

ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО-В ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н., Гумматова С.

Бакинский государственный университет

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0503

Аннотация. Настоящее исследование посвящено изучению влияния ультрафиолетового-В (УФ-В) излучения на выживаемость и продукцию активных форм кислорода в клетках дрожжей. Установлено, что при действии УФ-В излучения на клетки в зависимости от дозы увеличивается скорость окисления красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF\cdot DA$) и наблюдается высокая интенсивность флуоресценции DCF. При модификации клеток аскорбиновой кислотой до облучения скорость окисления H_2DCF и интенсивность флуоресценции DCF уменьшается. Выживаемость модифицированных клеток увеличивается. Аскорбиновая кислота уменьшает количество АФК в суспензии облученных клеток. При больших дозах ($4,5 \cdot 10^7$ эрг/мм²) облучения антиокислительный эффект аскорбиновой кислоты в клетках дрожжей незначителен. Определена концентрация 2-4 динитрофенола (ДНФ) 10^{-7} М как протектора, в которой вещество потенциально способствует проявлению эффекта «мягкого разобщения» в клетках и при влиянии УФ-В излучения на клетки дрожжей способствует снижению производства активных форм кислорода и увеличению выживаемости. Высокие концентрации (10^{-3} М- 10^{-5} М) ДНФ отрицательно влияют на выживаемость клеток дрожжей и продукцию АФК. Таким образом, можно заключить, что при действии УФ-В лучей на клетки дрожжей антиоксиданты возможно могут участвовать в регулировании редокс-гомеостаза.

Ключевые слова: клетки дрожжей, выживаемость, ультрафиолетовое-В излучение, аскорбиновая кислота, 2,4- динитрофенол.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ответных реакций живых организмов на действие неблагоприятных факторов среды является усиление генерации АФК в клетках. Они возникают в реакциях одно, двух и трехэлектронного восстановления кислорода в результате само и ферментативного окисления соединений, в фотоиндуцируемых реакциях и обладают высокой реакционной способностью. Среди АФК выделяют свободнорадикальные частицы – супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), перекисные радикалы (RO_2^{\bullet}) и нейтральные молекулы, такие как пероксид водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), озон (O_3) и др. [1,2].

Известно, что накопление активных форм кислорода (АФК) приводит к возникновению окислительного стресса, который определяется как состояние дисбаланса между образованием АФК и способностью антиоксидантной системы (АОС) организма, включая её ферментативные и неферментативные компоненты, нейтрализовать их генерацию [3]. Окислительный стресс является следствием существования живых организмов в среде с высоким содержанием кислорода и сопровождается нарушениями строения и функций всех типов биомолекул, включая нуклеиновые кислоты, липиды и белки [2]. Рядом исследований показано, что регуляторные функции АФК обусловлены обратимой окислительной модификацией аминокислотных остатков в составе белков, главным образом, путем S-сульфенилирования/S-глутатионилирования/S-нитрозилирования/S-перисульфидации остатков цистеина и нитрования остатков тирозина [1,4-15], что обеспечивает поддержание внутриклеточного редокс-гомеостаза и нормальное функционирование клеток. Следовательно, АФК могут иметь не только отрицательное, но и положительное значение в живых системах, выполняя регуляторные функции в клетках. В ходе длительной эволюции живые организмы приобрели адаптивные системы обнаружения, захвата и нейтрализации АФКА и АФГ для защиты клеток от действия их высоких токсичных концентраций и поддержания редокс-гомеостаза [8,13]. В живых организмах возникли сложные приспособительные механизмы, направленные на поддержание концентраций АФКА и АФГ на стабильно низком уровне и их использование для регуляции активности внутриклеточных эффекторов передачи сигнала, инициируемых факторами роста, факторами транскрипции, ферментов и др. [7,13]. Достигается это путем активации в ответ на окислительный стресс эндогенной антиоксидантной системы, состоящей из ферментативных и неферментативных компонентов, которые способны ингибировать реакции окисления и предотвращать образование и дальнейшее распространение образующихся высокореактивных электрофильных продуктов. Среди ферментов, которые могут взаимодействовать с АФКА, следует выделить супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу, пероксиредоксины и др. К неферментативным антиоксидантам относятся витамины, такие как аскорбиновая кислота, альфа-токоферол и ретинол. Кроме того, следует особо выделить вещества, содержащие тиольную группу, такие как глутатион и липоевая кислота, а также дипептид карнозин, мелатонин, билирубин, мочевую кислоту, кофермент Q, ионы переходных металлов, такие как Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} . В физиологических условиях эти системы обезвреживания АФКА действуют скоординировано и способствуют поддержанию редокс-гомеостаза и нормальному функционированию клеток. В клетках млекопитающих и их

