

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-В ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию 11.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0581

Аннотация. Настоящая работа посвящена изучению продукции оксида азота в клетках дрожжей после действия УФ-В излучения. Кроме того, проведена сравнительная оценка продукции активных форм кислорода (АФК), оксида азота и супероксиданион радикала. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата-Н₂DCF•DA. Данный краситель используется для определения уровня АФК в живых клетках. Внутриклеточную концентрацию оксида азота мы определяли при помощи флуоресцентного красителя; -4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеиндиацетат (DAF-FM). Установлено, что при действии УФ-В излучения на клетки в зависимости от дозы увеличивается скорость окисления красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (Н₂DCF•DA) и наблюдается высокая интенсивность флуоресценции DCF с ростом дозы УФ-В лучей увеличивается интенсивность флуоресценции DAF-FM. При действии высокой дозы (4,8·10² эрг/мм².) УФ-В лучей генерация АФК и оксида азота уменьшается. Как видно из полученных данных, при высоких дозах облучения интенсивность хемилюминесценции люцигенина сохраняется на высоком уровне.

Ключевые слова: активные формы кислорода (АФК), активные формы азота (АФА), флуоресценции DCF, клетки дрожжей, хемилюминесценция (ХЛ).

ВВЕДЕНИЕ

Высокая биологическая активность различных активных форм кислорода и азота, их взаимодействие обусловили необходимость постоянного функционирования в организме специальных механизмов противоокислительной (антиоксидантной) биологической защиты. NO-ергическая система, как и антиоксидантная система, играет важную роль в стрессорных и адаптивных ответах организма, являясь универсальным регулятором физиологических функций и метаболизма клеток [1,2].

К экологически важным агентам оксидативного стресса относится мягкое ультрафиолетовое излучение УФ-А и УФ-В диапазонов спектра. На поверхности клеток высших организмов имеются специализированные чувствительные рецепторы, которые воспринимают УФ-сигнал и далее, благодаря сопряжению рецепторов с внутриклеточными посредниками, запускается сложная регуляторная система, приводящая к активизации ряда генов и синтезу белков, участвующих в отклике объекта на действие УФ-излучения. Данная система регуляции внутриклеточного метаболизма относится к числу наиболее глобальных в мире высших животных и растений и, по-видимому, микроорганизмов. Стресс у эукариот связан с включением сигнальных путей, в которых участвуют активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO) обладающие широким спектром биологического действия [3]. В клетках в ходе метаболизма образуются АФК и АФА. Однако чрезмерно продуцируемые АФК и АФА могут приводить к повреждению клеток и к их гибели. Активные формы азота представляют собой продукты метаболизма оксида (NO), взаимодействует с такими формами кислорода, как супероксид (O₂⁻) и перекись водорода (H₂O₂) [4]. Одним из механизмов функционального взаимодействия между АФК и NO может быть влияние последнего на активность и экспрессию генов антиоксидантных ферментов. При этом даже прямое действие оксида азота на антиоксидантные ферменты, связано с нитрозилирование и нитрования, может приводить к различным результатам, как к повышению или к снижению активности в условиях *in vivo* умеренное ингибирование антиоксидантов оксидом азота может индуцировать усиление экспрессии их генов и через некоторое время приводить к повышению активности [5].

Доказательства, представленные авторами, подчеркивают роль оксида азота (NO) как антистрессовой молекулы, способной справляться с вызванными УФ-В изменениями в окислительно-восстановительном состоянии клетки. Наша модель предполагает, что восприятие УФ-В вызывает увеличение концентрации абсцизовой кислоты (АБК), что увеличивает H₂O₂ и индуцирует NO. Параллельно УФ-В активирует рецептор УФ-В UVR8. UVR8 стабилизируется эндогенным NO и активирует фактор транскрипции HY5. HY5 может регулировать экспрессию и активность нитратредуктазы, вызывая увеличение NO. NO снижает уровень АФК за счет своей активности поглотителя. Точно так же HY5 также повышает экспрессию CHS и CHI. Это приводит к увеличению содержания флавоноидов и антоцианов, которые способны поглощать УФ-В излучение и улавливать АФК. Кроме того, NO может также регулировать активность антиоксидантной системы (АС) посредством посттрансляционных модификаций антиоксидантных ферментов, таких как каталазы, пероксидазы, оксидазы и др.

