

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО - В ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

ул. Захида Халилова, 23, г. Баку, AZ 1148, Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2019

Аннотация. Установлено, что ультрафиолетовое – В (УФ-В) излучение (280-320 нм) индуцирует структурное изменение липидного бислоя и аннулярных липидов плазматических мембран клеток дрожжей. Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Для оценки структурного состояния мембран определяли микровязкость липидной фазы. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофотометр (*Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007*) при максимуме волны возбуждающего света 334 и 275 нм для оценки микровязкости и полярности липидного бислоя и аннулярных липидов клеток дрожжей. Пик флуоресценции эксимера пирена F₃ регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера F_m при длине волны эмиссии 393 нм. 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.

Ключевые слова: клетки дрожжей, микровязкость, пирен, ультрафиолетовое - В излучение, липид.

Показано, что с ростом дозы УФ-В излучения увеличивается микровязкость и полярность липидного бислоя и аннулярных липидов. Согласно полученным результатам, предполагается, что увеличение микровязкости и полярности липидов клеточной мембраны связано с перекисным окислением липидов (ПОЛ). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента мембран, являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек. Известно, что при стимуляции ПОЛ в мембранах уменьшается содержание липидов, также меняется микровязкость и электростатический заряд.

ВВЕДЕНИЕ

Мониторинговые исследования состояния озонового слоя (как части атмосферы), проводимые в разных частях Земли, констатируют о прогрессирующем разрушении озонового слоя, связанном с антропогенным воздействием на окружающую среду. Вследствие этого увеличивается интенсивность проникновения в приземные слои атмосферы наиболее опасного вида УФ излучения - средневолнового (УФ-В 280-320 нм), что ведет к целому ряду негативных последствий для человека: преждевременному старению, учащению случаев рака кожи (меланомы), катаракты, ослаблению иммунитета. Возникновение при воздействии УФ-излучения молекулярных повреждений ДНК, не устраняемых (или устраняемых не полностью) репаративными системами клетки, а также фото-деструкция белков и биомембран обуславливают развитие довольно многочисленных биологических эффектов [1-4].

Как известно, действие ионизирующих излучений и УФ-света на клетки вызывает повреждения не только генетических структур, но и клеточных мембран [5, 6].

С возрастанием интенсивности ультрафиолетового излучения и его влияния на процессы, происходящие в биосфере, возникает необходимость оценки цитофизиологических изменений в растениях, которые индуцируются этим фактором. Воздействие ультрафиолетовой радиации на растения в диапазоне 280-320 нм охватывает все уровни биоорганизации [7-9] а также сигнальную, регуляторную и энергетическую функции [7] УФ-Б модифицирует воздействие других экологических факторов, действуя часто аддитивно [10].

В полном спектре солнечного света, достигающего земной поверхности, доля УФВ-излучения, которое фильтруется озоновым слоем стратосферы, составляет 1,5%. Однако УФВ-фотоны высокоэнергетичны, и поэтому УФВ-излучение оказывает наиболее сильное повреждающее действие на рост и развитие растений. Высокоинтенсивное УФВ-облучение растений вызывает различные молекулярные повреждения в клеточных структурах, сопровождаемые нарушением их функций [11]. Особое значение с точки зрения биологических последствий действия УФВ-излучения на клетки имеет повреждение ДНК, связанное с образованием в ней ряда фотопродуктов, главным образом пиримидиновых димеров [12]. Молекулярные механизмы ответов на повреждение ДНК изучены в основном у дрожжей и животных. Недавно начатому детальному изучению таких механизмов у растений, в том числе при действии УФВ-излучения, способствует секвенирование геномов у некоторых из них. На основании проведенного анализа у растений выявлены многие гомологи эволюционно консервативных компонентов системы ответов на повреждение ДНК [13].

Установлено, что ультрафиолетовое (УФ) излучение В-области (УФВ 290-320 нм) активирует в клетках растений различные сигнальные механизмы, запускающие процессы программированной смерти клеток либо их

защиты от повреждающего действия этого излучения. Отмечено, что механизмы клеточной смерти при высоких дозах УФВ-облучения связаны с повреждением ДНК и окислительным стрессом, причем в первом случае могут происходить активация чекпойнтов (checkpoints) повреждения ДНК и остановка клеточного цикла, во втором – выход из митохондрий цитохрома с и последующая активация метакаспаз. Обнаружено, что оба механизма индуцируют фрагментацию ДНК и другие типичные для апоптотических клеток изменения, а также что низкоинтенсивное УФ В излучение посредством фоторецептора UVR8 инициирует в клетках защитные процессы, способствующие акклиматизации растений на солнечном свете [11].

