичные процессы отмечались также в областях аннулярных (при белковых) липидов (рис. 1). После облучения в дозе 50-150 Гр также наблюдалось изменение параметров, характеризующих физическое состояние липидного бислоя и аннулярных липидов мембран клеток дрожжей.

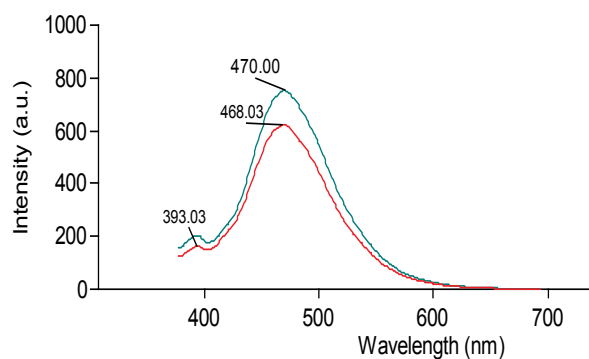
Данные полученные при использовании флуоресцентного зонда пирена свидетельствует об изменении исследуемых параметров структурного состояния клеточных мембран. На основании данных об изменении микровязкости мембран дрожжей после облучения можно предположить, что модификация структуры может приводить к изменению полярности липидного бислоя проницаемости.

Полярность окружения зонда пирена в липидном слое мембран F₃₇₂/F₃₉₃(334) увеличивается при облучении клеток дозой 5-50 Гр (рис 2.).

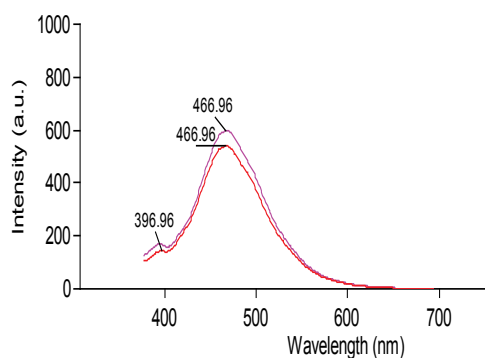
При оценке полярности общего мембранного липидного бислоя установлено, что при облучении в дозе 75-150 Гр наблюдалось незначительное уменьшение полярности липидного компонента мембран клеток. Полярность окружения зонда пирена в области аннулярных липидов F₃₇₂/F₃₉₃(282) не имеет существенных отличий от контроля при дозах облучения клеток от 5 до 50 Гр. Динамика полярности микроокружения пирена в мембранах клеток дрожжей имеет лишь тенденцию к снижению в участках аннулярных липидов после облучения дозой 75-150 Гр. В липидном слое мембраны полярность несколько возрастает, что согласуется с данными о



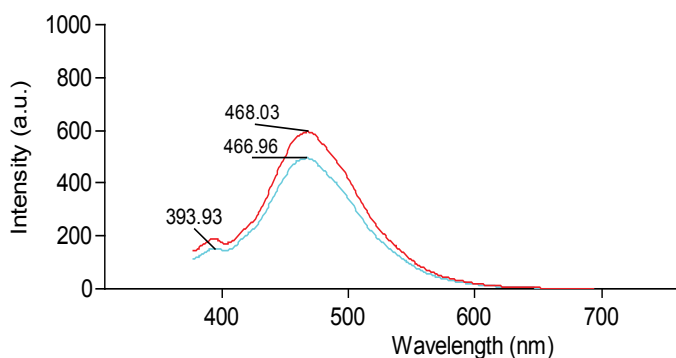
λ возбуждения-282 нм-Контроль
λ возбуждения -334 нм-Контроль



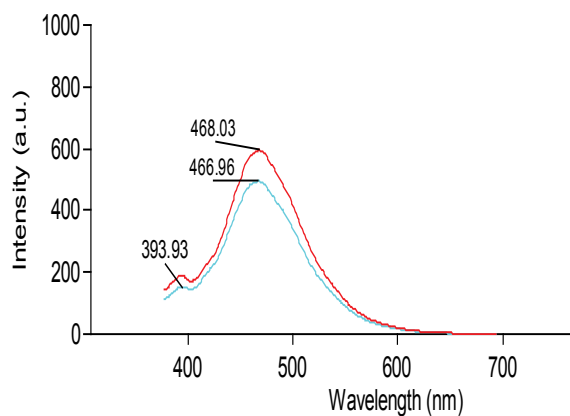
λ возбуждения-282 нм (доза-5 Гр)
λ возбуждения -334 нм (доза-5 Гр)