внутриклеточных органеллах, включая митохондрии, экспрессируется, как было сказано выше, целый ряд ферментов, вовлеченных в инактивацию АФК, АФА и АФГ. Супероксид анион-радикал, как первичная форма АФК, подвергается реакции дисмутации спонтанно или воздействием супероксиддисмутазы с образованием перекиси водорода. При этом, высокая скорость превращения $\cdot\text{O}_2^-$ в H_2O_2 под действием СОД обеспечивает уменьшение повреждающего действия АФК на клетки [10,16,17].

Известно, что в стрессовых условиях характерно увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), при этом дрожжевые клетки имеют эффективную антиоксидантную систему, способную дезактивировать АФК поддержанием окислительно-восстановительного потенциала клеток. Первая линия ключевых антиоксидантных ферментов защиты включает супероксиддисмутазы СОД и каталазы [9]. Считается, что универсальным механизмом защиты клеток дрожжей в стрессовых условиях: при адаптации к экстремальным рН, при экспозиции с высокими концентрациями прооксидантов и др., является АФК-индуцированное увеличение активности СОД [18].

Нарушение баланса между образованием и утилизацией АФК приводит к их накоплению и усилению ПОЛ, белков, нуклеиновых кислот и др. [16]. Одними из главных мишеней АФК являются липиды мембран, в особенности, ненасыщенные жирные кислоты (ННЖК) [7]. ПОЛ приводит к повреждению липидов, окислению SH-групп белков мембран, инактивации ферментов, нарушению структуры мембран, повышению их проницаемости и гибели клетки [19]. АФК могут активировать нуклеазы, повреждать углеводные мостики между нуклеотидами, что приводит к разрушению цепей ДНК и РНК [1,20]. АФК нарушают структуру тилакоидных мембран, вызывают уменьшение активности хлоропластных ферментов, а также снижают эффективность работы ЭТЦ, повреждая ФС I и II [7].

Таким образом, АФК в клетках низших и высших растений образуются в обычных условиях и принимают участие в метаболизме. Нарушение про и антиоксидантного равновесия при действии неблагоприятных факторов, в том числе низких температур, ведет к их избыточному накоплению, усилению процессов ПОЛ, повреждению макромолекул и гибели клетки [7]. Повышение уровня АФК в клетках, в свою очередь, запускает защитные механизмы, среди которых одним их важнейших считают активизацию работы АОС [14].

