

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА 1- АНИЛИНОНАФТАЛИН-8- СУЛЬФОНАТА С КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

г. Баку, Азербайджан

*e-mail: natella.kocharli@gmail.com, sam\_bio@mail.ru*

**Аннотация.** Исследовали действие ионов тяжелых металлов  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  в концентрациях  $10^{-4}$  М до  $10^{-2}$  М на кинетические параметры миллисекундной замедленной эмиссии света (мсек ЗЭС) 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) в клетках дрожжей. Показано, что ионы  $Zn^{+2}$  при концентрациях  $10^{-4}$  М и  $10^{-3}$  М несколько стимулируют интенсивность мсек-ЗЭС АНС, но ионы  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ , приводят к уменьшению интенсивности излучения при всех исследованных концентрациях. Установлено, что при воздействии указанными ионами тяжелых металлов на клетки дрожжей увеличивается количество МДА. Анализ индукционных кривых мсекЗЭС АНС в клетках дрожжей и определение количества МДА дает основание полагать, что изменение интенсивности мсек-ЗЭС связано со структурными изменениями клеточной мембраны.

**Ключевые слова:** клетки дрожжей, мсек-замедленная эмиссия света, 1-анилинонафталин-8- сульфонат

**INTERACTION OF FLUORESCENT PROBE OF ANILINONAF TALIN-8-SULFONATE AGAINST YEAST CELLS UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS.**

Kocharli N.K., Hummatova S.T.

Baku State University

Baku, Azerbaijan

*e-mail: natella.kocharli@gmail.com, sam\_bio@mail.ru*

**Abstract.** The influence of heavy metals  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  in  $10^{-4}$  M to  $10^{-4}$  M concentrations on kinetic parameters of millisecond delayed light emission (msec –DLE) 1-anilino naphthalin-8-sulfonate (ANS) in yeast cells has been studied. It was presented that, Zn ions in  $10^{-4}$  M and  $10^{-3}$  M concentrations a little stimulate msec-DLE ANS intensity, but the ions  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  lead to the decrease of irradiation intensity in all studied concentrations. It was identified that, during the exposure of shown ions in heavy metals on yeast cells the MDA amount increases. The analyses of induced curves of msec-DLE ANS in yeast cells and the determination of MDA amount gives the basis to suppose, that the intensity changes of msec- DLE is due to the structural changes of cellular membranes.

**Key words:** yeast cells, msec-delayed light emission, 1-anilinnaphthalin-8-sulfonate.

Тяжелые металлы относятся к токсичным техногенным загрязнениям: уже в концентрации  $10^{-5}$  М они оказывают отрицательное воздействие на живые организмы. Связывание тяжелых металлов с клеточной стенкой происходит при помощи белков, силикатов, карбоксильных групп уоновых кислот слизи, сахаров, фенолов и др. [1-7].

К внутриклеточным механизмам устойчивости относят синтез ферментов, ослабляющих токсические эффекты или же слабо чувствительных к воздействию тяжелых металлов. Известно, что при повышенных концентрациях ионов тяжелых металлов происходит образование в клетках активных форм кислорода, в ответ на окислительный стресс увеличивается синтез таких ферментов, как нитратредуктаза, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа [8]. Полагают, что наличие ионов некоторых металлов приводит к увеличению перекисного окисления липидов на поверхности мембран, вызывая первичные повреждения и остановку роста.

В настоящее время особое внимание заслуживает исследование взаимодействия ионов (металлов) тяжелых металлов с мембранами в живой клетки и для решения этой проблемы из основных методов является метод флуоресцентных зондов.

В представленной работе приводятся результаты изучения влияния ионов тяжелых металлов на кинетические параметры мсек-замедленной эмиссии света (мсек-ЗЭС) вызванной взаимодействием 1-анилинонафталин-8- сульфоната (АНС) с клетками дрожжей.

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii*-U-916. Опыты проводили с суспензией 3-х дневной культуры ( $1 \times 10^8$  кл/мл). В работе была использована фотометрическая установка позволяющая регистрировать мсек-ЗЭС. Культуру дрожжей выращивали на сусло-агаре (4 балл). Опыты проводили с суспензией 3-х дневной культуры ( $1 \times 10^8$  кл/мл). В работе была использована фотометрическая установка позволяющая регистрировать мсек-ЗЭС.

В суспензию клеток добавляли растворы тяжелых металлов (хлориды  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ) в конечных концентрациях от  $10^{-4}$  М до  $10^{-2}$  М. Полученные образцы инкубировали 60 минут при комнатной температуре, затем клетки промывали и вводили водный раствор АНС в концентрации  $10^{-6}$  М. Затем образцы суспензии помещались в измерительную кювету фотометрической установки, и производилась регистрация свечения. О скорости перекисного окисления липидов судили по накоплению одного из продуктов окисления малонового диальдегида (МДА) [5].

