

МСЕК-ЗАМЕДЛЕННАЯ ЭМИССИЯ СВЕТА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ В КЛЕТКАХ 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: 11.06.2018

Аннотация. Показано, что введение акридинового оранжевого (АО, АНС) в живые клетки дрожжей способствует возникновению в них возбуждаемой светом мсек-замедленной эмиссии света (мсек-ЗЭС). Кинетика замедленной эмиссии света АО, АНС дрожжей носит индукционный характер, описывается S-образной кривой, и ее интенсивность зависит от концентрации красителя. В нашей исследовательской работе была изучена интенсивность мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей после действия γ -лучей, различными дозами (5 Гр, 20 Гр, 50 Гр, 100 Гр). Обнаружено, что кинетические показатели интенсивности мсек-ЗЭС АО, АНС изменяются в зависимости от дозы γ -лучей. Изучение влияния γ -лучей на мсек-ЗЭС АО в клетках показало, что интенсивность мсек-ЗЭС АО и АНС в клетках предварительно облученных уменьшается по сравнению с необлученными клетками и изменяется форма индукционной кривой.

Установлено, что после действия γ -лучей на клетки дрожжей в малых дозах, практически не вызывающих повреждений, увеличивает мсек-ЗЭС АО. При возрастании дозы излучения интенсивность мсек-ЗЭС АНС снижается. Сделан вывод о том, что мсек-ЗЭС АО и АНС может быть использована для изучения влияния биогенных и абиогенных факторов среды на биологические системы, а также для биомониторинга загрязнения окружающей среды с целью ранней диагностики.

Ключевые слова: клетки дрожжей, АО, АНС, мсек-ЗЭС, γ -облучение.

ВВЕДЕНИЕ

Современным биофизическим методом исследования, позволяющим изучать структурное состояние биомембран, транспорт ионов, трансмембранный потенциал, взаимодействие веществ различной природы с мембранами и другие процессы, признан метод флуоресцентных зондов [1-5].

Отрицательное влияние на живые организмы, различных опасных факторов увеличивается. Эти отрицательные воздействия оказывают повреждающие действие на различные структурно-метаболические комплексы. Нарушения в функционировании приводят к существенным метаболическим сдвигам и в итоге, к гибели клеток. К настоящему времени в мире существует много информации, касающейся общих закономерностей проявления адаптивной реакции у микроорганизмов, клеток крови, организмов животных и растений [6-10].

На дрожжевых клетках изучено летальное действие малых доз и проявление адаптивной реакции после хронического облучения при малых мощностях доз. Исследована чувствительность клеток, подвергавшихся хроническому воздействию в широком диапазоне мощностей доз (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 0.5, 1, 3, 8, 10 и 40 Гр/ч), к последующему воздействию острого облучения [9,11,12]. Целью данной работы является изучение мсек-ЗЭС флуоресцентных зондов АО и АНС в клетках дрожжей и влияния различных доз γ -излучения на интенсивность мсек-ЗЭС.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Культуру дрожжей выращивали на сусло-агаре 4⁰ Балл. Опыты проводили со свежеприготовленной суспензией 3-х суточной культуры. В работе была использована фотометрическая установка, позволяющая регистрировать мсек-ЗЭС [13]. В установке был применен фосфороскоп. Облучение клеток дрожжей осуществляли γ -квантами на установке ^{60}Co .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучена миллисекундная замедленная эмиссия света в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* У-916 в зависимости от концентрации акридинового оранжевого (АО).

Установлено, что в течение 1-2 минут после включения возбуждающего света мсек-ЗЭС клеток с АО практически не регистрируется, затем наблюдается очень быстрое нарастание интенсивности мсек-ЗЭС, которая так же быстро достигает максимального значения и стабилизируется на высоком уровне. В дальнейшем интенсивность процесса не изменяется и продолжает протекать в стационарном режиме. При проведении кинетических измерений большое значение имеет концентрация красителя. Индукционная кривая мсек-ЗЭС имеет S-образную форму, но наблюдается отсутствие пика (рис. 1). При малой концентрации ($< 10^{-5}$ М) регистрируемое свечение имеет низкую интенсивность. мсек-ЗЭС АО обнаруживается даже при очень низкой концентрации (10^{-9} - 10^{-8} М) акридинового оранжевого.