Настоящая работа посвящена изучению выживаемости и определению количества АФК в клетках дрожжей при воздействии различных доз УФ-В излучения, а также влияние модификаторов (аскорбиновой кислоты и 2,4-динитрофенола) на эти параметры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Облучение клеток дрожжей осуществляли с помощью ртутной лампы ПРК-4. Доза облучения составляла $1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм², $2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм², $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм². Контролем служила суспензия необлученных клеток. Суспензию клеток дрожжей подвергали воздействию УФ-В излучения, затем проводили оценку образования АФК и определяли их жизнеспособность. Клетки дрожжей облучали при 21 °С в присутствии 10-3 М аскорбиновой кислоты (Аск), кроме того, суспензию клеток дрожжей облучали в присутствии 2-4-динитрофенола (ДНФ) в концентрации 10^{-3} М - 10^{-7} М. Дрожжевые клетки-удобный и хорошо изученный объект для исследования влияния УФ-В излучения. Для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) суспензию клеток дрожжей *Candida guilliermondii* после десятикратного разведения высевали на твердую среду сусло-агар. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) регистрировали, спустя 24–48 ч инкубации при 30 °С. Выживаемость определяли как процент образовавшихся КОЕ после определенной дозы воздействия к количеству КОЕ до воздействия. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата- $\text{H}_2\text{DCF} \cdot \text{DA}$. Данный краситель используется для определения уровня АФК в живых клетках. $\text{H}_2\text{DCF} \cdot \text{DA}$ при деацетилировании эстеразами превращается в H_2DCF . В присутствии АФК H_2DCF окисляется до DCF, который в дальнейшем флуоресцирует в зеленом канале [21]. Для регистрации сигнала использовали спектрофлуориметр. Для определения уровня АФК в клетках дрожжей инкубировали с 50 мкМ $\text{H}_2\text{DCF} \cdot \text{DA}$ в течение 30 минут, затем определяли интенсивность флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определяли количество АФК, продуцируемого при окислительном стрессе при воздействии УФ-В лучей на дрожжевые клетки. Количество АФК определяли по интенсивности дихлордигидро флуоресцеина при длине волны 488 нм. Флуоресценция зонда возникает при его взаимодействии с АФК, а ее интенсивность характеризует активность свободнорадикальных процессов в клетке.

Избыточное накопление уровня АФК вызывает развитие окислительного стресса, который может вызывать гибель клетки. Клетки дрожжей подвергали облучению в дозе ($1,2 \times 10$ эрг/мм - $4,8 \times 10$ эрг/мм) анализировали изменение изучаемых параметров (рис. 1).

Установлено, что количество АФК в контрольных клетках не увеличивается, а увеличивается их количество после воздействия различных доз УФ-В лучей. Количество АФК не меняется при добавлении антиоксиданта-аскорбиновой кислоты в суспензию контрольных клеток. Однако аскорбиновая кислота уменьшает количество АФК, при воздействии УФ-В излучения на клетки. Из-за воздействия очень высокой дозы УФ-В-лучей

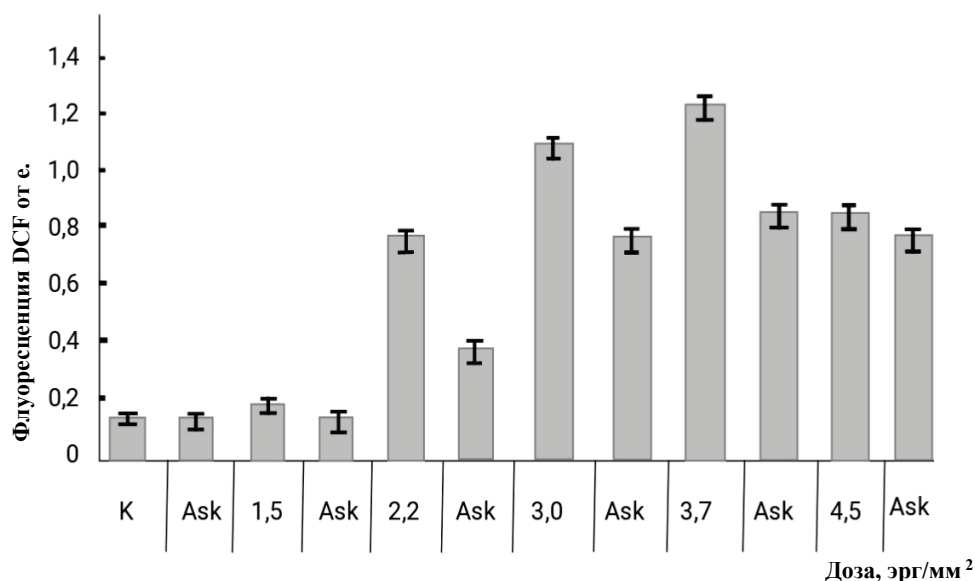


Рисунок 1. Зависимость количества АФК в клетках дрожжей от дозы УФ-В излучения

($4,5 \times 10^4$ эрг/мм²) в клетках наблюдается снижение количества АФК по сравнению с предыдущей дозой ($3,7 \times 10^4$ эрг/мм²), и антиоксидантный эффект аскорбиновой кислоты в этой дозе слаб.

