

УДК 535.372

ВЛИЯНИЕ 2-4-ДИНИТРОФЕНОЛА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ МСЕК-ЗЭС АКРИДИНОВОГО ОРАНЖЕВОГО В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ**Гумматова С.Т., Кочарли Н.К., Абдуллаев Х.Д., Зейналова Н.М.***Бакинский государственный университет, Баку, e-mail: sam_bio@mail.ru*

Показано что введение акридинового оранжевого (АО) в живые клетки дрожжей способствует возникновению в них возбуждаемой светом msec-замедленной эмиссии света (msec-ЗЭС). На основании исследования изменения (msec-ЗЭС) msec-ЗЭС АО, введенного в клетки дрожжей предварительно инкубированных с 2-4-динитрофенолом (ДНФ) сделан вывод о том, что концентрации ДНФ, которые приводят к снижению интенсивности msec-ЗЭС АО, соответствуют концентрациям ДНФ как разобщителя окислительного фосфорилирования клетки. Регистрация msec-ЗЭС АО в клетках может служить биофизическим методом для оценки реакции клеток на внешние воздействия.

Ключевые слова: клетки дрожжей, msec ЗЭС, разобщитель окислительного фосфорилирования, акридиновый оранжевый

EFFECT OF 2-4-DINITROPHENOL ON INTENSITY OF MSEC DLE OF ACRIDINE ORANGE IN THE YEAST CELLS**Hummatova S.T., Kocharli N.K., Abdullayev K.D., Zeynalova N.M.***Baku State University, Baku, e-mail: sam_bio@mail.ru*

An introduction of acridine orange (AO) into living yeast cells promote in them a light induced msec delayed light emission (msec DLE) was shown. On the base of investigation of changes (msec DLE) of msec DLEAO, introduced to yeast cells preliminary incubated with 2-4 dinitrophenol (DNP) the conclusion is made that a concentrations of DNP lowering the intensity of msec-DLEAO are corresponding to that of DNP as uncoupler of oxidative phosphorylation of cell. The registration of msec DLEAO in the cells may be a biophysical method for evaluation of cells response on environmental influences.

Keywords: yeast cells, msec DLE, uncoupler of oxidative phosphorylation, acridine orange

Флуоресценция некоторых синтетических красителей широко используется в качестве оптических зондов для изучения механизма самых различных клеточных процессов. Ранее проведенные нами исследования показали возможность индуцирования в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ-У-916, не содержащих хлорофилла, при помощи введения в них красителя акридинового оранжевого (АО).

Выявлено, что msec-ЗЭС возникает только при проникновении АО в клетку в результате взаимодействия с клеточными и мембранными компонентами, вероятно, белками, липопротеинами и нуклеиновыми кислотами [1–10]. Сделан вывод о том, что msec-ЗЭС АО может быть использована для изучения влияния биогенных и абиогенных факторов среды на биологические системы [6].

Можно предположить, что исследование этого явления позволит выявить новые экспериментальные пути для изучения внутриклеточных процессов.

Согласно определению флуоресцентными зондами являются молекулы, которые обратимо (нековалентно) связываются с биоструктурами и из параметров флуоресценции можно извлечь определенную информацию о структурно-функциональном состоянии биообъекта [3–5]. Полихроматические флуоресцентные зонды-ионы могут быть информативны для изучения из-

менений в живых клетках при действии ксенобиотиков [12].

Эффект воздействия заряженного ксенобиотика на живую клетку зависит не только от его исходной химической структуры, но и от исходного физиологического состояния самой клетки [12].

В начале 1960 годов некоторыми авторами изучено влияние ДНФ на микроорганизмы. Показано, что при концентрации $6 \cdot 10^{-5}$ М ДНФ разобщает окислительное фосфорилирование на 80% в клетках *E.coli*.

