

*Олександра Абрам, Ольга Маркович, Любов Лозаза*  
**ВПЛИВ АЛОКСАНУ ТА ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ НА ВИЖИВАННЯ  
ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

### Вступ

Живі організми в процесі розвитку зазнають впливу багатьох несприятливих чинників, дія яких може супроводжуватись порушенням рівноваги в про- і антиоксидантній системах. Як наслідок – активується вільнорадикальне окислення і розвивається оксидативний стрес. Останній є неспецифічною універсальною реакцією, спрямованою на захист клітини від пошкоджуючої дії активованих форм кисню (АФК) та адаптацію метаболізму, відновлення гомеостазу і виживання [3, 9]. Механізм розвитку оксидативного стресу і формування реакції-відповіді залежать від природи пошкоджуючого агента.

Відомо, що алоксан є сильним діабетогенним чинником, точний механізм цитотоксичної дії якого не повністю зрозумілий. Вважають, що цитотоксичний ефект алоксану реалізується через утворення АФК, зокрема супероксид-аніону ( $O_2^-$ ) [7]. На основі попередніх досліджень, проведених у нашій лабораторії на бактеріях *Escherichia coli*, висунуто припущення, що алоксан у процесі метаболічних перетворень здатний генерувати також і  $H_2O_2$  [5]. У зв'язку з цим, метою даної роботи було порівняти вплив алоксану і пероксиду водню на дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Для реалізації мети були поставлені наступні завдання: 1) оцінити виживання дріжджових клітин при дії  $H_2O_2$  та алоксану різних концентрацій; 2) дослідити часову динаміку впливу даних реагентів.

### Матеріали і методи

В роботі використовували штам *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (*MATa trp1-A1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade-101 ura3-52*), який був люб'язно наданий доктором Yoshiharu Inoue з Кіотського університету, Японія.

Дріжджі вирощували на пивному суслі. Пічну культуру вирощували протягом 36 год при температурі 28°C. Для дослідження відповідний об'єм нічної культури розводили стерильним середовищем такого ж складу у співвідношенні 1:50.

Для вивчення впливу алоксану та пероксиду водню використовували культуру дріжджів, яка знаходилася в експоненційній фазі росту. Оксидативний стрес викликали інкубацією клітин з 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0 мМ  $H_2O_2$  протягом 45 хвилин та з 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 1,50 мМ алоксаном протягом 60 хвилин (тут і всюди вказано кінцеві концентрації). Виживання оцінювали як відношення кількості клітин після обробки алоксаном і пероксидом водню до кількості клітин в контрольній пробі (без алоксану і пероксиду). Для підрахунку кількості клітин використовували метод серійних розведень [2]. Робоче розведення становило 5000 разів. Для оцінки результатів досліджень

носів дріжджів здійснювали на тверде живильне середовище сусло-агар (2% агару) з наступною їх інкубацією при температурі 28°C протягом 48 годин.

Для дослідження часової динаміки стрес викликали обробкою дріжджів 1,0 мМ алоксаном та 1,5 мМ  $H_2O_2$  протягом 15, 30, 60 та 120 хвилин. Для контролю клітини інкубували протягом того самого часу, за тих самих умов, без алоксану та перексиду водню.

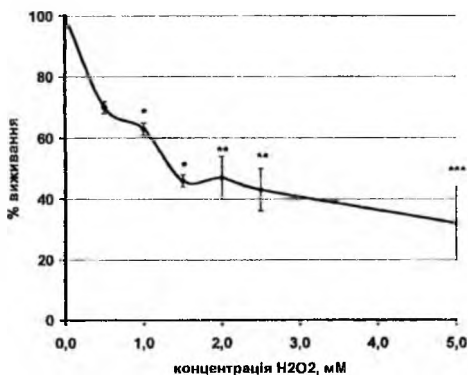
Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "Mynova" [10].

### Результати та обговорення

На рис.1 представлений результат впливу перексиду водню різних концентрацій на виживання *S. cerevisiae*. Виявлено, що навіть невеликі концентрації  $H_2O_2$  знижують виживання клітин дріжджів. Так, дія 0,5; 1,0; 1,5 мМ перексиду водню достовірно зменшувала кількість колонієутворюючих одиниць відповідно в 1,4; 1,6 та 2,2 рази. При дії 5,0 мМ  $H_2O_2$  виживання знижувалось приблизно в 3 рази.