В результате ранее проведенных исследований нами было установлено, что 95% дрожжевых клеток инактивируются при воздействии УФ-В лучей в дозе $4,5 \times 10^4$ эрг/мм².

Из литературы известно, что не только ДНК, но и фотоингибирование клеточного дыхания могут играть роль в процессе инактивации клеток за счет УФ-В-лучей с длиной волны 313 нм [22]. По данным литературы, фосфолипиды в мембране клеток *Candida guilliermondii* составляют 30%. Это позволяет предположить, что АОА (антиоксидантная активность) этой клетки высока. При высоких дозах УФ-В-лучей ускоряется процесс перекисного окисления липидов, так как происходит прямой фотолиз антиоксидантов. Причиной этого является быстрый фотолиз антиоксиданта из-за высокого коэффициента поглощения на этих длинах волн. По-видимому, при облучении клеток дрожжей большими дозами УФ-В излучения уменьшение антиокислительной активности аскорбиновой кислоты связано с использованием аскорбиновой кислоты также в процессе перекисного окисления липидов.

В представленной работе для активизации адаптационных механизмов клеток при воздействии УФ-В излучения в суспензию клеток добавляли различные концентрации ДНФ.

Влияние ДНФ на клетки зависит от соотношения его ионизированной и неионизированной форм в среде. Известно, что снижение потенциала митохондриальной мембраны при концентрациях ДНФ ниже 0,01 мМ связано с увеличением протонной проницаемости митохондриальной мембраны. При длительном применении ксенобиотика происходит ускорение митохондриального дыхания, снижается скорость образования АФК (в микросомальной окислительно-восстановительной цепи), снижается количество гидроперекисей липидов [23].

Уменьшить количество АФК можно путем частичного отделения дыхания от окислительного фосфорилирования при условии сохранения синтеза АТФ для поддержания нормальной жизнеспособности клеток [11,24]. Этот механизм называется «мягким разобщением» («mild» uncoupling). Это достигается за счет увеличения проницаемости митохондриальной мембраны для протонов H⁺, что приводит к увеличению утилизации кислорода. Из-за снижения концентрации кислорода ослабляется процесс образования АФК [25].

Таким образом, снижение продукции АФК является потенциальным механизмом замедления старения клеток [5]. В результате воздействия концентраций «мягкого разобщения» ДНФ кинетика роста и гибели культуры клеток не изменяется, а жизнеспособность не повышается. Считается, что оптимальная концентрация ДНФ находится в пределах от $5 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ М [25,23].

При изучении процесса старения дрожжевых клеток установлено, что ДНФ увеличивает как хронологическую, так и репликативную продолжительность жизни [12]. Отмечено, что ДНФ оказывает положительное влияние на различные модельные объекты, но оказывает положительное влияние ДНФ в очень небольшом диапазоне концентрации.

В исследованиях, проводимых нами установлено, что при добавлении ДНФ в суспензию клеток дрожжей при низких (10^{-7} М) концентрациях увеличивается выживаемость клеток и обладает протекторными свойствами, но при высоких концентрациях (1×10^{-4} - 1×10^{-3} М) такой эффект не наблюдается (рис. 2). Схожие данные нами были получены и при изучении влияния ДНФ на миллисекундную эмиссию света акридинового оранжевого в клетках дрожжей [26]. Концентрация ДНФ 10^{-7} мягко разобщающая и защищает клетки дрожжей от повреждения при действии УФ-В излучения.

