ВЛИЯНИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЛЮЦИГЕНИНЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ И ДЫХАНИЕ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.
Бакинский государственный университет
ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru
Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В экспериментах на дрожжевых клетках изучено действие различных доз (5–100 Гр) **γ** -лучей. Исследована чувствительность дыхания и скорость образования супероксидного радикала в клетках дрожжей, подвергавшихся облучению. Изучение параметров ЛюцХЛ облученных клеток дрожжей позволило обнаружить усиление реакции образования АФК, по сравнению с контрольными клетками что свидетельствует о усилении скорости образования супероксидного анион радикала $\bullet O_2^-$ и таким образом высокой активности NADPH-оксидазы. Полярографические кривые поглощения кислорода клетками C. guilliermondii показывают, что в результате облучения клеток малыми дозами (5-50 Гр) наблюдается незначительное ингибирование дыхания клеток. Исследование действия высоких доз (75-100 Гр) показало, что они в значительной степени ингибируют дыхание клеток дрожжей. Эти данные совпадают с данными при изучении влияния этих доз на изменение физического состояния мембран и выживаемость клеток дрожжей. Полученные данные позволяют сделать вывод о наличии отличий реакции клеток дрожжей к действию малых и высоких доз гамма излучения.
Ключевые слова: *ионизирующая радиация,* **γ** -излучение*, дрожжевые клетки, АФК, супероксидный радикал.*

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени в мире существует много информации, касающейся общих закономерностей проявления адаптивной реакции у микроорганизмов, перевиваемых клеточных культур, клеток крови, организмов животных и растений [1-5]. Ионизирующее излучение воздействует на живой орга низм таким образом, что приводит к повреждению его функциональных систем и гибели. В настоящее время считается, что ионизирующее излучение оказывает наибольшее воздействие на мембранные структуры и ядро [6]. Известно, что адаптивный ответ, развивающийся, после облучения клеток в дозе 1 сГр, существенно проявление адаптивной реакции у микроорганизмов, ослабляется в присутствии ингибиторов синтеза белка [5]. Скорее всего, белки, синтез которых индуцируется в клетке при адаптирующем облучении, относятся к семейству стрессорных и участвуют в ликвидации повреждений ДНК, возникающих при действии на клетку экстремальных факторов самой различной природы: тепла, окислительного стресса, тяжелых металлов, гормонов и т.д. Известно, что различные токсические факторы могут индуцировать в клетках синтез одних и тех же белков [7]. Не исключено, что в запуске механизма экспрессии генов адаптивного ответа определенную роль. Ионизирующее излучение вызывает повреждение и гибель клеток вследствие как прямого воздействия на структуру ДНК и белков, так и вследствие генерации АФК [1].

К активным формам кислорода (АФК) относят супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород и перекись водорода. Образуясь в небольших количествах, АФК оказывают защитное действие, так как способствуют разрушению старых, отживших, раковых клеток и патогенных микроорганизмов. Гиперпродукция АФК стимулирует свободнорадикальное ПОЛ, что сопровождается деструкцией клеточных мембран, повреждением макромолекул – белков, липидов, ДНК.

Супероксидный радикал ($\bullet O_2^-$) является наиболее изученным из всех радикалов, производных кислорода. Это, вероятно, связано с тем, что он является первым промежуточным соединением в цепи последовательных одноэлектронных реакций восстановления молекулярного кислорода, O_2: $O_2 + e^- \rightarrow (\bullet O_2^-)$ (1) где: e- – электрон.

Обнаружение J.M.Mc.Cord и I.Fridovich особого фермента – супероксиддисмутазы, который катализирует реакцию специфической нейтрализации ($\bullet O_2^-$) привело к предположению, что $\bullet O_2^-$ важнейший агент, ответственный за токсические эффекты кислорода, и что СОД является одним из компонентов антиоксидантной системы. Супероксидный радикал уникален также тем, что он ведет к образованию многих реакционно-активных веществ, таких как гидроксильный радикал (•OH) и гидропероксильный радикал ($HO_2\bullet$). Например, протонирование $\bullet O_2^-$ то есть присоединение атома водорода, ведет к образованию $HO_2\bullet$, который является более мощным оксидантом, чем сам супероксидный радикал. Взаимодействие супероксидного радикала с перекисью водорода может вести к образованию «синглетного кислорода». Удивительным свойством $\bullet O_2^-$ является его способность в зависимости от кислотности водной среды превращаться в то или иное соединение. Так, в водной среде при кислотно-щелочном равновесии супероксидный радикал превращается в гидропероксильный радикал. В кислой среде из супероксидного радикала генерируется перекись водорода [8].