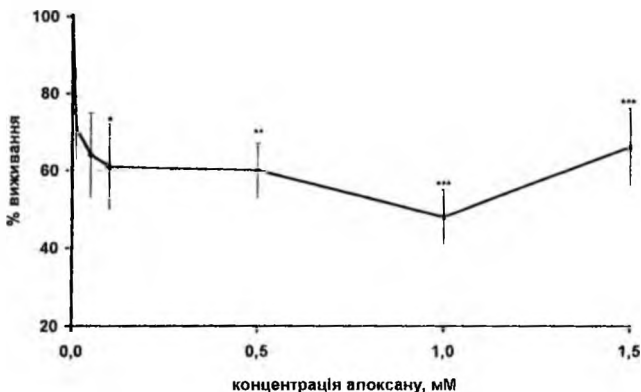
Відомо, що у дріжджів є два ізоферменти каталази – каталаза А, яка локалізується у пероксисомах, і каталаза Т, яка функціонує в цитозолі. Остання чутлива до дії екзогенного  $H_2O_2$  [4, 8]. Окрім того, відомо, що пероксисоми майже відсутні у дріжджів, які використовують глюкозу як джерело вуглецю та енергії. Отже, у вибраних нами умовах за знешкодження перексиду водню відповідає, в основному, цитозольна каталаза.

Виживання дріжджів за дії алоксану різних концентрацій показано на рис. 2. З нього видно, що 1,0 мМ алоксан достовірно знижував кількість колонієутворюючих одиниць до 46% у *S. cerevisiae*, тоді як 1,0 мМ  $H_2O_2$  – до 63%.



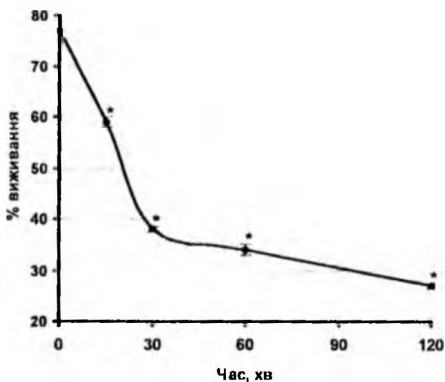
\*Достовірно відмінне від відповідного контрольного значення,  $P < 0,001$ ;  
\*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,05$ , ( $n = 4$ ).

**Рис. 1.** Вплив  $H_2O_2$  різних концентрацій на виживання дріжджів, інкубованих з перексидом водню протягом 45 хв.



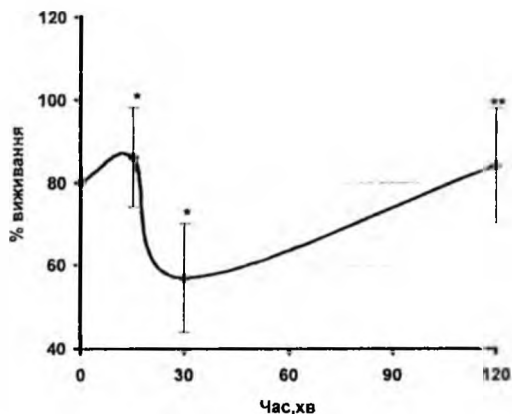
\*Достовірно відмінне від відповідного контрольного значення,  $P < 0,025$ ,  
\*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,001$ , (n= 6-10).

**Рис.2.** Вплив алоксану різних концентрацій на виживання дріжджів, інкубованих з алоксаном протягом 60 хвилин.



\*Достовірно відмінне від відповідного контрольного значення,  $P < 0,001$ , (n= 4).

**Рис.3.** Вплив 1,5 мМ  $H_2O_2$  на виживання дріжджів, інкубованих з  $H_2O_2$  протягом різного часу.



\*Достовірно відмінне від відповідного контрольного значення,  $P < 0,001$ ;  
\*\* $P < 0,05$ , ( $n = 4-6$ ).

**Рис. 4.** Вплив 1,0 мМ алоксану на виживання дріжджів, інкубованих з алоксаном протягом різного часу.

Ці результати узгоджуються з даними літератури про цитотоксичний вплив алоксану [1, 7]. На сьогоднішній день запропоновано кілька гіпотез щодо його цитотоксичності: 1 – як редокс-активна сполука він легко спричинює окислення SH-груп; 2 – призводить до збільшення проникності мембран; 3 – алоксан здатний вивільняти іони заліза з залізовмісних білків, що може бути причиною зростання інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів і білків [7]. Окрім того, нами було показано, що в клітинах *E. coli* після обробки їх алоксаном зростає каталазна активність [5]. Отже, цитотоксичний ефект алоксану пов'язують, в першу чергу, з його здатністю генерувати АФК.

