

2. Beyer W., Imlay J., Fridovich I. Superoxide dismutases // Prog. Nucl. Acid Res. – 1991. – Vol.40. – P.221-253.
3. Fridovich T. An overview of oxyradicals in medical biology // Advances in molecular and cellular biology. – 1998. – Vol.25. – P.1-14.
4. Halliwell, B., Gutteridge, I. M.C. Free radicals in biology and medicine // Clarendon Press, UK, 1989.
5. Imlay, J. A., Linn, S. Mutagenesis and stress responses induced in *Echerichia coli* by hydrogen peroxide // J.Bacteriol. – 1987. – Vol.169 – P.2967-2976.
6. Storz G., Tartaglia L.A., Ames B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation // Science. – 1990 – Vol.248. – P.189-194.
7. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия – 2001 – С.592-609.
8. Семчишин Г.М. Активність ферментів *SoxRS* та *OxyR* регулонів *E.coli* за дії оксидативного стресу // Укр. біохім. журнал. – 2002. – Т.46. – С.167-168.

Yuriy Demyanchuk, Olexandra Abrat

EFFECT OF DIFFERENT OXYGEN LEVELS ON THE GROWTH OF *ESHERICHIA COLI* STRAINS MC4100, GS071 AND GS047

Effect of oxygen on the growth of *Esherichia coli* different strains was investigated. It was shown that *E. coli* MC4100, GS071 and GS047 are various in their sensitivity to oxygen levels in cultivation medium. *E. coli* GS071 demonstrated longer lag-phase than MC4100 and GS047. Thus, *SoxRS* regulon is responsible for adaptation of *E. coli* on high oxygen level.

*Дмитро Господарьов, Сергій Мандрик,
Уляна Русин, Лариса Паньків*

ВПЛИВ ІОНІВ ЗАЛІЗА НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ І АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Кисень є важливим елементом у живих системах, зокрема, він відіграє роль кінцевого акцептора електронів у дихальному ланцюгу. Але використання його в клітині має не тільки позитивний характер. У процесі метаболізму можуть утворюватися активовані форми кисню (АФК), такі, як супероксид-аніон, пероксид водню, гідроксильний радикал, підвищення рівня яких у клітині викликає оксидативний стрес [8]. АФК пошкоджують різні компоненти клітини – білки, ліпіди та ДНК. При цьому в клітині накопичуються продукти окисної модифікації даних сполук. Ліпіди окислюються до пероксидів, одним із кінцевих продуктів катаболізму яких є малоновий діальдегід. Ці кінцеві продукти визначаються за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти – ТБКАП) [1].

АФК окислюють також бічні радикали амінокислот у білках, що веде до утворення додаткових карбонільних груп у білках (КБ) [2].

Захист від АФК здійснюється такими ферментами: супероксиддисмутазою (СОД), глутатіонпероксидазою, каталазою, а також ферментами глутатіонового циклу: глутатіонредуктазою (ГР), глутатіон-S-трансферазою, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою (Г6ФДГ) [4; 8].

Метою роботи було дослідження вмісту продуктів вільнорадикального окислення (ТБК-активних продуктів і карбоніл-білків) та активності ферментів антиоксидантного захисту (СОД, каталази, ГР, Г6ФДГ) в залежності від вмісту іонів заліза в культуральному середовищі у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Матеріали і методи

У досліджах використовували три штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – YPH250 (дикий штам, в якого присутні обидві форми каталази: цитозольна каталаза Т і пероксисомальна каталаза А), YTT7 (штам, в якого відсутній ген *CTT1* цитозольної каталази) і YIT2 (відсутній ген *CTA1* пероксисомальної каталази).

Генетична характеристика штамів

YPH250: MATa trp 1-Δ1 his 3-Δ200 lys 2-801 (amber)

leu 2-Δ1 ade 2-101 ura 3-52;

YIT2: MATa his 3-Δ200 lys 2-801 (amber) leu 2-Δ1 ade 2-101 ura 3-52 *CTA1: TRP1*;

YTT 7: MATa trp 1-Δ1 his 3-Δ200 lys 2-801 (amber)
leu 2-Δ1 ade 2-101 *CTT1: : URA3*

Перед експериментом клітини дріжджів вирощували на середовищі YPD (2% глюкози, 2% пептону, 1% дріжджового екстракту). Нічна культура росла протягом 12 годин без аерації. Для дослідів клітини пересівали з нічної культури в 500 мл колбу, в якій об'єм середовища дорівнював 30 мл. Початкова густина суспензії в колбах була 1,5-2,5 млн. кл./мл. Клітини підраховували в лічильній камері Горяєва.