В биомембранах липидный компонент, организованный в функционально активную матрицу, интегрирует внешние влияния и участвует в запуске программ клеточного управления. Плазматическая мембрана обладает уникальными рецепторными, сигнальными функциями регуляции важнейших клеточных процессов, поражение которых может привести к гибели клетки. От состояния липидной составляющей мембраны зависит активность связанных с ней ферментов, чувствительность клетки к гормональной и нервной регуляции. Фосфолипиды поддерживают работу важнейших клеточных механизмов, таких как ионный обмен, внутренняя респирация, биологическое окисление, влияют на фиксацию энзимов в митохондриях и окислительное фосфорилирование [14].

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

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Источником УФ-В – излучения служила ртутная лампа ПРК-4, снабженная светофильтром УФС-2. Доза облучения составляла $0,7 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм². Контролем служила необлученная суспензия. Для оценки структурного состояния мембран определяли микровязкость липидной фазы. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофлуориметре (*Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007*) при максимуме волны возбуждающего света 334 нм для оценки микровязкости липидного бислоя. Пик флуоресценции эксимера пирена $F_{\text{э}}$ регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера $F_{\text{м}}$ при длине волны эмиссии 393 нм. Коэффициент эксимеризации пирена $F_{\text{э}}/F_{\text{м}}$ (334) отражающий микровязкость липидного бислоя, выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена $F_{\text{э}}$ (в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$ нм) к величине максимума флуоресценции мономеров пирена $F_{\text{м}}$ ($\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$ нм) при λ возбуждения 334 нм. Отношение интенсивности флуоресценции эксимеров к мономерам $F_{\text{э}}/F_{\text{м}}$ обратно пропорционально микровязкости липидного бислоя и прямо пропорционально его текучести.

Полярность липидной фазы мембран ($F_{372}/F_{393}(334)$) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм $F_{\text{м}}$ пирена при длине волны возбуждения 334 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм. Полярность зон белок-липидных контактов ($F_{372}/F_{393}(282)$) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм $F_{\text{м}}$ в тонком спектре пирена при длине волны возбуждения 282 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что УФ-В облучение клеток дрожжей в дозе $0,7 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм² судя по коэффициенту эксимеризации, приводила к увеличению микровязкости (уменьшению текучести) общего липидного бислоя мембран. Аналогичные процессы отмечались также в областях аннулярных (при белковых) липидов. После облучения высокими дозами ($3,0 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) УФ-В излучения наблюдается 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.

Для определения микровязкости зон белок-липидных контактов суспензию клеток содержащего раствор пирена флуориметрировали при длине волны возбуждающего света 272 нм F_{470}/F_{393} .

Полярность окружения зонда пирена в липидном слое мембран $F_{272}/F_{393}(334)$ увеличивается при облучении клеток дозой $0,7 \cdot 10^4$ – $2,2 \cdot 10^4$ эрг/мм². При оценке полярности общего мембранного липидного бислоя установлено, что при облучении в дозе $3,0 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм² наблюдалось незначительное увеличение полярности липидного компонента мембран клеток. В липидном слое мембраны и в зоне белок-липидных контактов полярность несколько возрастает, что согласуется с данными о накоплении в мембранах клеток первичных продуктов ПОЛ.