На клеточном уровне дыхание – это сложная последовательность окислительно-восстановительных реакций, в результате которой клетка запасает энергию в виде молекул АТФ (их еще называют универсальной

энергетической валютой клеток). Этот процесс обеспечивается дыхательной цепью переноса электронов-системой из нескольких белковых комплексов, которые располагаются в клеточной мембране.

В последние несколько лет разными группами ученых уже были изучены структуры комплекса I из бактерии *Thermus thermofilus*, дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* и быка. Исследования бычьего варианта комплекса I важно, поскольку он близок к гомологичному ферменту человека. Но в 2014 году ученым не удалось полностью расшифровать структуру – были получены данные только для 28 субъединиц из 45.

Сейчас ученые получили полную структуру комплекса I-удалось расшифровать все 45 субъединиц, входящих в его состав. Теперь понятно, что 14 субъединиц образуют консервативное ядро, сохраняющееся в структурах гомологичного фермента бактерий и грибов, а 31 субъединица специфична для млекопитающих. Комплекс имеет характерную L-образную форму-вертикально расположенная часть комплекса содержит сайты связывания NADH и убихинона и выдается в матрикс митохондрии. Горизонтальная часть заякорена во внутренней мембране митохондрии и является протонной помпой - именно она переносит протоны из матрикса в межмембранное пространство. Сайт связывания NADH расположен в дистальном отделе матриксной части комплекса. Ближе к мембранной части локализуется сайт связывания убихинона. Как заключают авторы статьи, именно этот подход (изучение конформационных изменений посредством криоэлектронной микроскопии) является наиболее перспективным для дальнейшего изучения комплекса I дыхательной цепи и проверки существующих гипотез о роли промежуточных продуктов восстановления убихинона в механизме функционирования фермента [9]. В литературе мало данных о влиянии ионизирующего излучение на дыхание клеток дрожжей.

Существуют различные способы оценки образования АФК. Одним из наиболее чувствительных является хемилюминесцентный метод, особенно после открытия активаторов хемилюминесценции (ХЛ), из которых наиболее широко используются люминол и люцигенин. Известно, что существует химическая специфичность активаторов: люминол вступает в реакцию с АФК образуемыми различными ферментами, а люцигенин – только с супероксидным анион-радикалом. Метод ХЛ обладает тем преимуществом что, во-первых, методом ХЛ непосредственно определяется не концентрация, аскорость реакции, в которой они образуются [10].

Таким образом, целью данного исследования явилась оценка люцигенинзависимой хемилюминесценции (Люц ХЛ) и интенсивность дыхания клеток дрожжей *Candida guilliermondii* после воздействия различными дозами гамма лучей (5–100 Гр).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916.

Облучение клеток дрожжей осуществляли гамма квантами на установке ^{60}Co. Доза облучения составляла 5–100 Гр. Контролем служила суспензия необлученных клеток.

Суспензию клеток дрожжей подвергали воздействию гамма лучей затем проводили оценку образования супероксидкого радикала и скорость дыхания клеток дрожжей.

Дрожжевые клетки-удобный и хорошо изученный объект для исследования влияния ионизирующего излучения. Помимо производных люминола, в качестве усилителя ХЛ широкое распространение получил люцигенин с принципиально иными структурой и механизмом действия. Этот ХЛ-зонд также используется для обнаружения супероксидного радикала [11]. Описан [12] механизм действия люцигенина.

Для определения ЛюцХЛ суспензию клеток помещали в кювету хемилюминометра, добавляли необходимое количество буфера, люцигенин и регистрировали ХЛ. Время записи кинетики варьировало от 12 до 15 минут в разных опытах. Люцигенин добавляли в конечной концентрации 0,1 мМ.

В настоящей работе методом полярографии изучено влияние различных доз гамма лучей на дыхание клеток дрожжей [13].

Точность методов анализа колебалась в пределах 0,2–0,08. Повторность опытов изменялась от 3 до 5 результаты экспериментов подвергались статической обработке. Были рассчитаны средние величины и стандартные отклонения от средних величин.