В попередніх дослідженнях, де вивчався вплив 0,5 мМ алоксану на *E. coli* штаму MC4100, виявлено, що останній не тільки не зменшує виживання клітин бактерій, а, навпаки, стимулює його [5]. Це може вказувати на різницю у механізмах захисту від алоксанового стресу у про- і еукаріотичних організмів. Не виключено, що зниження виживання *S. cerevisiae* під дією алоксану та індукція ним загибелі  $\beta$ -клітин підшлункової залози можуть здійснюватися за спільним механізмом.

Криві виживання *S. cerevisiae* в залежності від часу дії перексиду водню і алоксану продемонстровані відповідно на рис. 3 та 4. З рисунків видно, що за перші 30 хвилин 1,5 мМ перексид водню знижує виживання клітин *S. cerevisiae* в 2,9 рази, тоді як 1,0 мМ алоксан лише в 1,8 рази. Із збільшенням часу дії перексиду водню до 120 хвилин виживання клітин зменшується до 27%, а 120-хвилинне інкубування *S. cerevisiae* з алоксаном призводить до поступового відновлення виживання з 57 до 84%. Це свідчить про те, що найбільший вплив

на клітини алоксан чинить у перші 30 хвилин. Останнє можна пояснити тим, що алоксан досить нестабільний і за фізіологічних умов швидко детоксифікується [1].

В той же час обробка клітин *E.coli* алоксаном практично не впливала на виживання мікроорганізмів дикого типу [5]. Ймовірно, відмінність результатів впливу алоксану на виживання клітин дріжджів і кишкової палички є наслідком того, що прокаріотичні організми здатні швидше адаптуватись до стресу, порівняно з еукаріотичними.

### Висновки

В роботі вивчався вплив алоксану і перексиду водню на виживання клітин *S.cerevisiae*. Встановлено, що як алоксан, так і  $H_2O_2$  знижують виживання клітин дріжджів. Алоксан є більш цитотоксичний для дріжджових клітин порівняно з перексидом водню. 1,0 мМ алоксан знижує виживання клітин *S.cerevisiae* до 46%, тоді як 1,0 мМ  $H_2O_2$  – до 63%. Проте, будучи нестабільним у розчинах, алоксан найбільший вплив чинить тільки у перші 30 хвилин, при цьому негативний вплив  $H_2O_2$  спостерігається навіть до 120 хвилин.

### Подяки

Автори висловлюють подяку Галіні Семчишин та Володимирі Лушаку за керівництво роботою та критичні зауваження щодо написання статті.

1. Баранов В.Г. Экспериментальный сахарный диабет: роль в клинической диабетологии. – Л.: Наука, 1983.
2. Мейнел Э. Экспериментальная микробиология (теория и практика). – М.: Мир, 1967. – 347 с.
3. Семчишин Г.М., Лушак В.І. Оксидативний стрес і регуляція активності каталази у *Escherichia coli* // Укр біохім. журн. – 2004. – Т. 76. – №2. – С. 31-42.
4. Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода. – в кн. Свободные радикалы в биологии / под ред У. Проюра. – Т.І. – М.: Мир, 1979. – 318 с.
5. Abrat O., Demyanchuk Yu., Semchyshyn H. Adaptive response of *E.coli* to alloxan exposure // First Ukrainian Congres for Cell Biology. – Lviv, 2004. – P. 64.
6. Costa V., Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *S.cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases // Mol. Asp. Med. – 2002. – Vol. 22. – P. 217-246.
7. Hong Zhang, M.D. Alloxan toxicity to macrophages and insulinoma cells – Ulnitryck, Linkoping, 1995. – P.129.
8. Izawa S., Inoue Y., Kimura A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *S.cerevisiae* // Biochem. J. – 1996. – Vol. 320. – P. 66-67.
9. Lushchak V.I. (2002) *Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels*, Eds. P. Johnson, A. Boldyrev, Research Signpost. – P. 45-65.
10. Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A., Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // Am. J. Physiol. – 2001. – Vol.280. – P. R100-R107.

*It has been studied time – and dose-dependent effect of alloxan and hydrogen peroxide on yeast Saccharomyces cerevisiae survival. Alloxan demonstrates stronger cytotoxicity than hydrogen peroxide. S. cerevisiae survival was decreased to 46% in response to 10 mM alloxan exposure and to 63% as a result of cells treatment with 10 mM  $H_2O_2$ .*