В ходе работы было выявлено увеличение интенсивности мсек-ЗЭС АНС ионами  $Zn^{2+}$  (при концентрациях  $10^{-4}$  М и  $10^{-3}$  М) по сравнению с контролем. При концентрации  $10^{-2}$  М не было отмечено изменений для  $ZnCl_2$

(см. рис. 1). Установлено, что если  $Zn^{2+}$  несколько стимулирует мсек-ЗЭС АНС, то ионы  $Pb^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  приводят к уменьшению интенсивности излучения при всех исследованных концентрациях (см. рис. 2-3).

Известно, что ионы тяжелых металлов взаимодействуют с компонентами мембраны и цитоплазмы клеток которое может сопровождаться их структурно- функциональными изменениями.

Полученные нами результаты позволяют предположить, что увеличение интенсивности мсек-ЗЭС АНС после воздействия ионов  $Zn^{2+}$  связано с  $ROO'$  радикалами возникающими в результате перекисного окисления липидов мембран клеток дрожжей, которые затем связываются с АНС. Возможно ионы  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ингибируют процесс образования  $ROO'$  и уменьшают их количество.

Уменьшение количества свободных радикалов, несомненно, связано с взаимодействием  $ROO'$  радикалов с ионами этих металлов. При изучении влияния ионов тяжелых металлов на содержание МДА в клетках дрожжей, обнаружено, что воздействие приводит к значительному увеличению количества МДА. Наибольшая концентрация МДА обнаруживалось при воздействии ионов цинка  $Zn^{+2}$  20,6 н моль/г и  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  соответственно 14,5 и 16,5 нмоль/г. Следовательно, действие тяжелых металлов определяется как прямым, так и косвенным воздействием.

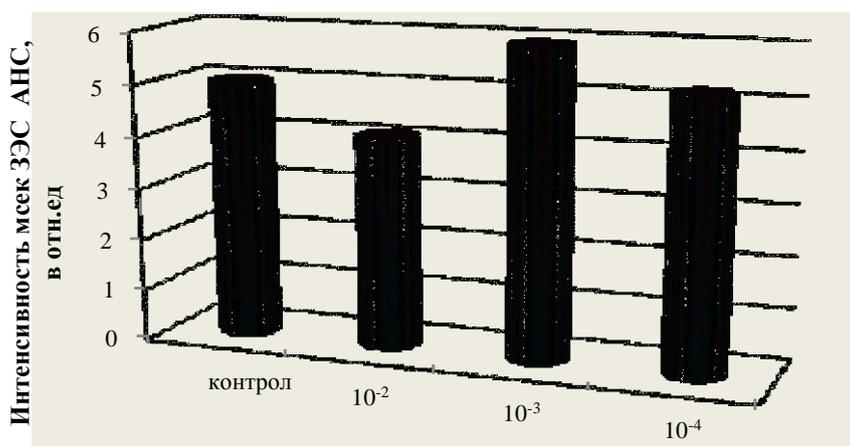


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей *S.guilliermondii* от концентрации ионов  $Zn^{+2}$  (время воздействия 60 мин.)

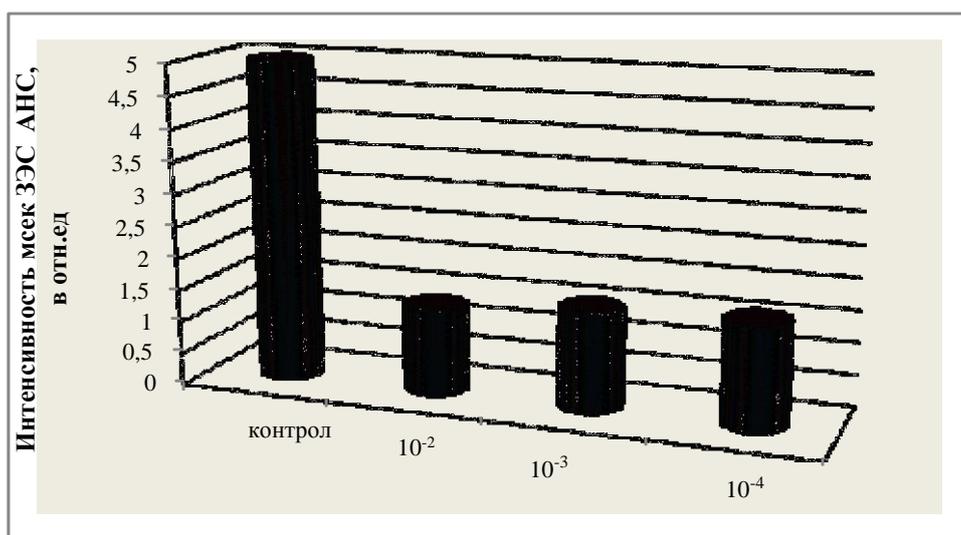


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей *S.guilliermondii* от концентрации ионов  $Pb^{+2}$  (время воздействия 60 мин.)

