

ВЛИЯНИЕ УФ-В- ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА МС-ЗЭС В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Н.К. Кочарли^{1*}, С.Т. Гумматова¹

¹Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

THE INFLUENCE OF UF-B IRRADIATION AND TEMPERATURE ON MS-DLE IN CELL YEAST

N.K. Kocharli, S.T. Hummatova (Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. Показано, что в процессе облучения, а клеток *Candida guilliermondii* У-916 ультрафиолетовых лучей (УФ-В) происходит изменение параметров индукционной кривой миллисекундной замедленной эмиссии света (мс-ЗЭС) акридинового оранжевого (АО) в зависимости от дозы и времени выдерживания их после облучения. Существенное влияния на мс-ЗЭС АО в клетках оказывает изменение температуры. Установлено, что с ростом дозы УФ-В лучей в мембранах клеток происходит увеличение концентрации малонового диальдегид (МДА) что свидетельствует о развитии процесса перекисное окисление липидов (ПОЛ). На основании полученных данных предполагается, что снижение содержания МДА при совместном действии этих факторов, очевидно, связано с эффектом защиты УФ-В излучением. По-видимому, УФ-В индуцирует усиление механизмов, защищающих клеточные структуры от окислительного повреждения, вызванного нагреванием.

Abstract. It has been shown that during the irradiation of *Candida guilliermondii* U-916 cells by ultraviolet rays (UV-B) occur changes of parameters of an induction curve ms-DLE AO depending on a dose and time of their survival after irradiation. A significant effect on ms-DLE AO in cells renders temperature change. It was established that by increasing UV-B dose in cell membranes happens the increase of MDA concentration which indicates the development of LPO process. Based on the data obtained, it is supposed that the decrease in the MDA content under the combined influence of these factors, obviously related to the effect of protection from UV-B irradiation. Apparently, UV-B induces the enhancement of mechanisms, protecting cellular structure from oxidative damage caused by heating.

Ключевые слова: клетки дрожжей, мс-ЗЭС, флуоресцентные зонды, АО.

Keywords: yeast cells, ms-DLE, fluorescent probes, AO.

***Нателла Кочарли**, к.б.н., Кафедра биофизики и молекулярной биологии, Бакинский Государственный Университет, ул. З. Халилова, 23, Баку, Азербайджан
e-mail: natella.kocharli@gmail.com

Поступила в редакцию: 13 Октября 2017

1. 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 устранимых (или устранимых не полностью) репаративными системами клетки, а также фото- деструкция белков и биомембран обуславливают развитие довольно многочисленных биологических эффектов [5, 8, 14].

При повреждающем действии высокой температуры на клетку имеют место следующие явления: первичное повреждение, т.е. изменение клеточных компонентов, непосредственно вызванное нагреванием: деструктивное последствие – совокупность нарушений, вторично развившихся в звеньях клеточного хозяйства, прямо или косвенно зависящих от первичного очага повреждения: реактивное повышение стабильности клеточных компонентов в ответ на нагрев-адаптация: репарация повреждения, которая может осуществляться не только после окончания нагрева, но и вовремя его [13].

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 [2-3]. Флуоресцентным зондом называется молекулярная конструкция, которая изменяет один из параметров флуоресценции (интенсивность, время жизни, максимум спектра флуоресценции), когда связывается со своей мишенью. Флуоресцентные зонды являются удобным инструментом для визуализации и квантификации распределения химических веществ, например сигнальных молекул в клетках [1, 4, 7, 9-10].

2. Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. В работе была использована фотометрическая установка позволяющая регистрировать мс-ЗЭС [12]. В установке был применен фосфороскоп.

Источником УФ – излучения служила ртутная лампа СВД-120. Облучение проводили дозой $0,7 \times 10^4 - 4,5 \times 10^4$ эрг/мм². Контролем служила суспензия необлученных клеток.

Клетки дрожжей подвергали воздействию температуры (20 – 60⁰С, 1-2 мин) и облучали УФ-В светом $0,7 \times 10^4 - 4,5 \times 10^4$ эрг/мм², либо сначала облучали, затем выдерживали в условиях теплового шока (40⁰С, 1-2 мин). О скорости перекисного фотоокисления липидов в мембранах судили по накоплению одного из продуктов окисления малонового диальдегида (МДА), концентрацию которого определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК «Sigma») измеряя оптическую плотность комплекса МДА-ТБК в максимуме спектра его поглощения при 532 нм ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [11].