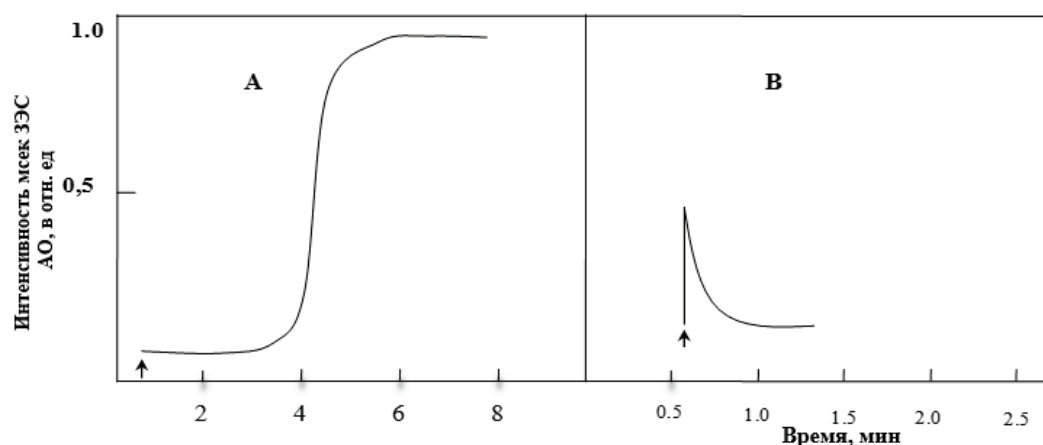


Рисунок 1. Кривая индукции мсек-3ЭСАО клеток *Candida guilliermondii*. А-индукционная кривая; В-кривая затухания

В условиях, постоянной плотности клеток (10^8 кл/мл) при увеличении концентрации АО, стационарное положение кинетических показателей мсек-3ЭС также увеличиваются и при 10^{-5} М, достигает максимального значения. Необходимо отметить, что при более высокой концентрации АО (10^{-4} М) интенсивность мсек-3ЭС снижается (рис. 2).

Известно, что мономерная форма акридинового оранжевого существующая в сильно разбавленных растворах, характеризуется следующими оптическими свойствами поглощения 494 нм, максимум люминесценции 530 нм, время жизни возбужденного состояния $\tau = 2 \cdot 10^{-9}$ с. В концентрированных растворах акридиновый оранжевый существует в димерной форме с иными оптическими характеристиками максимум поглощения 465 нм, максимум люминесценции 640 нм, время жизни возбужденного состояния $\tau = 20 \cdot 10^{-9}$ с. С увеличением исходной концентрации красителя максимум спектра возбуждения димеров ($\tau = 490$ нм) растет. При этом изменяется соотношение между максимумами возбуждения флуоресценции мономеров ($\tau = 530$ нм) и димеров. Зависимость мсек-3ЭС клеток дрожжей *Candida guilliermondii* Y-916 от концентрации акридинового оранжевого показывает, что концентрация АО является одним из факторов, определяющих мсек-3ЭС клеток дрожжей.

В нашей исследовательской работе была изучена интенсивность мсек-3ЭС АО в клетках дрожжей после действия γ -лучей, различными дозами. Установлено, что интенсивность мсек-3ЭС АО в облученных клетках дрожжей, характеризуется S-образной кривой. Установлено что кинетические показатели интенсивности мсек-3ЭС АО изменяются в зависимости от дозы γ -лучей. Изучение влияния γ -лучей на мсек-3ЭС АО в клетках показало, что интенсивность мсек-3ЭС АО в клетках предварительно облученных уменьшается по сравнению с необлученными клетками и изменяется форма индукционной кривой при действии дозой 5 Гр. При дозе 5 Гр стационарный уровень индукционных кривых резко возрастает и имеет пик (Р). Так, интенсивность мсек-3ЭС АО у клеток, облученных γ -лучами в дозе 5 Гр выше, чем у необлученных клеток. Ранее проведенных экспериментах мы наблюдали изменение формы и пик на вершине индукционной кривой при предварительном УФ- облучении (254 нм) клеток дрожжей [13, 14]. Как было нами показано, индукционные кривые мсек-3ЭС АО в клетках дрожжей при всех дозах УФ- излучения ($1,2 \cdot 10^2$ - $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²) имеют пик.

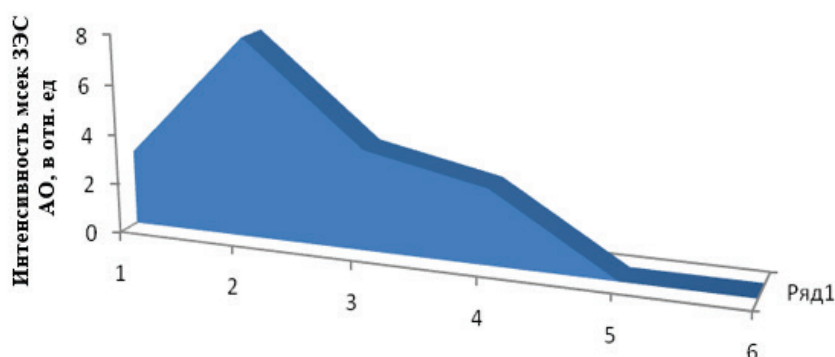


Рисунок 2. Зависимость замедленной эмиссии света от концентрации акридинового оранжевого: $1 \cdot 10^{-4}$ М; $2 \cdot 10^{-5}$ М; $3 \cdot 10^{-6}$ М; $4 \cdot 10^{-7}$ М; $5 \cdot 10^{-8}$ М; 10^{-9} М