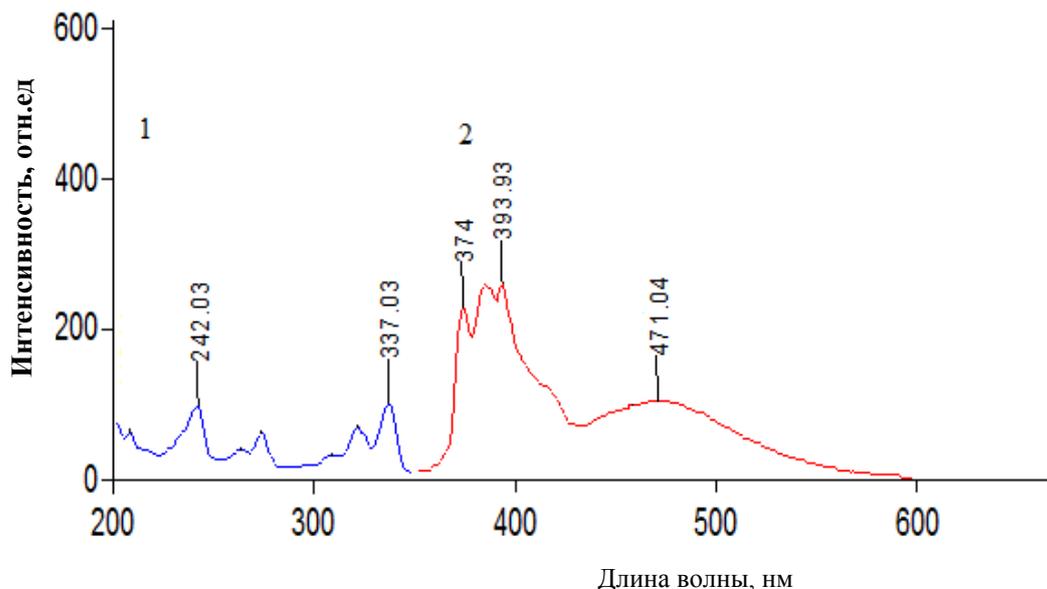


Рисунок 1. Спектры возбуждения и эмиссии пирена в клетках дрожжей

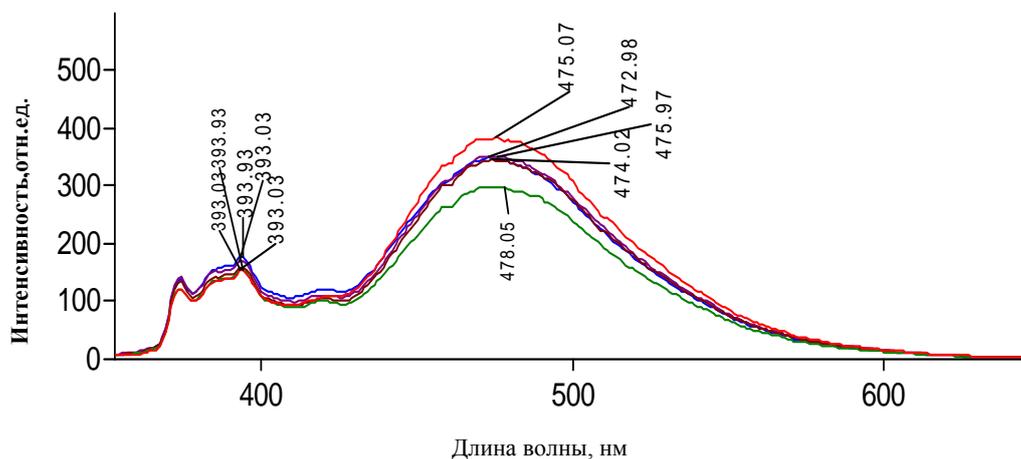


Рисунок 2. Изменение микровязкости (470/393 нм) и полярности (372 /393 нм) зон белок-липидных контактов плазматических мембран клеток дрожжей от дозы УФ-В излучения (возбуждение при 275 нм)
 ● Контроль, ● $0,3 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $0,7 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $1,5 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $2,2 \cdot 10^4$ эрг/мм²

Известно, что 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. Ранее нами было установлено, что с ростом дозы УФ-В излучения ($0,7 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) мембране клеток дрожжей происходит увеличение концентрации МДА, что свидетельствует о развитии процесса ПОЛ.

Из литературы известно, что в мембраны клеток *Candida guilliermondii* содержится 30% фосфолипидов в составе общих липидов [15] имеются данные о тенденции увеличения антиоксидантной активности с возрастанием содержания фосфорлипидов [16]. Следует отметить, что при УФ-В облучении с длиной волны 280–320 нм процесс перекисного окисления липидов в мембранах клеток зависит от дозы [17].

Интенсификация ПОЛ клеточных мембран вызывает уплотнение либо распад липидного слоя, увеличение его микровязкости, сокращение площади белок-липидных взаимодействий, изменение активности ферментных систем, мембранной проницаемости и поверхностного заряда, нарушение состояния рецепторных комплексов. За счёт ПОЛ липидно-белковые компоненты становятся доступными для фосфолипаз и протеаз [14].

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента мембран, являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек.