Люцигенин как метод количественного определения супероксидных радикалов. Обнаружение супероксидного радикала в живых клетках – чрезвычайно важно из-за ведущей роли этого радикала в редокс-

сигнализации внутри клетки и в развитии большого числа патологических состояний. В силу высокой чувствительности люцигенина в качестве ХЛ-зонда на супероксидный радикал, люцигенин-активируемая ХЛ (Люц-ХЛ) использовалась для обнаружения $\cdot\text{OO}^-$ при окислении ксантина или гипоксантина ксантинооксидазой, НАДФН цитохром редуктазой микросом, НАДФН-оксидазой клеток фагоцитов, и чувствительными к дифенилениодониуму НАДФН-оксидазами клеток эндотелия, фибробластов и гладкомышечных клеток стенок кровеносных сосудов. Было также предложено использовать Люц-ХЛ для изучения образования $\cdot\text{OO}^-$ [6].

Ранее нами было изучена продукция АФК в клетках дрожжей после УФ-В излучения. Целью данной работы было изучение продукции оксида азота в клетках дрожжей после действия УФ-В излучения.

МАТЕРИАЛЫ 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 NO. Клетки дрожжей облучали при 21°C. Дрожжевые клетки-удобный и хорошо изученный объект для исследования влияния УФ-В излучения. Внутриклеточную концентрацию оксида азота мы определяли при помощи флуоресцентного красителя DAF-FM [7]. В суспензию клеток добавляли флуоресцентный краситель в концентрации 5 мкМ и инкубировали в течение 30 минут. После инкубации клеток с красителем интенсивность флуоресценции определяли на спектрофлуориметре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при УФ-В излучении клеток дрожжей изменяется внутриклеточная концентрация оксида азота. При низкой дозе УФ-В лучей ($1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм²) не было существенных отличий в концентрации азота между контрольными и облученными клетками. Концентрация оксида азота в облученных клетках дозами ($2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм²) была 1,2 и 1,5 раза выше соответственно, чем в контроле (рис. 1).

На основании этих данных мы сделали вывод, что УФ-В излучение способствует увеличению продукции оксида азота клетками дрожжей. Но при высоких дозах ($4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²) УФ-В излучения, количество оксида азота уменьшается.

Нами показано, что в клетках дрожжей, облученных этой дозой УФ-В, увеличивается количество супероксидного радикала, установленного хемиллюминесцентным методом по интенсивности хемиллюминесценции люцигенина (рис. 2).

Нами изучена интенсивность хемиллюминесцентной (ХЛ) реакции люцигенина-нитрат бис-N-метилакридиния (Люц++) в клетках дрожжей, подвергнутых воздействию различных доз ультрафиолетовых-В лучей ($1,2 \cdot 10^2$ составляла эрг/мм², $2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм², $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²). Исследование супероксидного радикала методом ХЛ характеризует не концентрацию радикалов, а скорость реакции, в которой они образуются. Установлено, что с увеличением дозы УФ-В лучей интенсивность хемиллюминесценции люцигенина и выход ХЛ по сравнению с контролем увеличивается в зависимости от дозы. Выявлено, что после воздействия УФ-лучей активируется NADPH-оксидазный ферментный комплекс в плазматической мембране клеток дрожжей [8].

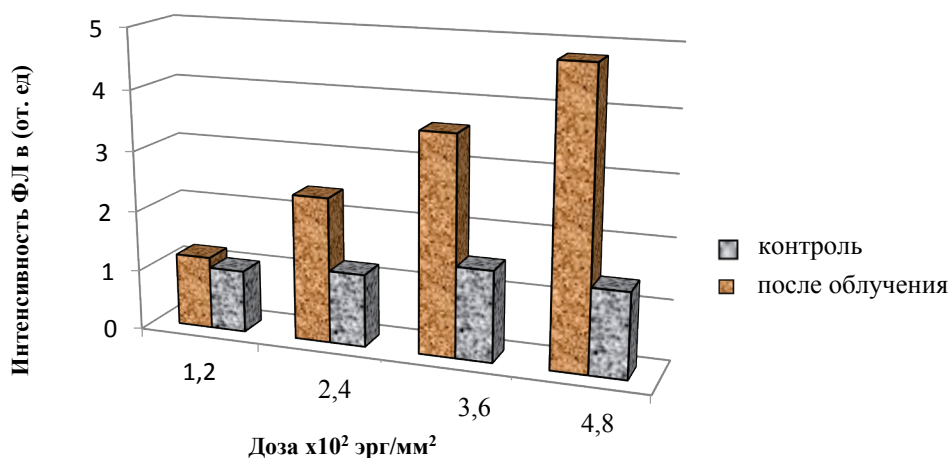


Рисунок 1. Динамика изменения оксида азота в клетках дрожжей после УФ-В излучения