В клетках других микроорганизмов ДНФ при концентрации $6 \cdot 10^{-4}$ М угнетал окисление на 50%. При pH $7 \cdot 10^{-3}$ М ДНФ разобщает окислительное фосфорилирование в препарате *A. vineladi* на 30%, а при pH 6 на 98%. Кроме того, показано, что клетки *M.phlei* очень чувствительны к действию разобщителей и концентрация ДНФ $8 \cdot 10^{-5}$ М разобщает окислительное фосфорилирование на 79% [7].

Известно, что, внедряясь в мембрану, клетки ионы ксенобиотиков могут изменить ее характеристики: поверхностный заряд, проницаемость, трансмембранный потенциал. Эти изменения должны отразиться на средстве заряженных зондов к мембране и на скорости их диффузии в клетку [5]. Классическим разобщителем окислительного фосфорилирования и дыхания является

ДНФ [13]. В работах Скулачева В.Н. показано, что степень разобщающего эффекта ДНФ (ксенобиотика анионного типа) в изолированных митохондриях зависит от соотношения в среде его ионизированной и неионизированной форм [14]. Как известно, снижение потенциала на мембранах митохондрий разобщителем окислительного фосфорилирования ДНФ при концентрациях в среде не выше 0,1 мМ обусловлено увеличением протонной проницаемости митохондриальных мембран [14].

Морозовой Г.И. показано, что добавление в среду 1 Мм ДНФ вызывает полное тушение флуоресценции ДСМ в митохондриях лимфоцитов. Эффект 1 Мм ДНФ, вероятно, связан с неспецифическим повреждением клеточных мембран [12].

Разобщающее действие ДНФ показано также на *Saccharomyces cerevisiae*. Наблюдался выход из клеток K^+ , уменьшение мембранного потенциала и снижение уровня АТФ (до 80%) [17].

Мусаевым Н.А. изучены возможные механизмы модификации транспортных свойств плазматической мембраны клеток *Nitellopsis* разобщителями окислительного фосфорилирования. Наиболее эффективные концентрации 2,4-динитрофенола находились в диапазоне $10^{-5} \dots 5 \cdot 10^{-4}$ М [11].

Падалко В.И. с соавторами было показано, что «мягкое» применение определенных концентраций протонофора может увеличивать продолжительность жизни мышей, дрожжей и мух [15, 18].

В настоящей работе исследовано влияние 2,4-динитрофенола (ДНФ)-ксенобиотика анионного типа на интенсивность мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Культуру дрожжей выращивали на сусло-агаре (4 Балл). Опыты проводили со свежеприготовленной суспензией 3-х суточной культуры.

В работе использована фотометрическая установка, позволяющая регистрировать мсек-ЗЭС. В установке был применен фосфороскоп. Интервал между моментами освещения и регистрации свечения образца, расположенного во внутреннем цилиндре фосфороскопа, составлял 3,3 мкс. Объект освещали галогеновой лампой накаливания 300 Вт, с воздушным охлаждением.

В работе использовали АО, производства фирмы «Sigma».

Опыты проводили следующим образом: в суспензию клеток с плотностью $1 \cdot 10^8$ М кл/мл вводился водный раствор красителя в концентрации 10^{-5} М. Затем образцы суспензии в объеме 5 мл помещались в термостатируемую измерительную кювету фотометрической установки и производились измерения свечения.

Конечные концентрации 2,4-динитрофенола в суспензии клеток дрожжей готовили в концентрации $10^{-7} \dots 10^{-3}$ М.

Инкубацию живых клеток с ксенобиотиками производили в течение 30 минут при температуре 20 °С. После обработки ДНФ клетки осаждали центрифугированием и готовили суспензию в фосфатном буфере.