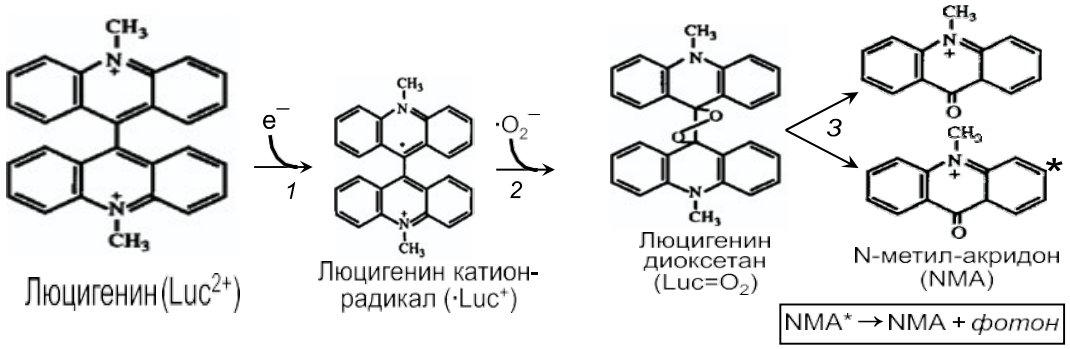

Рисунок. 1. Выделение кванта света при взаимодействии люцигенина с АФК (схема реакции, по [10])

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах на дрожжевых клетках изучены параметры ЛюцХЛ.

Увеличение интенсивности ХЛ достигала максимума примерно через 3 минуты, а затем медленно снижалась. Добавление люцигенина в суспензию клеток приводило к увеличению интенсивности ХЛ. С ростом дозы облучения интенсивность ХЛ увеличивалась по сравнению с контролем (рис. 2). Изучение параметров ЛюцХЛ облученных клеток дрожжей позволило обнаружить усиление реакции образования АФК, по сравнению с контрольными клетками. Что свидетельствует о усилении скорости образования супероксидного анион радикала $\bullet O_2^-$ и таким образом высокой активности NADPH-оксидазы. Известно,что формирование супероксидных радикалов связано с мембранной NADPH-оксидазой.

NADPH-оксидаза представляет собой мембрано-ассоциированный мультимолекулярный комплекс, обладающий ферментативной активностью и являющийся структурным элементом дыхательной цепи митохондрий. В неактивном состоянии данный комплекс состоит из флавопротеина и цитохрома. Структурными компонентами NADPH-оксидазы являются 4 белковые субъединицы, формирующие функционально-активный фермент в клеточной мембране. Две субъединицы относятся к трансмембранным белкам и образуют гетеродимерный комплекс – цитохром b558, а две другие субъединицы – цитоплазматические и соединяются с цитохромом.

Таким образом, формируется активная молекула NADPH-оксидазы, необходимая для генерации супероксидного анионрадикала. Функция NADPH-оксидазы заключается в катализе восстановления молекулярного кислорода до супероксид-радикала, трансформируемого затем в перекись водорода и иные токсичные формы кислорода (гидроксидный и гидропероксидный радикалы).

Нами было обнаружено, что в клетках дрожжей НАДФН -ферментный комплекс является одной из важных мишеней при действии **γ-** лучей.

Инактивирующее действие γ-лучей может быть связано ингибированием дыхания клеток дрожжей. В настоящей работе методом полярографии изучено влияние различных доз гамма лучей на интенсивность дыхания клеток дрожжей [13]. Контролем служила необлученная суспензия клеток.

Установлено что интенсивность дыхания клеток дрожжей зависит от дозы **γ**-лучей. Полярографические кривые поглощения кислорода клетками *C.guilliermondii* показывают, что в результате облучения клеток малыми дозами (5–50 Гр) наблюдается незначительное ингибирование дыхания (рис. 3). Исследование действия высоких доз (75–100 Гр) показало, что они в значительной степени ингибируют дыхание клеток дрожжей *C. guilliermondii* и эти данные совпадают с данными при изучении влияния этих доз на выживаемость клеток дрожжей. Полученные данные позволяют сделать вывод о наличии отличий реакции клеток к действию малых и высоких доз **γ** -излучения.

На основании ранее нами полученных результатов можно предположить, что установленное с помощью метода флуоресцентных зондов изменение физического состояния мембран клеток дрожжей после однократного общего γ-облучения в указанных дозах в значительной степени обусловлено радиационной модификацией их липидного компонента [3]. Это, в свою очередь может, быть связано с изменением антиоксидантных систем, которое наблюдается при облучении организмов. Изменения микровязкости мембраны тесно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в клетке [14]. В настоящее время известно, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) после действия ионизирующих излучений также сопровождается активацией ключевых ферментов липидного метаболизма, что, в свою очередь, может приводить к накоплению в мембране продуктов ПОЛ.