Для дослідів використовували сульфат заліза FeSO₄ (Sigma). Дослідними концентраціями були: 20 мкМ FeSO₄ і 500 мкМ FeSO₄. Всі 3 колби містили 27 мл середовища, 2 мл солі заліза (або дистильованої води в контролі) і 1 мл дріжджової суспензії, яка була взята з нічної культури. Після вирощування дріжджів у середовищі із залізом (24 год), масу клітин відокремлювали від середовища центрифугуванням протягом 5 хв у режимі 10000 g. Промивали 50 мМ калій-фосфатним буфером (КФБ) (рН=7,0), після чого знову центрифугували в попередньому режимі.

Осад ресуспендували в 1,5 мл 50 мМ КФБ (рН=7,0) з кількома кристалами фенілметилсульфонілфторид, інгібітора протеаз. Після ресуспендування загальний об'єм суспензії клітин становив 2 мл, які розливали в епендорфи з охолодженими скляними бусинами. Співвідно-

Д.Господарьов, С.Мандрюк, У.Русин, Л.Паньків. Вплив іонів заліза на показники оксидативного стресу і активність антиоксидантних ферментів у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* шення об'ємів бусин до суспензії становило 1:2. Клітини руйнували на "вортексі" протягом 20 хв (з чергуванням: 1 хв дезинтеграції, 1 хв охолодження в льоді). Суспензію зруйнованих клітин центрифугували в епандорфах на центрифугі К-24 протягом 15 хв у режимі 15000 g. Супернатант використовували для подальших аналізів.

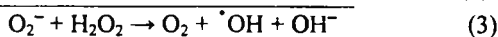
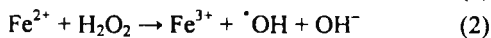
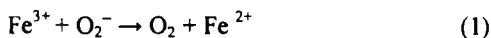
Вміст ТБК-активних продуктів визначений за [1]. КБ визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним [2], а активність антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, ГР, Г6ФДГ) за [3]. Реакційні суміші на вимірювання активностей ферментів мали такий склад: для каталази – 50 мМ КФБ (рН=7,0), 0,5 мМ ЕДТА (етилендіамід-тетраацетат); для ГР – 50 мМ КФБ (рН=7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 25 мМ НАДФН і 1 мМ окисленого глутатіону; для Г6ФДГ – 50 мМ КФБ (рН=7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ НАДФ і 2 мМ глюкозо-6-фосфат. Одна одиниця активності каталази, ГР, Г6ФДГ – це кількість субстрату, виражена в мікромолях, яку перетворює фермент за хвилину в перерахунку на 1 мг білка проби. Для СОД – 30 мМ Тріс-НСІ-буфер (рН=10,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ ТЕМЕД (тетра-етил-метилендіамід) і 0,05 мМ кверцетин. Активність СОД вимірювалася за кривою інгібуванням окислення кверцетину супероксид-аніоном, що генерується ТЕМЕД. За одиницю активності СОД прийнята така кількість проби, яка інгібує реакцію окислення кверцетину наполовину.

Результати та обговорення

У клітинах дріжджів *S. cerevisiae* є дві каталази – цитозольна каталаза Т і пероксисомальна каталаза А. Транскрипція гена *CTT1* каталази Т активується пероксидом водню, пониженням рН середовища, етанолом та іншими факторами [4]. Транскрипція гена *CTA1* каталази А активується додаванням жирних кислот у середовище росту клітин і репресується присутністю глюкози [4].

Клітини *S. cerevisiae* мають дві СОД: Cu, Zn-вмісну СОД і Mn-вмісну СОД. Cu, Zn-вмісна СОД знаходиться у цитоплазмі клітини, ядрі і кодується геном *SOD1*. Mn-вмісна СОД знаходиться у мітохондріях і кодується геном *SOD2* [5]. Серед індукторів транскрипції двох генів *SOD1* і *SOD2* відома підвищена концентрація пероксиду водню [5].

Відомо, що залізо здатне призводити до генерації АФК через серію реакцій Габера–Вейса (1, 2, 3) і Фентона (2).



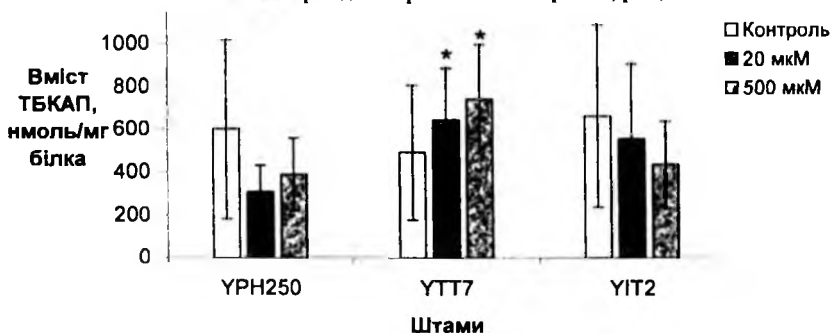
Оскільки додавання екзогенного заліза може сприяти реакції Фентона, то ми поставили за мету у даній роботі вивчити вплив різних концентрацій

заліза на показники оксидативної модифікації ліпідів (ТБКАП) і білків (карбонільні групи білків) та активність деяких антиоксидантних ферментів.