Результаты исследования и их обсуждение

При освещении суспензии клеток дрожжей, предварительно обработанных красителем АО, возникает мсек ЗЭС. На рис. 1. представлена кривая, характеризующая мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей. Мсек-ЗЭС АО зависит от концентрации АО, температуры и рН среды, имея максимальный выход при концентрации АО 10^{-5} М, в физиологической зоне температур 20–25 °С и рН-7. Кроме того, полученная кривая имеет насыщение при плотности клеток 10^8 клеток на мл.

Установлено, что мсек-ЗЭС АО в клетке связано лишь с интактным состоянием клеток. Так, например при кратковременном кипячении суспензии клеток полностью снимает возбуждение мсек-ЗЭС.

По мнению ряда авторов, флуоресцентные зонды типа ДАС ПМИ, АНС, АО и др. имеют довольно простую структуру молекулы и связываются с мембранами главным образом благодаря гидрофобному взаимодействию, модулированному более слабым электростатическим взаимодействием [3–4].

Поэтому очевидно, что такие зонды не могут обладать высокой специфичностью: они связываются с разными мембранами, иногда с белками цитоплазмы и с хроматином ядра [4, 5, 8].

На основании ранее полученных нами и литературных данных показано, что мсек-ЗЭС возникает в результате взаимодействия с клеточными и мембранными компонентами, вероятно, белками, липопротеинами и нуклеиновыми кислотами [1, 2, 6, 10, 16].

Изучалось влияние ДНФ на клетки дрожжей на основании исследования изменения мсек ЗЭС флуоресцентного зонда акридинового оранжевого, введенного в клетки. На рис. 2. Показана зависимость интенсивности мсек-ЗЭС АО от концентрации ДНФ.

Как видно из рис. 2, при концентрации ДНФ 10^{-7} М интенсивность мсек-ЗЭС АО существенно не изменяется по сравнению с контролем. По мере увеличения концентрации ксенобиотика ($5 \cdot 10^{-6} \dots 10^{-5}$ М) интенсивность мсек-ЗЭС АО уменьшается. Добавление в суспензию клеток ДНФ в концентрации 10^{-4} М вызывает полное тушение свечения АО.

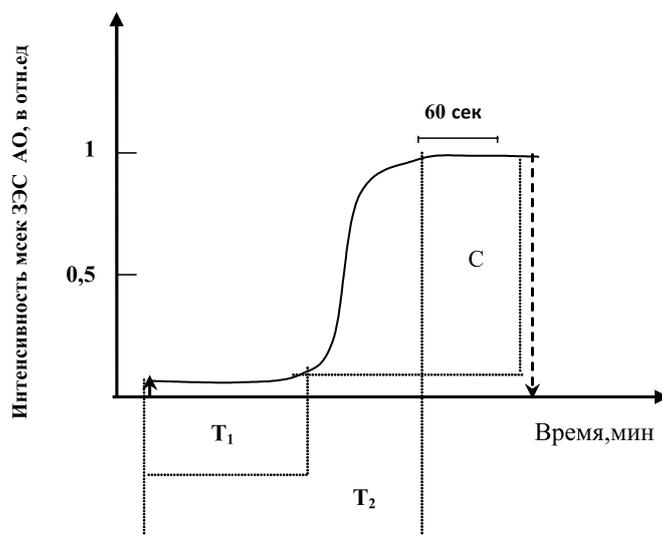


Рис. 1. Кинетика мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей. Плотность клеток в суспензии 108 кл на мл, концентрация АО 10–5 М, температура 25 °С. Стрелками указаны моменты включения и выключения возбуждающего света. Т1 – начало появления мсек ЗЭС; Т2 – время достижения стационарного уровня; S – высота стационарного уровня