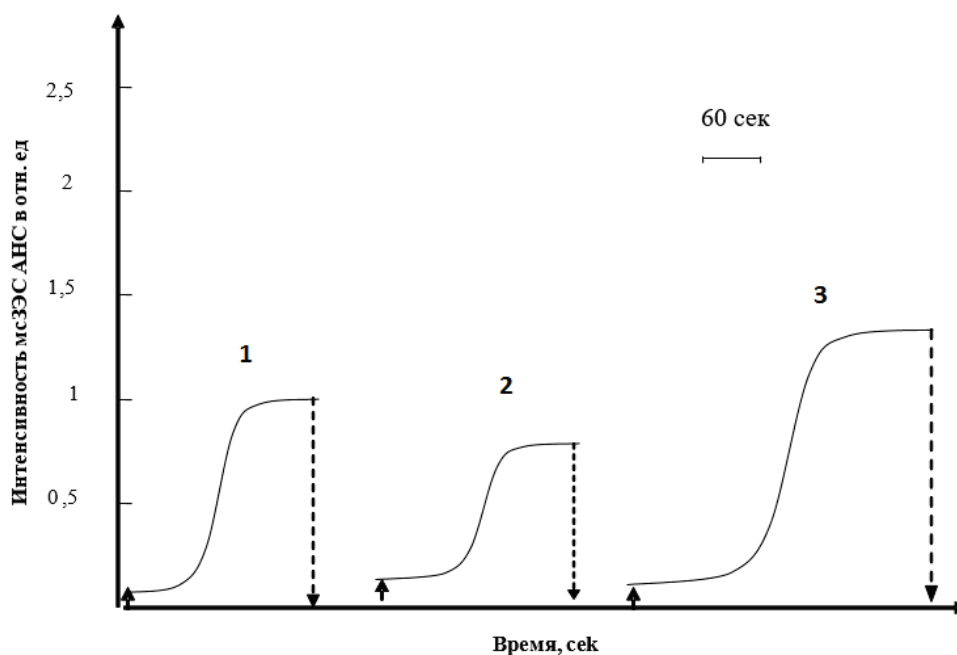


Рисунок 3. Влияние γ -лучей на мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* Y-916, обработанных α -токоферолом:

1. Контроль; 2. γ -излучение 20 Гр; 3. γ -излучение 20 Гр+ α -токофероль

Известно, что при действии γ лучей, происходит процесс пероксидации ненасыщенных жирных кислот липидов клеточной мембраны. В результате образуются органические радикалы R^+ и $RO\cdot$. Образованные R^+ и $RO\cdot$ радикалы вместе с АО, обладая высокой энергией и способностью вступать в реакцию, образуют комплекс с АО. Можно предположить, что после действия γ -лучей на клетки дрожжей реакция адаптивного ответа, представляющего воздействие на клетки повреждающего агента в малых дозах, практически не вызывающих повреждений увеличивает мсек-ЗЭС АО. Для исследования влияния γ -лучей на клетки был использован и другой флуоресцентный зонд (АНС). В представленной работе в клетках дрожжей, подвергнутых воздействию γ -излучения, исследовано влияние возбуждающего света на мсек-ЗЭС АНС. Во всех опытах использовался водный раствор АНС при концентрации 10^{-6} М. При этой концентрации индукция мсек-ЗЭС АНС принимала максимальные значения. Как видно из рисунка 3, индукционная кривая мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей подвергнутых действию γ -лучей также образует S-образную форму. На рисунке 3 показаны изменения интенсивности мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей от дозы γ -излучения.

При возрастании дозы излучения интенсивность мсек-ЗЭС АНС снижается. Известно, что отрицательно заряженная молекула АНС локализуется в полярной части клеточной мембраны [1, 2].

Можно считать, что уменьшение мсек-ЗЭС АНС в опытах с клетками, подвергнутыми облучению, связано с изменениями, возникшими в полярной части клеточной мембраны. При пероксидации липидов, происходящей под действием γ -лучей полярность мембраны и число радикалов увеличивается, в связи с тем, что молекула АНС заряжена отрицательно, вероятность ее соединения с мембраной уменьшается. При действии γ -лучей на кривой индукции мсек-ЗЭС АНС не образуется вершин (в отличие от мсек-ЗЭС АО), так как не образуется комплекс ($R^+ + АНС$).

Сделан вывод о том, что мсек-ЗЭС АО и АНС может быть использована для изучения влияния биогенных и абиогенных факторов среды на биологические системы, а также для биомониторинга загрязнения окружающей среды с целью ранней диагностики.