Вміст ТБКАП у трьох досліджених штаммах коливався в межах 492-601 нмоль/мг білка (рис. 1). Залізо по-різному вплинуло на цей показник у різних штамів. У штаммах УРН250 і УТТ2 жодна з використаних концентрацій заліза (20 мкМ і 500 мкМ) не викликала змін у концентрації ТБКАП. Навпаки, у штаму УТТ7 вміст ТБКАП збільшився в 1,3 раза при концентрації заліза 20 мкМ і в 1,5 раза при концентрації заліза 500 мкМ.

Рис. 1 Вміст ТБКАП (нмоль/мг білка) у штаммах *S.cerevisiae* при різних концентраціях заліза (n=3);

* - вірогідно порівняно з контролем, $p < 0,05$.



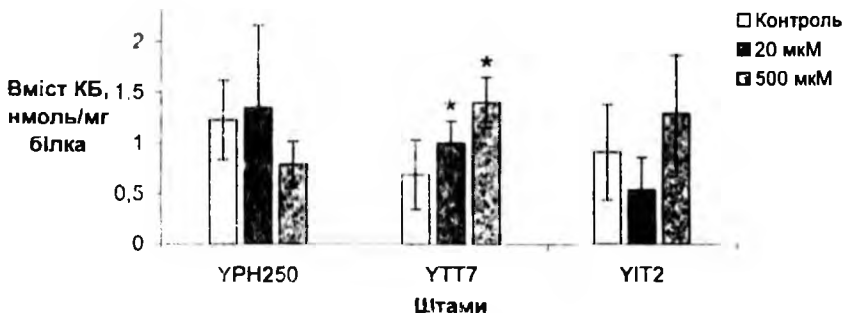
Ці дані свідчать, що, принаймні, один штам – УТТ7 – переживав оксидативний стрес. Оскільки всі три штами є ізогенними, крім генів каталази, можна припустити, що цей штам (УТТ7) не зміг реалізувати антиоксидантну відповідь на стрес як два інші штами, що і призвело до зростання рівня перекисного окислення ліпідів і, як наслідок, вмісту ТБКАП.

Дані щодо вмісту карбонільних груп білків у трьох досліджених штаммах показані на рисунку 2.

Концентрація карбоніл-білків у контролі для трьох штамів приблизно однакова і коливається в межах 0,69-1,23 нмоль/мг білка (рис. 2). Подібно до ТБКАП, зі збільшенням концентрації заліза концентрація карбонільних груп білків зростає у штамі дефектному по цитозольній каталазі (УТТ7): в 1,4 раза при 20 мкМ заліза, в 2,0 рази при 500 мкМ заліза. Це свідчить про розвиток оксидативного стресу під дією екзогенного заліза у цього штаму. Отримані результати підтвердили наші припущення, що відсутність каталази Т відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті.

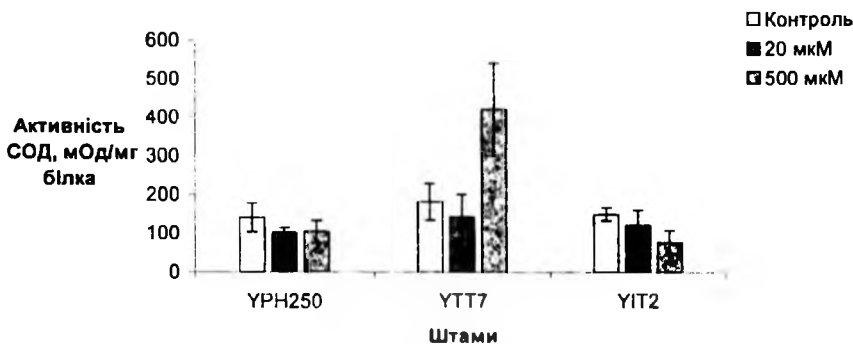
Рис. 2. Вміст КБ (нмоль/мг білка) у штаммах *S.cerevisiae* при різних концентраціях заліза (n=3);

* - вірогідно порівняно з контролем, $p < 0,05$.