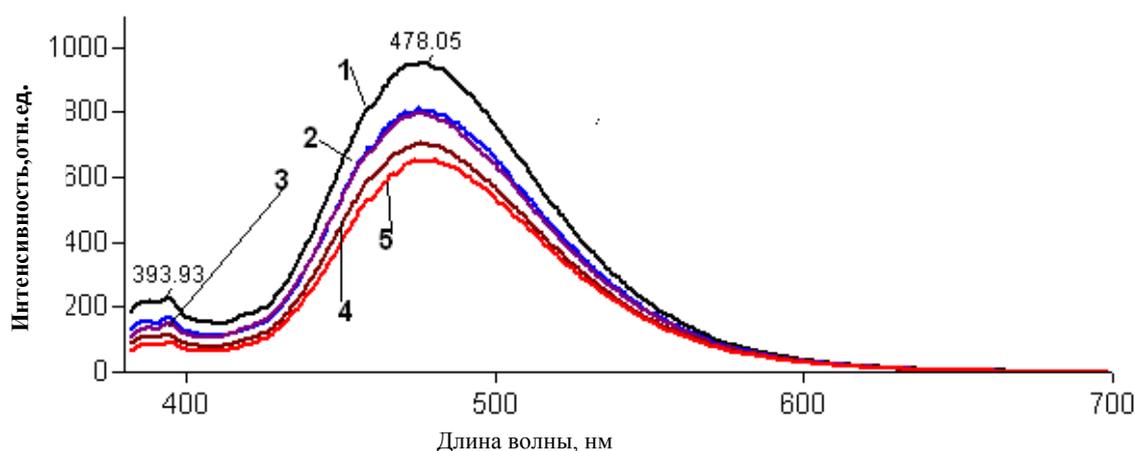


Рисунок 3. Изменение микровязкости (470/393 нм) и поляричности (372/393 нм) липидного бислоя плазматических мембран клеток дрожжей от дозы УФ-В излучения (возбуждение при 334 нм)
 ● Контроль, ● $0,3 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $0,7 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $1,5 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $2,2 \cdot 10^4$ эрг/мм²

Список литературы / References:

1. Eskov V.M. Influence of UV irradiation in the presence of AO on free radical oxidation in yeast cells. *Bulletin of New Medical Technologies*, 2002, vol. 3, pp. 15-17.
2. Кравец Е.А., Гродзинский Д.М., Гуща Н.И. Влияние УФ-Б облучения на репродуктивную функцию растений *Hordeum vulgare*, *Цитология и генетика*, 2008, № 5, с. 9-15. [Kravets E.A., Grodzinsky D.M., Gushcha N.I. Effect of UV-B irradiation on plant reproductive function *Hordeum Vulgare*. *Citologija i genetika*. 2008, no. 5, pp. 9-15. (In Russ.)]
3. Matthew R., Drake L. Approaches for determining the effects of UV radiation on Microorganisms in Ballast Water. *Management Biol. Invasions*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 87-99.
4. Zlatev, Z.S., Lidon, F.J., Kaimakanova, M. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2012, vol. 24, no. 6, p. 481.
5. Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Влияние УФ-В- излучения и температуры на МС-ЗЭС в клетках дрожжей. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 2017, т. 2, № 3, с. 361-368. [Kocharli N.K., Hummatova S.T. The influence of uf-b irradiation and temperature on MS-DLE in cell yeast. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 361-368. (In Russ.)]
6. Turker H. Potential effects of Ultraviolet-C radiation on the mole rats (*Spalaxleucodon*), hematological values. *Am. J. Mol. Biol.*, 2013, vol. 3, pp. 235-240.
7. Фрайкин Г.Я., Бельенькина Н.С., Рубин А.Б. Повреждающие и защитные процессы, индуцированные в клетках растений УФ В-излучением. *Известия РАН. Серия Биологическая*, 2018, № 6, с. 583-592. [Fraikin G.Ya., Belenkina N.S., Rubin A.B. Damaging and protective processes induced in plant cells by UV B-radiation. *Izvestija RAS. Serija Biologicheskaja*, 2018, no. 6, pp. 583-592. (In Russ.)]
8. Jordan B.R. The effect of ultraviolet B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv. Bot. Res.*, 1996, vol. 122, pp. 97-162.
9. Takshak S., Agrawal S.B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2019, vol. 193, pp. 51-88. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002.
10. Sullivan J.H., Teramura A.H. Field study of the interaction between solar ultraviolet B radiation and drought on photosynthesis and growth in soybean. *Plant. Physiol.*, 1990, vol. 92, no. 1, pp. 141-146.
11. Kuznetsov, V.V., Dmitrieva, G.A. *Plant Physiology*, Moscow, Higher School, 2006, 742 p.
12. Cadet J., Douki T., Ravanat J-L. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.*, 2015, vol. 91, pp. 140-155.
13. Mannuss A., Trapp O., Puchta H. Gene regulation in response to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1819, pp. 154-165.
14. Мухомедзянова С.В. и др. Липиды биологических мембран в норме и патологии. *Acta biomedica scientifica*, 2017, т. 2, № 5, ч. 1, с. 43-49 [Muhomedzyanova S.V. [et al.] Lipids of biological membranes are normal and pathological. *Acta biomedica scientifica*, 2017, vol. 2, no. 5, part 1, pp. 43-49. (In Russ.)]
15. Гордская Н.В. и др. Состав и структура фосфолипидов углеводородных дрожжей. *Биофизика*, 1978, т. 23, № 1, с. 166-171 [Gordskaya N.V. et al. Composition and structure of phospholipids of hydrocarbon yeast. *Biofizika*, 1978, vol. 23, no. 1, pp. 166-171. (In Russ.)]
16. Меньшов В.А., Шишкина Л.Н., Бурлакова Е.Б., Кишковский З.Н. Биофизические и биохимические аспекты регуляции перекисного окисления липидов клеток винных дрожжей, *Биофизика*, 1996, т. 41, № 6, с. 1239-1246. [Menchov V.A. Shishkina L.N., Burlakova E.B., Kishkovsky Z.N. Biophysical and biochemical aspects of the regulation of lipid peroxidation of wine yeast cells. *Biofizika*, 1996, vol. 41, no. 6, pp. 1239-1246. (In Russ.)]
17. Рошупкин Д.И., Аносов А.К., Мургина М.А., Лоркипанидзе А.Т. Фотопревращение мембранных липидов и его роль в изменении функции биомембран под действием УФ-излучения. *Молекулярные механизмы*