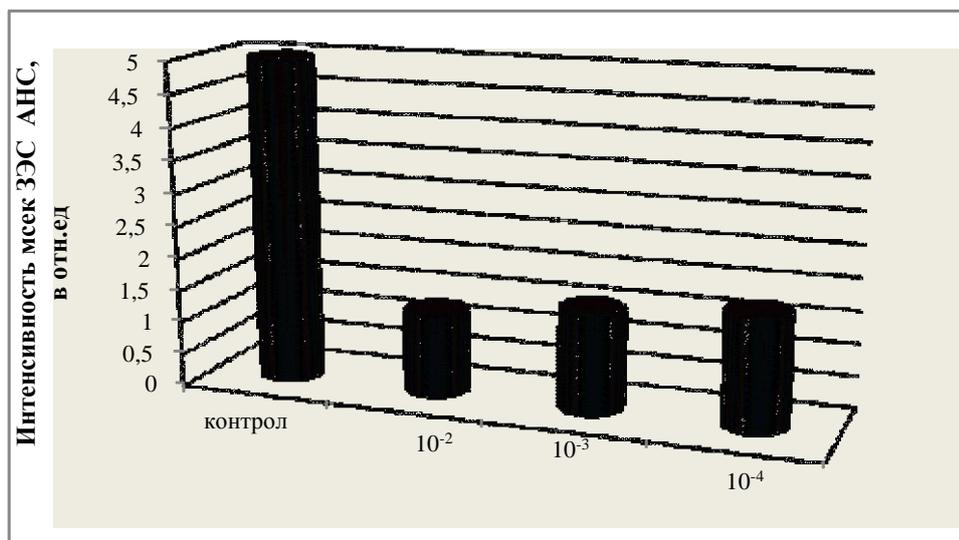


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности мсек-3ЭС АНС в клетках дрожжей *S. guilliermondii* от концентрации ионов Cd<sup>2+</sup> (время воздействия 60 мин.)

На основании исследования сделан вывод о том, что изменения мсек-3ЭС флуоресцентного зонда АНС введенного в клетки дрожжей после воздействия ионов тяжелых металлов, связано со структурными изменениями клеточной мембраны.

#### Список литературы / References:

1. Колодяжения Я.С., Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенез как способ увеличения устойчивости растений к повышенным концентрациям тяжелых металлов. *Успехи современной биологии*, 2006, т. 126, № 5, с. 456-461. [Kolodyajena Y.S., Kochetov A.V., Shumny V.K. Transgenesis is as the method of increase of the plant tolerance to the enhanced concentration of heavy metals. *The success of modern biology*, 2006, vol. 126, no. 5, pp. 456-461. (In Russ.)]
2. Олексюк О.Б., Слобожанина Е.И. Молекулярно-мембранные механизмы действия низких концентраций свинца. Ксенобиотики и живые системы. *Материалы II Международной научной конференции*. Минск, БГУ, 2003, с. 225-229. [Olecsuc O.B., Slobojanina E.I. Molecular-membrane mechanisms of low concentration influence of plumbum. Xenobiotics and lively system. *The materials of II International scientific conference*. Minsk, 2003, pp. 225-229. (In Russ.)]
3. Петрова Т.А., Ховрычев М.П., Голубович В.Н., Работнова И.М. Математическая модель ингибирования роста *S. utilis* ионами тяжелых металлов. *Микробиология*, 1976, № 2, с. 224. [Petrova T.A., Khovrichchev M.P., Qolubovich V.N., Rabotnova I.M. The mathematic model of inhibition of *S. utilis* growth by ions of heavy metals. *Microbiology*, 1976, no. 2, p. 224. (In Russ.)]
4. Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения. *Физиология растений*, 2006, т. 53, № 2, с. 285-308. [Seregin I.V., Kojevnikova A.D. The physiological role of nickel and its toxic influence on higher plants. *Physiology of plants*, 2006, vol. 53, no. 2, pp. 285-308. (In Russ.)]
5. Стальная И.Д., Горишвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*, 1977, с. 66-68. [Stalnaya I.D., Qorishvili T.Q. The method of determination of malondialdehyde with the help of thiobarbituric acid. *The modern methods in biochemistry*, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]
6. Трахтенберг И.М., Шафран Л.М. *Общая токсикология*. М.: Медицина, 2002, 175 с. [Trakhtenberg I.M., Shafran L.M. *The general toxicology*. M.: Medicine, 2002, 175 p. (In Russ.)]
7. Трусевич М.О. Изучение гемолиза эритроцитов под воздействием тяжелых металлов. Экология человека и проблемы окружающей среды в постчернобыльский период. *Материалы республиканской научной конференции*. Минск, Рес. Беларусь, 2009, с. 72-73. [Trucevich M.O. The investigation of erythrocyte hemolysis under the influence of heavy metals. The ecology of humans and problems of environment during postchernobylski period. *The materials of scientific republic conference*. Minsk, Belarusse, 2009, pp. 72-73. (In Russ.)]
8. Чиркова Т.В. *Физиологические основы устойчивости растений*. СПб.: Изд-во СПб университета, 2002, 244 с. [Chirkova T.V. *Physiological bases of plant tolerance*. SPB: Pub.SPb university, 2002, 244 p. (In Russ.)]