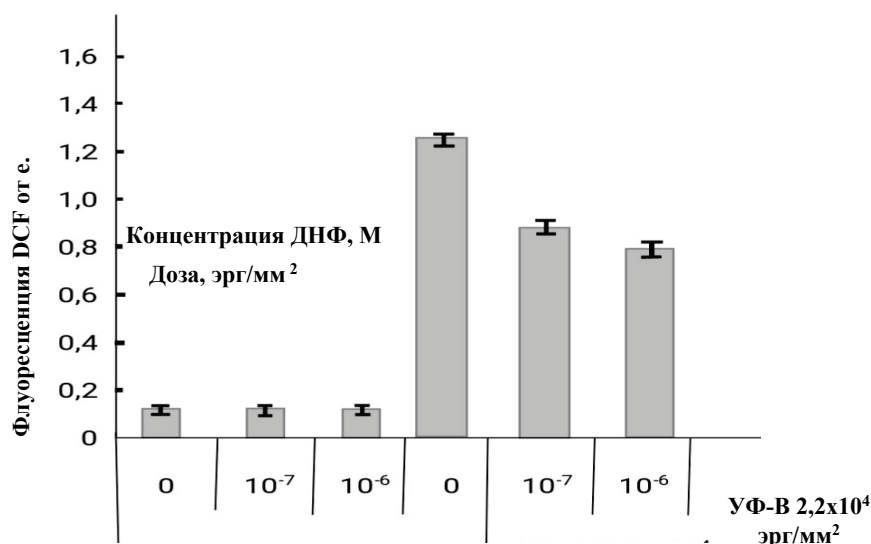


Рисунок 2. Зависимость количества АФК в клетках дрожжей от концентрации ДНФ после воздействия УФ-В излучения (доза УФ-В $2,2 \times 10^4$ эрг/мм²).

Из представленных данных следует, что при действии на клетки УФ-В лучами увеличивается скорость окисления зонда (H_2DCF) и наблюдается высокая интенсивность флуоресценции DCF, но при модификации клеток аскорбиновой кислотой и ДНФ концентрацией 10^{-7} М скорость окисления и интенсивность DCF уменьшается. Кроме того, увеличивается жизнеспособность модифицированных клеток. Таким образом, можно заключить, что при действии УФ-В лучей на клетки дрожжей антиоксиданты возможно могут участвовать в регулировании редокс-гомеостаза.

Список литературы / References:

- Mittler R. ROS are good. *Trends Plant Sci.*, 2017, vol. 22, pp. 11-19.
- Noctor G. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochem.*, 2015, vol. 112, pp. 33-53.
- Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, vol. 86, pp. 715-748.
- Adams L., Franco M.C., Estevez A.G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 2015, vol. 240, pp. 711-717.
- Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.*, 2000, vol. 35, no. 6-7, pp. 811-820, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00135-2.
- Egea J., Fabregat I. European contribution to the study of ROS: a summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology*, 2017, vol. 13, pp. 94-162.
- Gill S.S. Tuteja Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010, vol. 48, pp. 909-930.
- He L., He T. et al Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, vol. 44, pp. 532-553.
- Herrero E. et al. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol. 1780, pp. 1217-1235.
- Inupakutika M.A. et al The evolution of reactive oxygen species metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 2016, vol. 67, pp. 5933-5943.
- Korshunov S.S. et al High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 416, no. 1, pp. 15-18.
- Mookerjee S.A. et al Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech. Ageing Dev.*, 2010, vol. 131, no. 7-8, pp. 463-472.
- Niki E. Oxidative stress and antioxidants: distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, vol. 595, pp. 19-24.
- Noctor G. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochem.*, 2015, vol. 112, pp. 33-53.
- Ray P.D., Huang, B.W et al Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation and signaling. *Cell Signaling*, 2012, vol. 24, pp. 981-990.
- Креславский В.Д., Аллаhverдиев С.И. и др. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений. *Физиология растений*, 2012, т. 59, № 2, с. 163-178. [Kreslavskij V.D., Allahverdiev S.I. et al. Signal'naja rol' aktivnyh form kisloroda pri stresse u rastenij. *Fiziologija rastenij*, 2012, vol. 59, no. 2, pp. 163-178. (In Russ.)]
- Ursini F., Maiorino M., Forman H.J. Redox homeostasis: the golden mean of healthy living. *Redox Biology*, 2016, vol. 8, pp. 205-215.