Список литературы / References:

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. М.: Наука, 1980, 320 с. [Vladimirov Y. A., Dobresov Q. E. *Fluorescent probes in the investigations of biological membranes*. Moscow: Science, 1980, 320 p. (In Russ.)]
2. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов*. М.: Наука, 1989, 276 с. [Dobresov Q. E. *The fluorescent probes in the cell investigations, membranes and lipoproteins*. Moscow: Science, 1989, 276 p. (In Russ.)]
3. Chatterjee S., Kumar G.S. Binding of fluorescent acridine dyes acridine orange and 9-aminoacridine to hemoglobin: Elucidation of their molecular recognition by spectroscopy, calorimetry and molecular modeling techniques. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, pp. 169-78, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.045.
4. Drummen, G.P.C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques – Illuminating Biological and Biomedical Research. *Molecules*, 2012, vol. 17, pp. 14067-14090, DOI: 10.3390/molecules171214067.

5. Rao J., Dragulescu-Andrasi A., Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, vol. 18, pp. 17-25, DOI: 10.1016/j.copbio.2007.01.003.
6. Зюзиков Н.А., Корогодина 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., Korogodina 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.)]
7. Спитковский Д.М. Биологическое действие малых доз ионизирующей радиации. *Радиобиология*, 1992, т. 32, № 3, с. 382-400. [Spitkovsky D.M. Biological effect of small doses of ionizing radiation. *Radiobiology*, 1992, vol. 32, no. 3, pp. 382-400. (In Russ.)]
8. Филиппович И.В. Феномен адаптивного ответа клеток в радиобиологии. *Радиобиология*, 1991, т. 31, № 3, с. 803-814. [Filippovich I.V. The phenomenon of adaptive response of cells in radiobiology. *Radiobiology*, 1991, vol. 31, no. 3, pp. 803-814. (In Russ.)]
9. 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.
10. O'Haver T.C Development of luminescence spectrometry as an analytical tool. *Journal of Chemical Education*, 1978, vol. 55, no. 7, pp. 423-428, DOI: 10.1021/ed055p423.
11. Komarova L.N., Lyapunova E.R., Amosova N.V., Sorokina I.V. Adaptive response of yeast cells after ionizing radiation exposure. *J. Medical and Biological Problems*, 2015. vol. 2, no. 14, p. 59-65
12. Libkind D. [et al.] Radio-adaptive response in human lymphocytes. *Radiobiology*, 2002, vol. 2, pp. 38-43.
13. Тарусов Б.Н., Веселовский В.А. *Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение*. М.: Изд-во МГУ, 1978, 150 с. [Tarusov B.N., Veselovsky V.A. *Super weak irradiation of plants and their applied value*. Moscow: pub. MSU, 1978, 150 p. (In Russ.)]
14. Гумматова С.Т., Кочарли Н.К. *Флуоресцентные зонды в исследовании влияния модификаторов на клетки*. Монография, Lap Lambert Academic Publishing, 2014, 148 с.
15. Kocharli N.K., Hummatova S.T. The influence of γ -irradiation on the msec-delayed light emission fluorescent probe in yeast cells. *Journal of Interciencia*, 2017, vol. 42 no. 10, pp. 32-42.

MSEC- DELAYED LIGHT EMISSION OF FLUORESCENT PROBES IN YEAST CELLS

Kocharli N.K., Hummatova S.T.

Biophysics and Molecular Biology department, Baku State University
Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ 1148, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Abstract. It was shown that acridine orange (AO, ANS) introduction into the living yeast cells promotes the appearance of excitable msec-delayed light emission (DLE) in them. The kinetics of delayed light emission AO, ANS in yeast cells has inductive character, is described by S-shaped curve, and its intensity depends on the dye concentration.

At work was used photometric installation allowing to register msec-DLE. At our investigation work has been studied msec-DLE AO intensity in yeast cells after γ -irradiation of various doses (5 gr, 20 gr, 50 gr, 100 gr). It was determined that, the kinetic intensity indications of msec-DLE AO change depending on γ -irradiation doses. The investigation of γ -irradiation on msec-DLE AO in cells showed that, msec-DLE AO intensity in cells previously illuminated decreases compared with non-irradiated ones and changes the form of induction curve under the influence 5 gr. dose.

It was identified that, after γ -irradiation influence on yeast cells at low doses, practically not causing any damage, msec-DLE AO increase. By increasing irradiation doses msec-DLE ANS intensity decreases. It was supposed that, msec-DLE AO and ANS can be used to investigate the influence of biogenic and not biogenic factors of medium in biological systems, and also for biomonitoring of pollution in environmental medium with the aim of early diagnostics.

Key words: yeast cells, AO, ANS, msec-DLE, γ -irradiation.