Точность методов анализа колебалась в пределах 0,2-0,08. Повторность опытов изменялась от 3 до 5 результаты экспериментов подвергались статической

обработке. Были рассчитаны средние величины и стандартные отклонения от средних величин.

3. Результаты и обсуждение

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

Установлено, что в течение 1-2 минут после включения возбуждающего света мс-ЗЭС клеток с АО практически не регистрируется, затем наблюдается очень быстрое нарастание интенсивности мс-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 [6].

При проведении кинетических измерений большое значение имеет концентрация красителя. Индукционная кривая мс-ЗЭС имеет S-образную форму, но наблюдается отсутствие пика (рис-1).

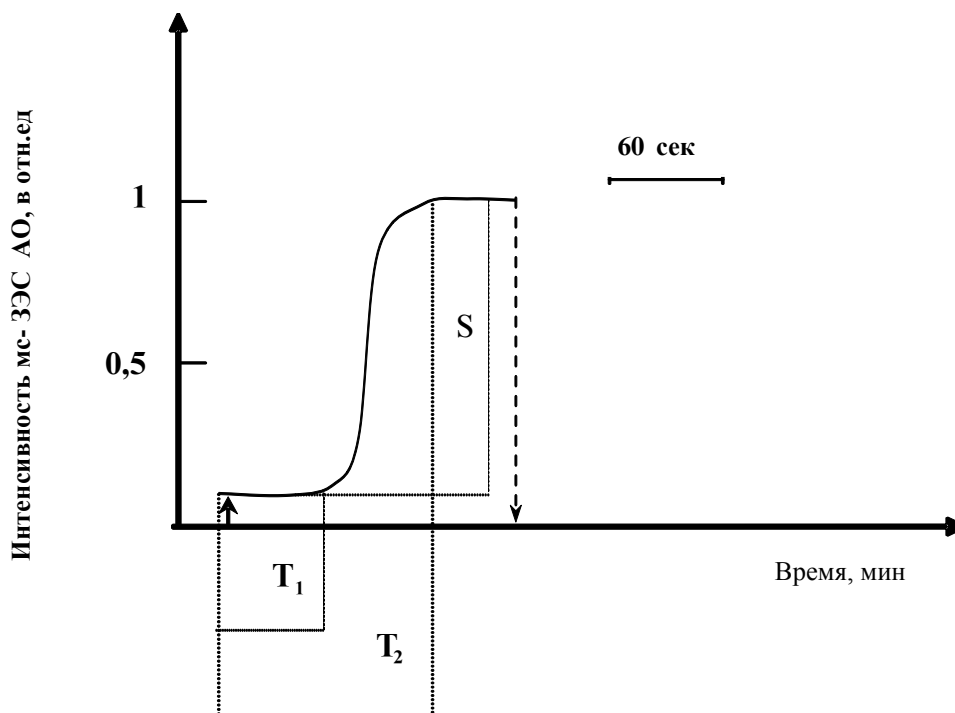


Рис.1. Интенсивности мс-ЗЭС АО в клетках дрожжей

При малой концентрации ($<10^{-5}M$) регистрируемое свечение имеет низкую интенсивность. мс-ЗЭС АО обнаруживается даже при очень низкой концентрации ($10^{-9}M-10^{-8}M$) акридина оранжевого. В условиях, постоянной плотности клеток (10^8 кл/мл) при увеличении концентрации АО, стационарное положение кинетических показателей мс-ЗЭС также увеличиваются и при $10^{-5}M$, достигает

максимального значения. Необходимо отметить, что при более высокой концентрации АО (10^{-4} М) интенсивность мс-ЗЭС снижается.