18. Секова В.Ю. и др. Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к pH-стрессу. *Прикладная биох. и микробиол.*, 2015, т. 51, № 6, с. 570-577. [Sekova V.Ju. et al. Okislitel'no-vosstanovitel'nyj status jekstremofil'nyh drozhzhej *Yarrowia lipolytica* pri adaptacii k rN-stressu. *Prikladnaja bioh. i mikrobiol.*, 2015, vol. 51, no. 6, pp. 570-577. (In Russ.)]
19. Sharma P., Sharma P., Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.*, 2012, art. id 217037, pp. 1-26, doi: 10.1155/2012/217037.
20. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, vol. 33, pp. 8-13.
21. Suzuki N., Suzuki N., Koussevitzky S. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 2012, vol. 35, no. 2, pp. 259-270.
22. Фрайкин Г.Я. Молекулярные механизмы деструктивных, защитных и регуляторных фотобиологических процессов. моногр. Фрайкин Г. Я.; М:000 "АР-консалт", 2016, 88 с. [Frajkin G.Ja. *Molekuljarnye mehanizmy destruktivnyh, zashhitnyh i reguljatornyh fotobiologicheskix processov*. monogr. Frajkin G. Ja.; М:000 "AR-konsalt", 2016, 88 p. (In Russ.)]
23. Подалько В.И. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте. *Успехи геронтологии*, 2010, т. 23, № 1, с. 98-103. [Podal'ko V.I. Vlijanie 2,4-dinitrofenola na intensivnost' okislitel'nyh processov v pecheni krysv v dlitel'nom jeksperimente. *Uspexi gerontologii*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 98-103. (In Russ.)]
24. Starkov A.A. Mild uncoupling of mitochondria. *Bioscience Rep.*, 1997, vol. 17, no. 3, pp. 273-279.
25. Моргунова Г.В., Кармушаков А.Ф. и др. Изучение влияния «мягкого разобщения» 2,4-динитрофенолом на рост последующую гибель в стационарной фазе культуры клеток китайского хомячка. *Вестн. Моск. Ун-Та. сер. 16. Биология*, 2019, т. 74, № 3, с. 207-214. [Morgunova G.V., Karmushakov A.F. et al. Izuchenie vlijanija «mjagkogo razobshhenija» 2,4-dinitrofenolom na rost posledujushhuju gibel' v stacionarnoj faze kul'tury kletok kitajskogo homjachka. *Vestn. Mosk. Un-Ta. ser. 16. Biologija*, 2019, vol. 74, no. 3, pp. 207-214. (In Russ.)]
26. Гумматова С.Т., Кочарли Н.К. и др. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей. *Фундаментальные исследования*, 2011, № 11, с. 590-593. [Gummatova S.T., Kocharli N.K. et al. Vlijanie 2,4-dinitrofenola na intensivnost' msek-ZJeS АО v kletkah drozhzhej. *Fundamental'nye issledovaniya*, 2011, no. 11, pp. 590-593. (In Russ.)]

PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES UNDER THE ACTION OF UV-B RADIATION ON YEAST CELLS.

Kocharli N., Gummatova S.

Baku State University

Z. Khalilova str., 23, Baku, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Received 19.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0503

Abstract. The present investigation is devoted to the study of the effect of ultraviolet-B (UV-B) radiation on the survival and production of reactive oxygen species in yeast cells. It has been determined that under the action of UV-B radiation on cells, depending on its dose, the rate of oxidation of the dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF•DA) increases and a high intensity of DCF fluorescence is observed. When cells are modified with ascorbic acid before irradiation, the rate of H₂DCF oxidation and the intensity of DCF fluorescence decreases. The survival rate of modified cells is increased. Ascorbic acid reduces the amount of ROS in the suspension of irradiated cells. At high doses (4.5-10 erg/mm²) of irradiation, the antioxidant effect of ascorbic acid in yeast cells is negligible. The concentration of 2-4 dinitrophenol (DNF) 10⁻⁷ M was determined as a protector, in which the substance potentially contributes to the manifestation of the effect of "soft uncoupling" in cells and, under the influence of UV-B radiation on yeast cells, helps to reduce the production of reactive oxygen species and an increase in survival. High concentrations (10⁻³M–10⁻⁵ M) of DNP adversely affect the survival of yeast cells and ROS production. So, it can be concluded that under the action of UV-B rays on yeast cells, antioxidants can possibly participate in the regulation of redox homeostasis.

Key words: yeast cells, survival, ultraviolet-B radiation, ascorbic acid, 2,4-dinitrophenol.