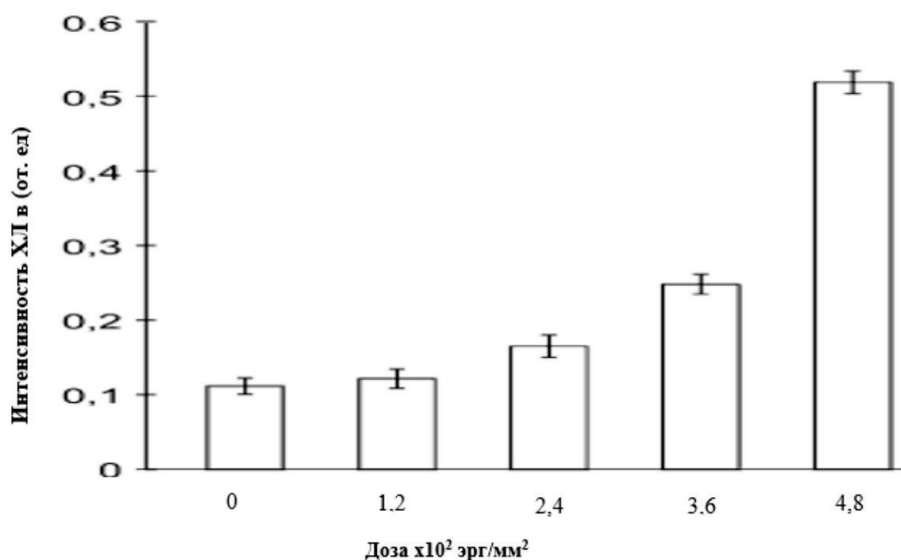


Рисунок 2. Зависимость ХЛ люциферина от дозы УФ-В лучей в клетках дрожжей

Как видно из полученных данных при высоких дозах облучения интенсивность люциферина сохраняется на высоком уровне.

По литературным данным увеличение продукции оксида азота происходит пропорционально поступлению в цитоплазму ионов Ca^{2+} . Главный фактор, инактивирующий оксид азота – супероксидный радикал. В результате его взаимодействия с молекулой NO происходит образование высокоактивных радикалов – нитропероксильного и гидропероксильного.

При истощении своего основного субстрата L-аргинина, NO-синтаза сама может генерировать супероксидный радикал. Оксид азота также участвует в детоксикации супероксида с образованием пероксинитрита (ONOO^-) и перекиси водорода [9]. Таким образом, оксиду азота, в зависимости от конкретных условий, т.е. в зависимости от дозы действующего фактора свойственны повреждающие и защитные функции.

Супероксид-анион и NO являются свободными радикалами кислорода. Они вступают в реакцию, скорость которой в 3 раза быстрее скорости реакции супероксид-аниона с SOD и антиоксидантом. Однако в физиологических условиях эндогенная антиоксидантная защита минимизирует это взаимодействие и поддерживает некий баланс между O_2^- и NO. Сдвиг этого равновесия (при разного рода патологических состояниях) в сторону супероксид-аниона приводит к образованию ONOO^- [10], вызывающего повреждение мембран и ДНК клетки, мутации, апоптоз, способствующего развитию воспалительных процессов, ПОЛ и другим нарушениям. NO увеличивает активность антиоксидантных ферментов и экспрессию кодирующих их генов [11]. $\text{NO}\cdot$ может замедлять ПОЛ, действуя как скавенджер кислородных радикалов. Этот своеобразный антиоксидантный эффект $\text{NO}\cdot$ авторам позволил предположить, что взаимодействие между супероксид-анионом и $\text{NO}\cdot$ может быть биологически важным путем детоксикации потенциально опасных АФК.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что уменьшение количества АФК и оксида азота в клетках дрожжей при дозе $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм² связано с повреждением и гибелью клеток, так как при этой дозе выживаемость клеток составляет 20%.