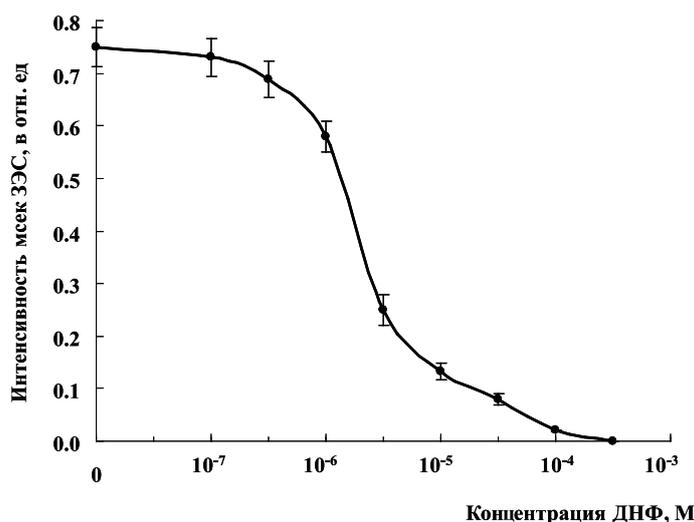


Рис. 2. Зависимость интенсивности мсек-ЗЭС АО в клетке от концентрации ДНФ. Остальные условия те же, что на рис. 1. Инкубация клеток с ДНФ 30 минут

Как было показано ранее, оптимальной для выхода мсекЗЭС АО является нейтральная среда (рН–7,0). При кислых и щелочных средах интенсивность свечения падает [6].

В настоящей работе нами также изучено влияние ДНФ на интенсивность мсекЗЭС АО в зависимости от рН среды (рис. 3).

Известно, что ДНФ является слабой кислотой. Для слабых кислот характерно относительно высокая степень диссоциации в нейтральных или близких к ним средах. При низком рН диссоциация снижается. Тем самым при рН 7–6 для ионов ДНФ, имеющих электрический заряд, значительно больше, чем при рН 4–3. Вместе с тем проницаемость клеточной оболочки

для ионов значительно ниже, чем для нейтральных молекул. Следовательно, вероятность входа молекул ДНФ в клетку выше при низких значениях рН, чем при нейтральных [9].

Как видно из рис. 3, в клетках инкубированных ДНФ при рН 4–6 интенсивность мсекЗЭС АО значительно ниже, чем в контрольных клетках, не обработанных ДНФ, но находящихся в течение 30 минут при рН 4–6. В клетках дрожжей инкубированных ДНФ при рН 8–9 интенсивность мсекЗЭС АО выше, чем при рН4 и рН5. Очевидно значительное снижение интенсивности мсекЗЭС АО в клетках дрожжей при низком рН обусловлено в основном ДНФ.

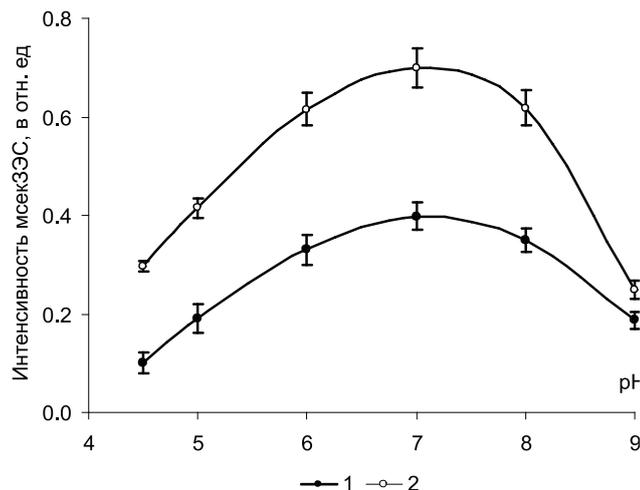


Рис. 3. Зависимость интенсивности мсек-ЗЭС АО в клетке от pH, остальные условия те же, что на рис. 1:

1 – контроль; 2 – клетки, инкубированные ДНФ концентрацией 10–5 М в течение 30 минут

Из представленных данных следует, что при предварительном инкубировании клеток с ДНФ, концентрации которых приводят к снижению интенсивности мсек-ЗЭС АО, соответствуют концентрациям ДНФ как разобщителя окислительного фосфолирования клетки.