При плотности клеточной суспензии 10^8 кл/мл и концентрации АО 10^{-5} М, мс-ЗЭС достигает максимального значения. Время возникновения мс-ЗЭС изменяется в зависимости от концентрации АО (10^{-9} - 10^{-4} М). В ходе эксперимента было выяснено, что при низкой концентрации АО (10^{-9} - 10^{-6} М) у возникшей мс-ЗЭС продолжительность этапа T_1 -начало появления мс-ЗЭС (длительность латентного периода) составляет 3 минуты. При более высокой концентрации АО (10^{-6} М, 10^{-5} М) продолжительность этапа T_1 составляет 2 минуты. При плотности клеточной суспензии дрожжей 10^6 кл/мл длительность латентного периода мс-ЗЭС составляет 5 минут, а при плотности клеточной суспензии 10^7 кл/мл время возникновения мс-ЗЭС АО уменьшается (3 минуты). Однако, как указывалось выше, индукционная кривая при концентрации АО 10^{-5} М и плотности клеточной суспензии 10^8 кл/мл мс-ЗЭС АО достигает своего максимума и продолжительность этапа T_1 составляет 2 минуты. Известно, что мономерная форма акридинового оранжевого существующая в сильно разбавленных растворах, характеризуется следующими оптическими свойствами максимум 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 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. Уже при концентрации красителя $5 \cdot 10^{-3}$ М в клетках дрожжей наблюдается почти полное исчезновение максимума возбуждения флуоресценции мономеров. Зависимость мс-ЗЭС клеток дрожжей *Candida guilliermondii* Y-916 от концентрации акридина оранжевого показывает, что концентрация АО является одним из факторов, определяющих мс-ЗЭС клеток дрожжей. На рисунке 2 и 3 представлены данные характеризующие изменение параметров индукционной кривой мс-ЗЭС АО в клетках дрожжей в зависимости от времени выдерживания их после облучения. Из приведенных данных видно, что стационарный уровень индукционных кривых возрастает в зависимости от дозы УФ -В лучей и времени выдерживания их после облучения. Так, например, при малых дозах УФ-В лучей ($1,5 \cdot 10^4$ - $3,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) стационарный уровень индукционных кривых возрастает в 6 раз по сравнению с контролем после 24 часового выдерживания облученных клеток (рис.2).

При облучении клеток большими дозами УФ-В лучей ($3 \cdot 10^4$ - $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) стационарный уровень индукционных кривых возрастает в 5 раз, при выдерживания клеток после облучения, в течении 6 ч. После 24 часового выдерживания клеток этот уровень несколько уменьшается, но значительно повышается стационарный уровень индукционных кривой мс-ЗЭС АО наблюдаемой у контрольных клеток. При $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм² облучении клеток стационарный уровень на индукционных кривых не возрастает. Определение начало появления мс-ЗЭС АО и времени достижения стационарного уровня на индукционных кривых показало, что изменение этих параметров мс-ЗЭС АО

зависит о дозы УФ-В лучей и времени выдерживания клеток после облучения. С увеличением дозы УФ-В лучей и времени выдерживания клеток после облучения удлиняется время появления мс-ЗЭС АО и время достижения стационарного уровня.