биологического действия оптического излучения. М.: Наука, 1988, с. 79-93 [Roshchupkin D.I., Anosov A.K., Murgina M.A., Lorkipanidze A.T. Phototransformation of membrane lipids and its role in changing the function of biomembranes under the action of UV radiation. *Molekuljarnye mehanizmy biologicheskogo dejstvija opticheskogo izluchenija*. М.: Nauka, 1988, pp. 79-93. (In Russ.)]

THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLENT – B IRRADIATION ON THE PLASMA MEMBRANE STRUCTURE IN THE YEAST CELLS

Kocharli N.K., Hummatova S.T.

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku- AZ 1148 , Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Abstract. It was determined that, ultraviolet- B (UV-B) radiation (280-320) induces the structure changes in the lipid bilayer and annular lipids of the plasma membranes of yeast cells. The object of the investigation was the yeast cells of *Candida guilliermondii* CMU-916. For the evaluation the structural state of the membranes, the microviscosity of the lipid phase was determined. The fluorescence of the samples was measured on a spectrophotometer (Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007) at a peak of the excitation light wavelength of 334 nm to evaluate the microviscosity and polarity of the lipid bilayer and annular lipids of yeast cells. The fluorescence peak of excimer pyrene F_E was recorded at an emission wavelength of 470 nm, and the fluorescence peak of the F_m monomer at an emission wavelength of 393 nm. The obtained data while using a fluorescent probe pyrene indicate a change in the studied parameters of the structural state of cell membranes. Based on the change in microviscosity of the yeast membranes after irradiation, it can be assumed that a structure modification can lead to a change in the polarity in the lipid bilayer. It has been shown that with increasing UV-B radiation, microviscosity and polarity in the lipid bilayer and annular lipids increase. According to the obtained results, it is assumed that an increase in microviscosity and polarity of cell membrane lipids is associated with the lipid peroxidation (POL). The combination of the obtained data suggests that after irradiation of yeast cells, a change in viscosity characteristics, a decrease in the fluidity of the membrane lipid component, are the reflections of adaptive structural and functional rearrangements. It is known that, during the stimulation of lipid peroxidation in the membranes, decreases the lipid content, microviscosity and electrostatic charge also change.

Key words: yeast cells, lipid, microviscosity, pyrene, ultraviolet- B.