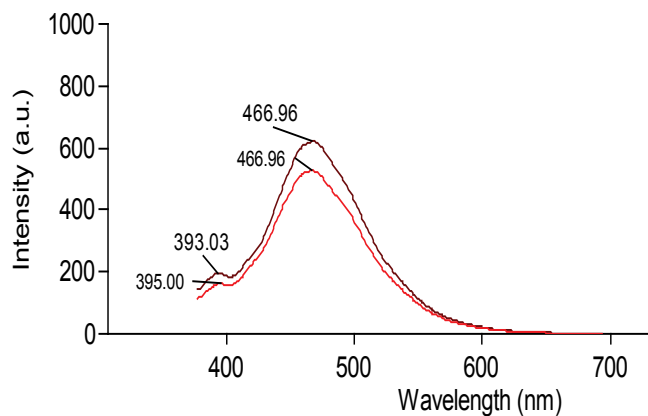
λ возбуждения-282 нм (доза-20 Гр)
λ возбуждения -334 нм (доза-20 Гр)



λ возбуждения-282 нм (доза-50 Гр)
λ возбуждения -334 нм (доза-50 Гр)



λ возбуждения-282 нм (доза-100 Гр)
λ возбуждения -334 нм (доза-100 Гр)



λ возбуждения-282 нм (доза-150 Гр)
λ возбуждения -334 нм (доза-150 Гр)

Рисунок 1. Изменение микровязкости липидного бислоя и зон белок-липидных контактов плазматических мембран клеток дрожжей от дозы γ -излучения

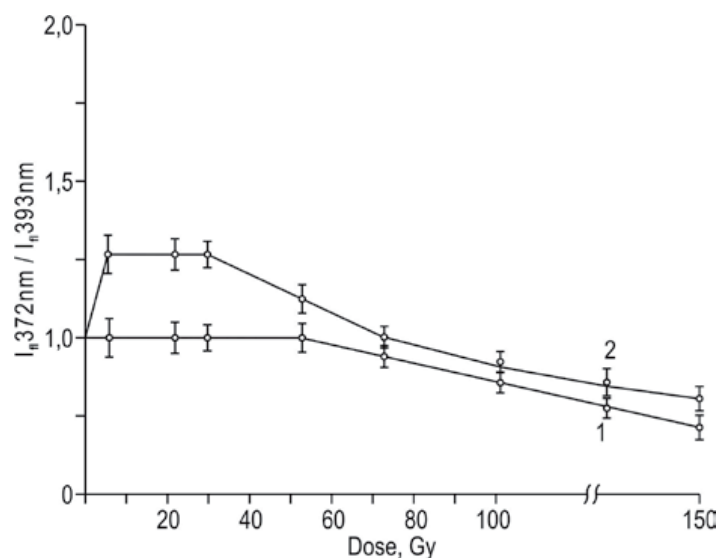


Рисунок 2. Изменение полярности липидного бислоя и зон белок-липидных контактов от дозы γ -излучения. 1) 282 нм; 2) 334 нм

накоплении в мембранах клеток первичных продуктов ПОЛ. Последствия повреждений компонентов мембран, вызванных γ -облучением вызывает необходимость более глубокого изучения влияния γ - облучения на процессы ПОЛ биомембран.

Именно на уровне дрожжевой клетки вопросы, связанные с регуляцией ПОЛ наименее изучены по сравнению с другими организмами, в то время как клеточные регуляторные механизмы у микроорганизмов играют существенно большую роль.

Установлена зависимость количества МДА образованного в клетках дрожжей от дозы γ - облучения. Показано, что с ростом дозы γ - облучения (5-150 Гр) в мембранах клеток происходит увеличение концентрации МДА, что свидетельствует о развитии процесса ПОЛ. Концентрация МДА была наибольшей при облучении клеток, в дозе 75 Гр которая превышала контрольные значения в 2 раза.

При стимуляции ПОЛ в мембранах уменьшается содержание липидов, также меняется микровязкость и электростатический заряд. При более глубоком окислении фосфолипидов нарушается структура липидного бислоя и появляются дефектные зоны в мембранах клеток, а это нарушает функциональную активность [7].

Как известно, изменение вязкостных характеристик является отражением различных модификаций межмолекулярных связей, которые, по сути, определяются сочетанием уровней подвижных и стабильных взаимодействий компонентов мембран, что вытекает из представлений о мембранной структуре, основанных на двух гипотетических моделях: жидко-мозаичной [9] и твердо-каркасной [11]. В одной из них подчеркиваются динамические аспекты организации мембран, в другой – на первый план выходит стабильность ее компонентов и межмолекулярных связей.