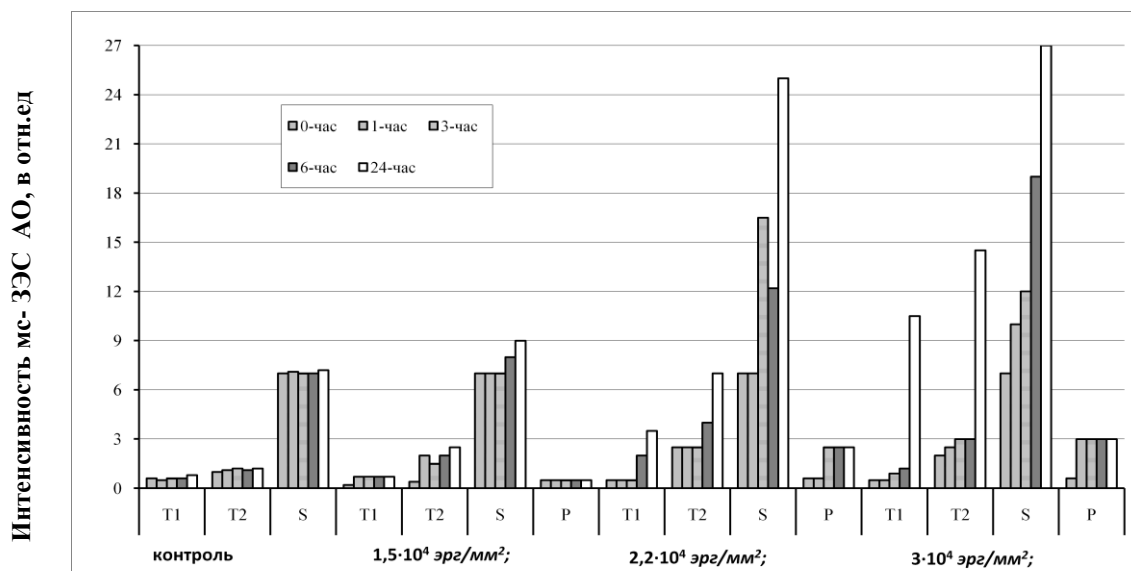


Рис.2. Зависимость показателей мс-ЗЭС АО в клетках от дозы УФ -В -излучения при различном времени выдерживания после облучения

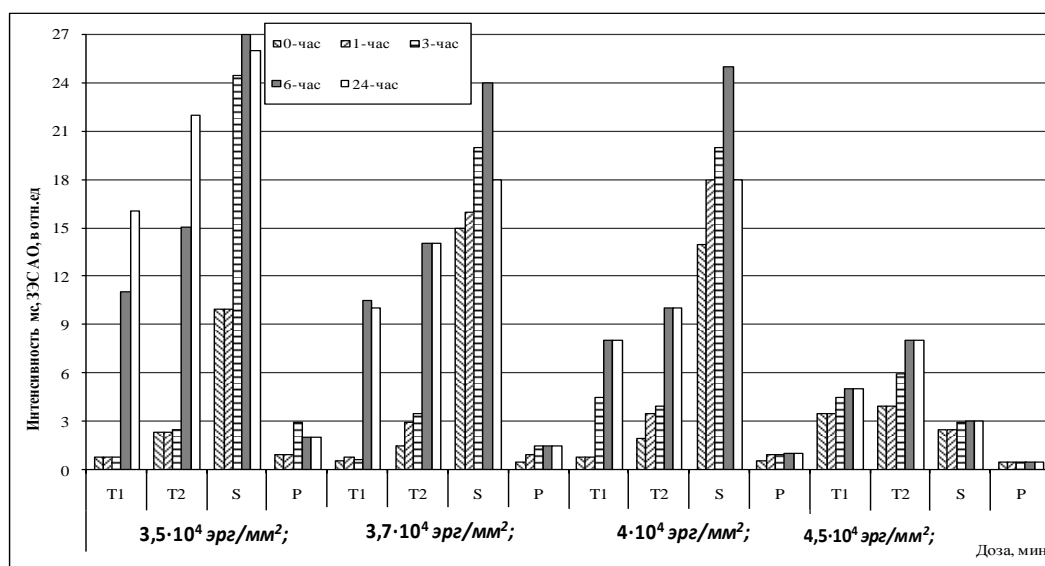


Рис.3. Зависимость показателей мс-ЗЭС АО в клетках от дозы УФ- В лучей при различном времени выдерживания после облучения

Увеличение времени появления и времени достижения стационарного уровня у клеток облученных большими дозами ($3,7-4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) наблюдается не сразу после их облучения.

Как было нами показано, индукционная кривая мс-ЗЭС АО в клетках облученных УФ светом имеет пик. При тех дозах УФ-В ($1,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) когда стационарный уровень индукционной кривой резко возрастает и имеет максимальное значение, то высота пика также увеличивается.

Концентрация АО оказалось существенным фактором, определяющим его свечение в клетке. Интересно отметить, что свечение начинает регистрироваться при очень низких концентрациях АО (менее чем 10^{-8} М). С увеличением концентрации красителя выход свечения возрастает и при концентрации 10^{-5} М достигает максимального значения. При более высоких концентрациях красителя (выше 10^{-4} М) выход свечения резко подавляется. Это закономерность наблюдается и при УФ-В облучении клеток.