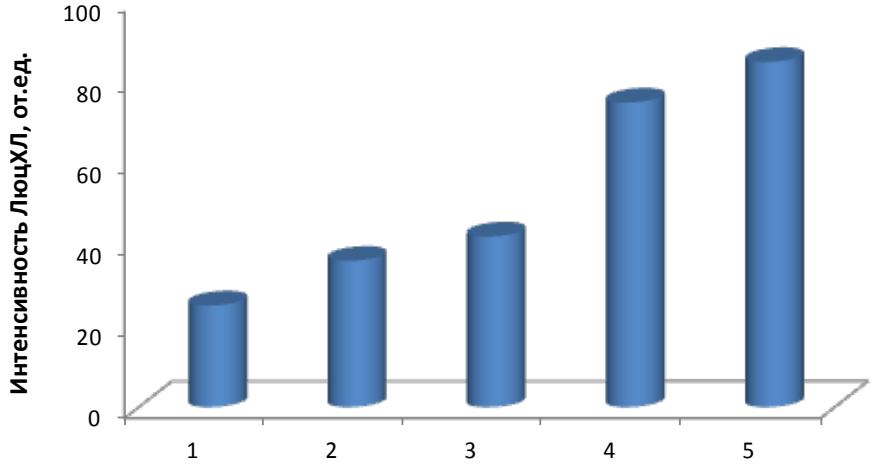

Рисунок 2. Интенсивность ХЛ люцигенина в клетках дрожжей. 1 – Контроль; 2 – 25 Гр; 3 – 50 Гр; 4 – 75 Гр; 5 – 100 Гр

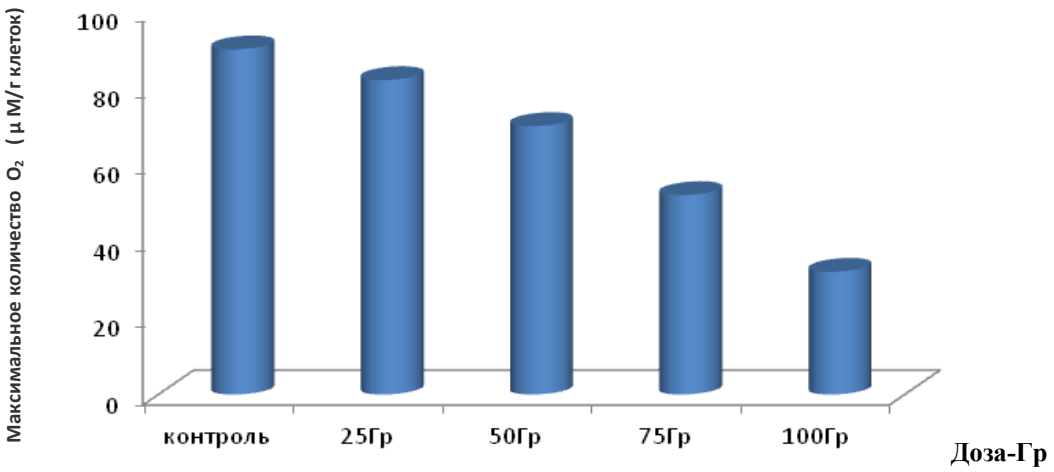

Рисунок 3. Зависимость интенсивности дыхания клеток дрожжей от дозы γ -лучей

Известно, что характер ответа клеток на стресс (активация процессов жизнедеятельности или их ингибирование и повреждение клеток) отражает степень нарушения гомеостаза живой системы под действием этого фактора. Однако если действие стрессового фактора находится в допустимых пределах по его интенсивности, то клетка или организм способны адаптироваться и выжить. Из полученных данных можно заключить, что для клеток дрожжей C.guilliermondii доза γ-лучей от 5 Гр до 50 Гр является малой, которую способны нейтрализовать антиокислительные системы клетки.

Список литературы / References:

1. Зюзиков Н.А., Корогодин В.И., Корогодина В.Л. Особенности действия малых доз γ -излучения на дрожжевые клетки. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 1999, т. 39, № 6, с. 619-622. [Zyuzikov N.A., Korogodin V.I., Korogodina V.L. Features of the action of small doses of γ-radiation on yeast cells. *Radiation Biology. Radioecology*, 1999, vol. 39, no. 6, pp. 619-622. (In Russ.)]