На основании полученных данных, можно заключить, что возбуждение мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей наблюдается в живых клетках и этот процесс очень чувствителен к факторам, действующим на интактное состояние клеток. Регистрация мсек-ЗЭС АО в клетках может служить биофизическим методом для оценки реакции клеток на внешние воздействия, свойств, а также для определения различных соединений как разобщителей окислительного фосфолирования.

Список литературы

1. Исследование влияния на клетки дрожжей амфотерицина в и его аналогов флуоресцентным зондом / Х.Д. Абдуллаев, С.Т. Гумматова, Н.К. Кочарли, Э.К. Алекберли: труды II Международной научной конференции «Ксенобиотики и живые системы». – 2003. – С. 29–32.
2. Абдуллаев Х.Д. Биофизические аспекты устойчивости клеточных систем к стрессовым факторам (на основе исследования спонтанной и индуцированной люминесценции): автореф. дис. ... д-ра. – Баку, 2008. – 45 с.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды оптические свойства и взаимодействие с мембранами // Итоги науки и техники. Биофизика. – М.: ВИНТИ, 1979. – т II. – С. 101–188.
4. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды, в исследовании клеток мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 274 с.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
6. Гумматова С.Т. Исследование влияния мембранных модификаторов на клетки дрожжей методом флуоресцентных зондов: автореф. дис. ... канд. – Баку, 2005. – 21 с.
7. Гельман Н.С., Лукоянова М.А. Островский Д.Н. Дыхательный аппарат бактерий. – М.: Наука, 1966. – 200 с.
8. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978. – 208 с.

9. Каложин В.А. Влияние экологически значимых факторов на биокинетические показатели микроорганизмов: автореф. дис. ... д-ра. – Томск, 2010. – 51 с.

10. Мамедов Т.Г., Кочарли Н.К. О замедленной флуоресценции акридинового оранжевого в клетках дрожжей // Вестник БГУ. – 1992. – №1. – С. 18–24.

11. Мусаев Н.А. Исследование влияния температуры и физиологически активных веществ на электрохимические характеристики растительных клеток. – 1980. – 215 с.

12. Морозова Г.И. Флуоресцентные зонды для исследования взаимодействия ксенобиотиков ионов с мембранами живых клеток. – Купавна, 1985. – 289 с.

13. Николе Д.Д. Биоэнергетика. Введение в хемосмотическую теорию: пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 190 с.

14. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах. – М.: Наука, 1972. – 203 с.

15. Падалко В.И., Леонова И.С., Козиова Е.В. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте // Успехи геронтологии. – 2010. – Т. 23, № 1. – С. 98–103.

16. Abdullayev K.D., Kocharli N.K., Gummatova S.T. Influence of ultra-violet beams and free radicals on the slowed down fluorescence acridin orange in cells of yeast. 4th International Conference on Biological Physics July 30-August 3, 2001, Kyoto International Conference Hall. – Kyoto, Japan. – P. 61.

17. Uptake of the lipophilic cation dibenzyl dimethylammonium (DDA) in to *Saccharomyces cerevisiae*. Interaction with the thiamine transport system. *Biochimica et biophysica acta* 597 / P.W. Barts, Y.A. Hoeberechts, J.A.A. Klassen, G.W.F.H. Borst-Pauwels. – 1980. – С. 125–136.

18. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increase life span in *Saccharomyces cerevisiae*/M.H. Barros, B. Bandy, E.B. Tahara, A.J. Kowaltowski // J. biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 49883–49888.

Рецензенты:

Курбанова И.М., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории биофизики Института ботаники НАН Азербайджана, г. Баку;

Джафаров Э.С., д.б.н., руководитель лаборатории «Радиобиологии» Института радиационных проблем НАН Азербайджана, г. Баку.

Работа поступила в редакцию 18.10.2011.