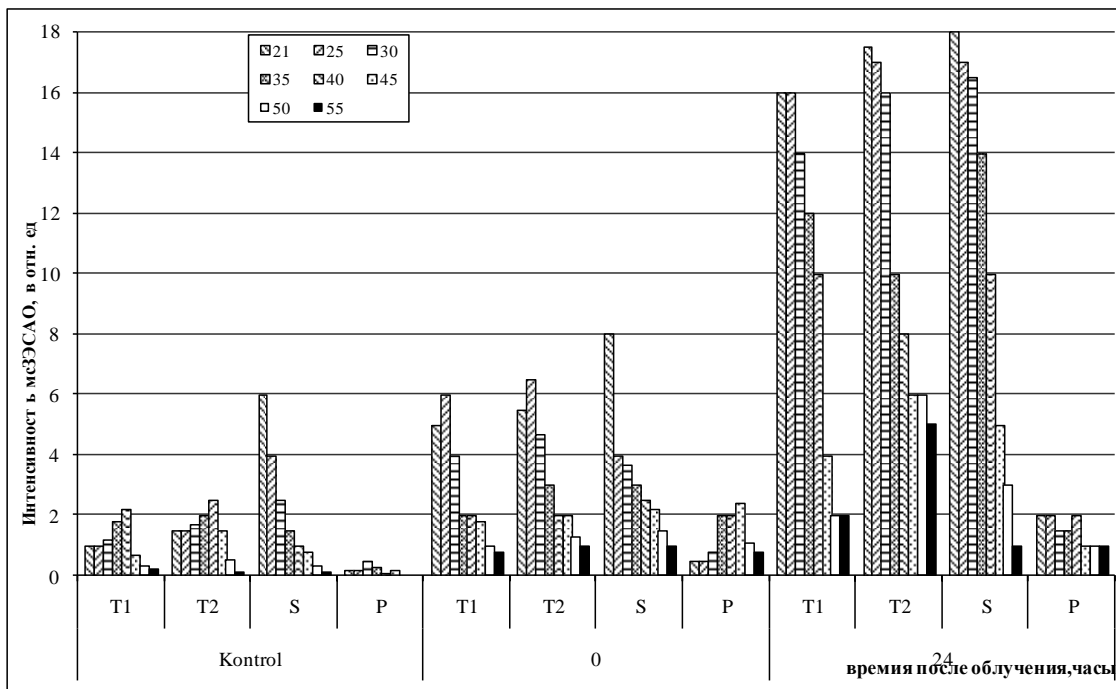


Рис.4. Зависимость показателей мс-ЗЭС АО в клетках от температуры

В зависимости от концентрации АО изменяются параметры индукционных кривых мс-ЗЭС АО. В УФ-В -облученных клетках с повышением концентрации АО, удлиняется время появления мс-ЗЭС АО и время достижения стационарного уровня, максимальная высота пика в этих клетках наблюдается при концентрации АО 10^{-5} М. Существенное влияние на мс-ЗЭС АО в клетках оказывает изменение температуры.

Результаты опытов показали, что в зависимости от температуры изменяется форма индукционных кривых мс-ЗЭС АО в необлученных и клетках подвергнутых воздействию УФ-света (рис.4).

Известно, что при пероксидации липидов наблюдается изменение состава жирных кислот мембраны или уменьшение их количества. В результате чего нарушается проницаемость клеточной мембраны.

УФ-В излучение подвергает модификации клеточные мембраны изменяя проницаемость мембран и мембранных транспортных систем: ненасыщенные жирные кислоты легко окисляются в перекисные соединения.

Последствия повреждений компонентов мембран, вызванных УФ-В излучением довольно значительны, что на современном этапе вызывает необходимость более глубокого изучения влияния УФ-В излучения на процессы ПОЛ биомембран.

Именно на уровне дрожжевой клетки вопросы связанные с регуляцией ПОЛ наименее изучены по сравнению с другими организмами, в то время как клеточные регуляторные механизмы у микроорганизмов играют существенно большую роль и проявляются более отчетливо чем у других биологических систем. Комбинированное влияние различных факторов на процессы пероксидации липидов изучено недостаточно.

В настоящей работе изучено влияние УФ-В излучения и температуры на процессе ПОЛ в клетках дрожжей.

С ростом дозы УФ-В лучей ($0,7 \cdot 10^4$ - $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) в мембранах клеток происходит увеличение концентрации МДА, что свидетельствует о развитии процесса ПОЛ. При УФ-В облучении клеток дозой $3,0 \cdot 10^4$ эрг/мм², концентрация МДА была наибольшей, которая превышала контрольные значения в 2 раза. При дозе УФ-В $3,7 \cdot 10^4$ - $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм² количество МДА понижалось до уровня контроля и ниже.