Таким образом, можно полагать, что при облучении клеток дрожжей в дозе 75-100 вязкостные характеристики мембран незначительно отличаются от контроля, что указывает на установление относительной стабильности структуры и функции мембран.

После облучение в дозах 5-50 Гр изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента, повидимому являются отражением адапционных структурно функциональных перестроек.

Из полученных данных, об особенностях влияния масла зародышей пшеницы во время γ -облучения следует, что модификация мембраны клеток вызванной малыми дозами носит обратимый характер и не имеет отличий от контроля как липидного бислоя и липидной фазы в при белковой области мембран клеток дрожжей. Так, после воздействия γ - облучения в дозе 75-100 Гр отмечались сходные эффекты - при облучении в присутствии масла зародышей пшеницы, вязкость липидного бислоя и белок-липидных контактов мембран клеток дрожжей в норме. Полученные нами данные, свидетельствуют о радиозащитном действии масла зародышей пшеницы.

Живая клетка наделена сложными, и в тоже время очень тонкими метаболическими механизмами и не может продолжать свою деятельность в случае даже небольшого повреждения. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что процессы адаптации при большой дозе облучения клеток дрожжей, очевидно, завершаются в более ранние сроки.

Список литературы / References:

1. Алексеева П.Ю. Исследование воздействия ионизирующих излучений и химфармпрепаратов на биологические мембраны. *Автореферат дис. кандидата биологических наук*, Москва, 2007, 28 с. [Alekseeva P.Ju. Issledovanie vozdejstvija ionizirujushhijh izluchenij i himfarmpreparatov na biologicheskie membrany. *Avtoreferat dis. kandidata biologicheskijh nauk*, Moskva, 2007, 28 p. (In Russ.)]