Список литературы / References:

1. Гудков Л.Л. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота. *Биофизика*, 2007, № 3, вып. 52, с. 503-509 [Gudkov L.L. Anitioksidantnoe i prooksidantnoe dejstvie donorov i metabolitov oksida azota. *Biofizika*, 2007, no. 3, iss. 52, pp. 503-509 (In Russ.)].
2. Малахов В.А. *Проблема оксида азота в неврологии*: монография. Суми: Видавництво СумДПУ ім. А.С.Макаренка, 2009, 242 с. [Malahov V.A. *Problema oksida azota v nevrologii*: monografija. Sumi: Vidavnictvo SumDPU im. A.S. Makarenka, 2009, 242 p. (In Russ.)].
3. Маргулис А.Б., Ярулина Д.Р., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Роль внутриклеточных NO и АФК в ответе лактобацилл на сигнальные молекулы бактерий гомосеринлактон и гексилрезорцин. *Уч. Записки Государственного Университета*, 2010, т. 152, кн. 2, с. 137-144 [Margulis A.B., Jarulina D.R., Kolpakov A.I. Il'inskaja O.N. Rol' vnutrikletocnyh NO i AFK v otvete laktobacill na signal'nye molekuly bakterij gomoserinlakton i geksilrezorcin. *Uch. Zapiski Gosudarstvennogo Universiteta*, 2010, vol. 152, iss. 2, pp. 137-144 (In Russ.)].
4. Шлапакова Т.И., Костин Р.К., Тягунова Е.Е. Активные формы кислорода: Участие в клеточных процессах и развитии патологии. *Биоорганическая химия*, 2020, т. 46, № 5, с. 466-485 [Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tjagunova E.E. Aktivnye formy kisloroda: Uchastie v kletocnyh processah i razvitii patologii. *Bioorganicheseskaja himija*, 2020, vol. 46, no. 5, pp. 466-485 (In Russ.)].
5. Raul Kassiya et al. *Reactive Oxygen Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, pp. 555-572.

6. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная Хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, т. 49, 2009, с. 341-388 [Vladimirov Ju.A., Proskurina E.V. Svobodnye radikaly i kletochnaja Hemiljuminescencija. *Uspehi biologicheskoy himii*, 2009, vol. 49, pp. 341-388 (In Russ.)].
7. Sheng I.Z. DAF-FM (4-Amino- 5 methylamino-2,7- difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, vol. 315, pp. 931-940.
8. Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Влияние ультрафиолетовых-В лучей на хемилюминесценцию люцигенина в клетках дрожжей. *Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук*, 2020, № 2, с. 13-19 [Kocharli N.K., Gummatova S.T. Vlijanie ul'trafiol'etovyh-V luchej na hemiljuminescenciju ljucigenina v kletkah drozhzhej. *Vestnik Bakinskogo Universiteta. Serija estestvennyh nauk*, 2020, no. 2, pp.13-19 (In Russ.)].
9. Салей А.П., Рецкий М.И. роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения. *Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация*, 2003, № 1, с. 75-80 [Salej A.P. M.I. Reckij rol' oksida azota v formirovanii motivacionnogo povedenija i obuchenija. *Vestnik VGU. Serija himija, biologija, farmacija*, 2003, no. 1, pp. 75-80 (In Russ.)].
10. Zielonka J. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: high-throughput real-time analyses. *J. Biol Chem.*, 2012, no. 5, iss. 287, pp. 2984-2995, doi: 10.1074/jbc.M111.309062.
11. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободнорадикального окисления в условиях патологии. *Современные проблемы науки и образования*, 2006, № 6, с. 21-26 [Chesnokova N.P. Molekuljarno-kletochnye mehanizmy indukcii svobodnoradikal'nogo okislenija v uslovijah patologii. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, 2006, no. 6, pp. 21-26 (In Russ.)].

THE ROLE OF NITRIC OXIDE UNDER THE INFLUENCE OF UV-B RADIATION ON YEAST CELLS

Kocharli N.K., Gummatova S.T.

Baku State University, Department of Biophysics and Biochemistry
Zahid Khalilov Street, 23, Baku, Azerbaijan, e-mail: sam_bio@mail.ru

Received 11.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0581

Abstract. The present work is devoted to the study of nitric oxide production in yeast cells after exposure to UV-B radiation. In addition, a comparative evaluation of the production of reactive oxygen species (ROS) was carried out. The change in the level of ROS was determined using the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-H2DCF•DA. That dye is used to determine the level of ROS in living cells. We determined the intracellular concentration of nitric oxide using a fluorescent dye; -4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM). It was found that under the action of UV-B radiation on cells, depending on the dose, the rate of oxidation of the dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF•DA) increases and a high intensity of DCF fluorescence is observed. Under the action of a high dose ($4,8 \cdot 10^2$ erg/mm²) of UV-B rays, the generation of ROS and nitric oxide decreases. As can be seen on the obtained data, at high doses of radiation, the intensity of chemiluminescence of lucigenin remains at a high level.

Key words: reactive oxygen species (ROS), active nitrogen species (ANS), DCF fluorescence, yeast cells, chemiluminescence (CHL).