При изучении влияния температуры на содержание МДА в клетках дрожжей, обнаружено, что воздействие температурой 40⁰С приводит к значительному увеличению содержания МДА. Наибольшая концентрация МДА обнаруживалось при режиме воздействия 40⁰С в течение 5 минут. После инкубации клеток в течение 10 минут при температуре 40⁰С содержания МДА понижалось до уровня контроля.

Было исследовано совместное действие УФ- В излучения и температуры на клетки дрожжей. Установлено, что при последовательном действии 40⁰С (1, 2 мин.) и УФ-В ($1,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) облучения на клетки дрожжей количество МДА уменьшается по сравнению с клетками обработанными только температурой. Таким образом, можно заключить, что снижение содержания МДА при совместном действии этих факторов, очевидно, связано с эффектом защиты УФ-В излучением. По-видимому, УФ-В индуцирует усиление механизмов, защищающих клеточные структуры от окислительного повреждения, вызванного нагреванием. Тепловой стресс либо изменяет структуру мембран клеток дрожжей таким образом, что она становится более устойчивой к действию процесса ПОЛ, либо влияет на функциональное состояние клетки и активизирует ее защитные системы. 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. Гипертермия

приводит к значительным изменениям в метаболизме, что сопровождается увеличением образования в них АФК и, как следствие повреждением клеточных структур, одним из показателей, которых является активация реакции ПОЛ.

Литература

1. Averchenko, E.A., Kavokm, N.S., Stepanenko, A.M., Borovoi, I.A., Maliukina, M.Yu. (2009). Evaluation of the mitochondrial potential of isolated hepatocytes with a change in the oxidative status. *Biophysical Bulletin*, 22(1), 49-56. (In Russian).
2. Chatterjee, S., Kumar, G.S. (2016). 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.*, 159, 169-178. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.045. Epub 2016 Apr 3.
3. Dobretsov, G.E. (1989). *Fluorescent Probes in Studies of Cells, Membranes and Lipoproteins*, Moscow, Nauka, 276 p. (In Russian).
DOI:10.1016/j.copbio.2007.01.003
DOI:10.3390/molecules171214067.
4. Drummen, G.P.C. (2012). Fluorescent probes and fluorescence (Microscopy) techniques - illuminating biological and biomedical research. *Molecules*, 17, 14067-14090.
5. Eskov, V.M. (2002). Influence of UV irradiation in the presence of AO on free radical oxidation in yeast cells. *Bulletin of New Medical Technologies*, 3, 15-17. (In Russian).
6. Gummatova, S.T., Kocharli, N.K. (2014). *Fluorescent Probes in the Study of the Effect of Modifiers on Cells*. Lap Lambert Academic Publishing, 148 p. (In Russian).
7. Johnson, I. (1998). Fluorescent probes for living cells. *The Histochemical Journal*, 30(3), 123-140. DOI:10.1023/a:1003287101868.
8. Kuznetsov, V.V., Dmitrieva, G.A. (2006). *Plant Physiology*, Moscow, Higher School, 742 p. (In Russian).
9. O'Haver, T.C. (1978). Development of luminescence spectrometry as an analytical tool. *Journal of Chemical Education*, 55(7), 423-428. DOI:10.1021/ed055p423.
10. Rao, J., Dragulescu-Andrasi, A., Yao, H. (2007). Fluorescence imaging in vivo: recent advances, *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 17-25.
11. Stalnaya I.D. (1977). Method for determination of diene conjugations of unsaturated fatty acids. *In book.Modern Methods in Biology*, Moscow, Medicine, 178 p. (In Russian).
12. Tarusov, B.N., Veselovskii, V.A. (1978). *Superweak Luminescence of Plants and Their Application Value*. Moscow, Moscow State University, 150 p. (In Russian).
13. Timperio, A.M., Egidi, M.G., Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses, Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71, 391-411.
14. Zlatev, Z.S., Lidon, F.J., Kaimakanova, M. (2012). Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), 481. <http://www.ejfa.info/>