2. Бурлакова Е.Б. Биологические эффекты действия малых доз ионизирующего излучения на клеточные мембраны: Лекции Школы по радиационной биологии в «Галактике» / Под ред. А.С. Саенко. Обнинск, 2003, с. 40-53. [Burlakova E.B. Biologicheskie jeffekty dejstvija malyh doz ionizirujushhego izlucheniya na kletochnye membrany: Lekcii Shkoly po radiacionnoj biologii v «Galaktike» / Pod red. A.S. Saenko. Obninsk, 2003, pp. 40-53. (In Russ.)]
3. Бурлакова Е.Б., Хохлов А.П. *Биол. мембраны*, 1985, т. 2, № 6, с. 557-565. [Burlakova E.B., Hohlov A.P. *Biol. membrany*, 1985, vol. 2, no. 6, pp. 557-565. (In Russ.)]
4. Буланова К.Я., Лобанок Л.М., Бокуть С.Б., Милевич Т.И. Особенности изменений структурной организации мембран эритроцитов и молекул гемоглобина в зависимости от мощности и величины дозы γ -облучения. *Экологический вестник*, 2015, № 2 (32), с.40-46. [Bulanova K.Ja., Lobanok L.M., Bokut' S.B., Milevich T.I. Osobennosti izmenenij strukturnoj organizacii membran jeritrocitov i molekul gemoglobina v zavisimosti ot moshhnosti i velichiny dozy γ -oblucheniya. *Jekologicheskij vestnik*, 2015, № 2 (32), pp. 40-46. (In Russ.)]
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. 1980, 320 с. [Vladimirov Ju.A., Dobrecov G.E. *Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membran*. 1980, 320 p. (In Russ.)]
6. Гусаревич Н.Б., Богдан А.Ц. *Биологические эффекты малых доз и радиоактивное загрязнение среды (радиоэкологические и медикобиологические последствия)*. Минск, 1998, 62 с. [Gusarevich N.B., Bogdan A.C. *Biologicheskie jeffekty malyh doz i radioaktivnoe zagrijazne-nie sredy (radiojekologicheskie i medikobiologicheskie posledstvija)*. Minsk, 1998, 62 p. (In Russ.)]
7. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов*. М. Наука, 1989, 276 с. [Dobrecov G.E. *Fluorescentnye zondy v issledovanija kletok, membran i lipoproteinov*. M. Nauka, 1989, 276 p. (In Russ.)]
8. Журавская А.Н. Биологические эффекты малых доз ионизирующих излучений (обзор). Физико-химическая биология. *Наука и Образование*, 2016, № 2, с. 94-102. [Zhuravskaja A.N. Biologicheskie jeffekty malyh doz ionizirujushhijh izluchenij (obzor). Fiziko-himicheskaja biologija. *Nauka i Obrazovanie*, 2016, № 2, pp. 94-102. (In Russ.)]
9. Конев С.В., Аксенцев С.Л., Черницкий Е.А. *Кооперативные переходы белков в клетке*. Минск: Наука и техника, 1970, 200 с. [Konev S.V., Aksencev S.L., Chernickij E.A. *Kooperativnye perehody belkov v kletke*. Minsk: Nauka i tehnika, 1970, 200 p. (In Russ.)]
10. Смотряева М.А., Круглякова К.Е., Шишкина Л.Н. и др. Структурные и биохимические показатели элементов крови мышей после гамма-облучения в малых дозах разной интенсивности. *Радиационная биология. Радиационная биология*, 1996, т. 36, № 1, с. 21-29. [Smotrjaeva M.A., Krugljakova K.E., Shishkina L.N. et al. Strukturnye i biohimicheskie pokazateli jelementov krovi myshej после gamma-oblucheniya v malyh dozah raznoj intensivnosti. *Radiac. biologija. Radiojekologija*, 1996, vol. 36, no. 1, с. 21-29. (In Russ.)]
11. Сунгуров А.Ю. *Радиобиология клеточной поверхности*. "Итоги науки и техники", ВИНТИ, сер. "Радиационная биология", 1988, т. 7, 179 с. [Sungurov A.Ju. *Radiobiologija kletochnoj poverhnosti*. "Itogi nauki i tehniki", VINITI, ser. "Radiacionnaja biologija", 1988, vol. 7, 179 p. (In Russ.)]
12. Luchkey T.D. *Hormesis with Ionizing Radiation*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1980, 169 p.
13. Kuřec M., et al. Yeast vitality determination based on intercellular NAD(P)H fluorescence measurement during Aerobic-Anarobic transition. *Fol. Microb.*, 2009, vol. 5, no. 1, pp. 25-29.
14. Kudryasheva N.S., Petrova A.S., Demytyev D.V., Bondar A.A. Exposure of luminous marine bacteria to low-dose gamma-radiation. *J Environ Radioact.*, 2017, vol. 169-170 p. 64-69. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2017.01.002. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28086187.
15. Lee S.W., Ducoff H.S. The effect of ionizing radiation on avian erythrocytes. *Radiat. Res.*, 1994, vol. 137, no. 1, pp. 104-110.
16. Puchala M., Szweda-Lewandowska Z., Kiefer J. The influence of radiation quality on radiation-induced hemolysis and hemoglobin oxidation of human erythrocytes. *J. Radiat. Res.*, 2004, vol. 45, pp. 275-279.
17. Raza S., Iqbal Y., Ullah I., Mubarak M.S., Hameed M.U., Raza M. Effects of gamma irradiation on the physico-chemical and biological properties of levofloxacin. *Pak J Pharm Sci.*, 2018, vol. 31, no. 1, pp. 181-186.
18. Stark G. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, vol. 1071, pp. 103-122, DOI: 10.1016/0304-4157(91)90020-W.
19. Sreedhar M., Anurag Chaturvedi, Aparna M., Pavan Kumar D., Singhal R.K. Influence of γ -radiation stress on scavenging enzyme activity and cell ultrastructure in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Advances in Applied Science Research*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 35-44.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE PLASMA MEMBRANES OF YEAST CELLS UNDER THE ACTION OF γ - RADIATION**Kocharli N.K., Hummatova S.T.***Baku State University,**Z. Khalilov 23, str., Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru*

Abstract. The aim of this work is to study the influence of γ - rays on yeast cells by recording changes in the parameters of fluorescence of pyrene in membranes. By using the method of fluorescent zonde was carried out the estimation of microviscosities of membranes in yeast cells under the influence of γ -irradiation at dose 5-150 Gy. According to the spectra of pyrene fluorescence has been determined the microviscosity of lipid bilayer and zones of protein-lipid contacts. It was shown that different doses differently change such physical parameters of the membrane as microviscosity and polarity of the lipid bilayer. Based on data, it was shown that, after the irradiation of yeast cells, the change of viscosity is a reflection of adaptive structural-functional rearrangements. The totality of the obtained data suggests that, adaptation processes at high radiation dose (75-100 Gy.) in yeast cells, obviously, end at an earlier time.

Key words: *microviscosity, yeast cells, γ -radiation, pyrene, polarity.*