2. Комарова Л.Н. Проявление адаптивной реакции у дрожжевых клеток после действия ионизирующей радиации. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности*, 2015, № 2 (14). [Komarova L.N. Manifestation of an adaptive response in yeast cells after exposure to ionizing radiation. *Medical and biological problems of life*, 2015, no. 2 (14). (In Russ.)]

3. Кочарли, Н.К, Гумматова С.Т. Структурно-функциональное состояние плазматических мембран клеток дрожжей при действии γ – излучения. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 2, с. 223-229. [Kocharli N.K., Gummatova S.T. Structural and functional state of plasma membranes of yeast cells under the action of γ-radiation. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 223-229. (In Russ.)]

4. Dutta K., Verma N. Exposure to low dose of gamma radiation enhances the excision repair in Saccharomyces cerevisiae. *J. Gen. Appl. Microbiol*., 1998, vol. 44, pp. 243-249.

5. Wolff S. et al. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiation become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce doublestrand breaks in DNA. *Int. J. Radiat. Biol*., 1988, vol. 53.

6. Ritter G.S., Nikolin V.P. et al Characteristic of the active substance of the Saccharomyces cerevisiae preparation having radioprotective properties. *Int. J. Radiat. Biol*., 2020, vol. 96, no. 9, pp. 1173-1191. doi: 10.1080/09553002.2020.1793020.

7. Akaboshi E., Howard-Flanders P. Proteins induced by DNA-damaging agents in cultured Drosophila cells. *Mutat. Res*., 1989, vol. 227, pp. 1-6.

8. Iriskulov B.U. Modern condition of the problem of lipid peroxide oxidation. *Central Asian Journal of Medicine*, vol. 2019, iss. 1, article 7.

9. Jiapeng Z., Kutti R. Vinothkumar, Judy Hirst. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 2016, vol. 536, pp. 80-84.

10. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и Клеточная Хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, 2009, т. 49, с. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free Radicals and Cellular Chemiluminescence. *Advances in Biological Chemistry*, 2009, vol. 49, pp. 341-388 (In Russ.)]

11. Образцов И.В., Годков М.А. *Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика*. Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии. М., 2013, с. 6-7. [Obraztsov I.V., Godkov M.A. *Chemiluminescent analysis of blood cells in medicine: history, theory, practice*. Federal Scientific Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Moscow, 2013, pp. 6-7. (In Russ.)]

12. Beloborodova N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production ofreactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J. Biomed. Sci*., 2012, vol. 19, no. 89.

13. Новиков В.Э. Исследование кинетики дыхания дрожжевых клеток полярографическим методом. *Практикум биофизика клетки*, 2001, с. 5-7. [Novikov V.E. Investigation of the kinetics of respiration of yeast cells by the polarographic method. *Practical biophysics of cells*, 2001, pp. 5-7. (In Russ.)]

14. Владимиров Ю.А. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*, 1980, 350 с. [Vladimirov Yu.A. *Fluorescent probes in the study of biological membranes*, 1980, 350 p. (In Russ.)]

THE INFLUENCE OF γ -RAYS ON LUCYGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE AND YEAST CELL RESPIRATION

Kocharli N., Hummatova S,
Baku State University
Z. Khalilov st., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Abstract. In experiments on yeast cells, the effect of various doses (5–100 Gy) of **γ-**rays was studied. Respiration sensitivity and rate of superoxide radical formation were investigated in irradiated yeast cells. The study of the parameters of LucCL in irradiated yeast cells revealed an increase in the reaction of ROS formation compared to control cells , which indicates an increase in the rate of formation of the superoxide anion radical ($\bullet O_2^-$) and, thus, a high activity of NADPH-oxidase. Polarographic curves of oxygen absorption by C. guilliermondii cells show that as a result of irradiation of cells by low doses (5–50 Gy), was watched a slight inhibition of cell respiration. The study of the effect of high doses (75–100 Gy) showed that they significantly inhibit the respiration of yeast cells. These data coincide with the data when studying the effect of these doses on changes in the physical state of membranes and the survival of yeast cells. The obtained data allow us to conclude that there are differences in the response of yeast cells to the action of low and high doses of gamma radiation.

Key words: *ionizing radiation, γ-rays, yeast cells, ROS, superoxide radical.*