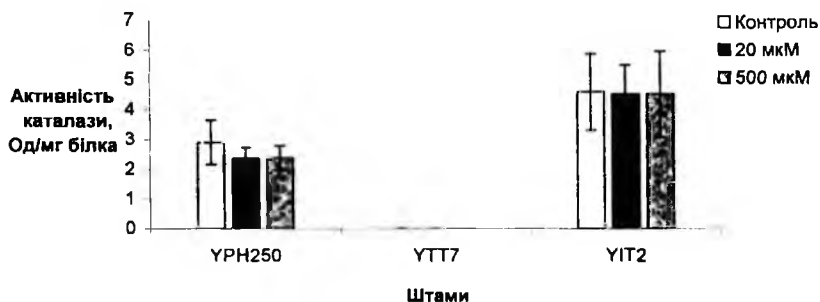
Активність СОД у досліджуваних штаммах коливалась в межах 141-181 нмоль/мг білка (рис. 3). У двох штаммах, YRH250 і YIT2, залізо в досліджених концентраціях не викликало ніяких змін в активності СОД. У штамі YTT7 при концентрації заліза 500 мкМ у середовищі спостерігалось істотне збільшення активності СОД, яке було недостовірним через велику варіабельність даних. Ми припускаємо, що відсутність каталази Т у штамі YTT7 призводить до накопичення пероксиду водню в цитозолі. Підвищення концентрації пероксиду водню активує транскрипцію генів *SOD1* і *SOD2* [5], що і є, на нашу думку, причиною наявної тенденції для цього штаму.

Рис. 3. Активність СОД (мОд/мг білка) у штаммах *S.cerevisiae* при різних концентраціях заліза (n=3).



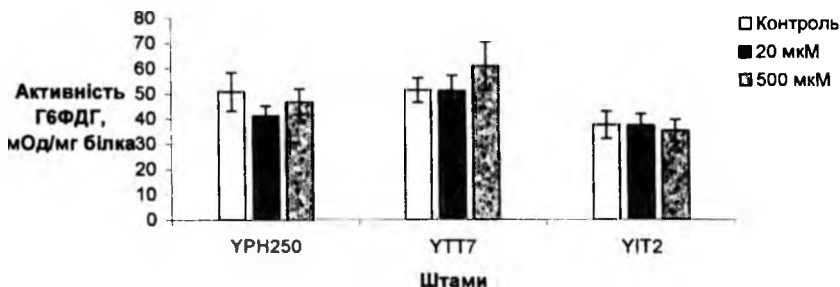
Активність каталази в клітинах дріжджів *S. cerevisiae* за умов росту в середовищі із залізом на експоненційній фазі становить 1,3 Од/мг білка [7]. За цих же умов активність каталази на стаціонарній фазі становить приблизно 32 Од/мг білка [7]. Одержані нами результати при роботі з штамом YTT7, дефектному по цитозольній каталазі, показали, що активність каталази не виявлена. Активність каталази у двох інших штамів складала 2,9-4,5 Од/мг білка (рис. 4). Додавання заліза не змінило активність даного ферменту. На основі отриманих даних можна зробити висновок, що каталазна активність в дикому штамі, за даних умов культивування, забезпечується в основному тільки каталазою Т. Це підтверджено і літературними даними [7].

Рис. 4. Активність каталази (Од/мг білка) в штаммах *S.cerevisiae* при різних концентраціях заліза (n=3).



Активність Г6ФДГ у трьох штамів коливалась у межах 38-52 мОд/мг білка (рис. 5). Екзогенне залізо у досліджуваних концентраціях достовірно не впливало на активність Г6ФДГ у жодного штаму

Рис. 5. Активність Г6ФДГ (мОд/мг білка) у штаммах *S.cerevisiae* при різних концентраціях заліза (n=3).

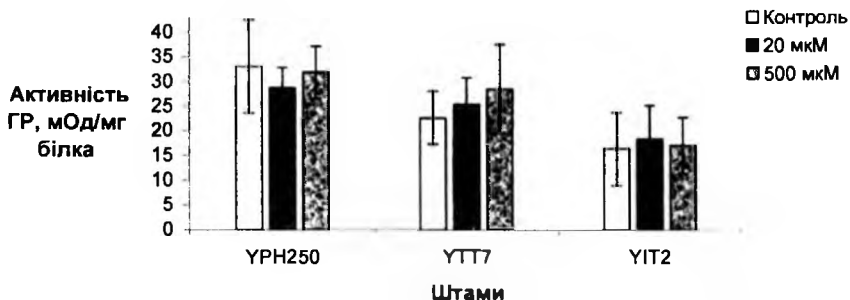


Д.Господарьов, С.Мандрик, У.Русин, Л.Паньків. Вплив іонів заліза на показники оксидативного стресу і активність антиоксидантних ферментів у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Активність ГР за цих же умов росту становить приблизно 20 мОд/мг білка [6]. Активність глутатіонредуктази у трьох штамів коливалась у межах 16-33 мОд/мг білка (рис. 6), що збігається з літературними даними. Активність ГР у контролях достовірно не відрізнялась між різними штамми, але у мутантних штамів є тенденція до її зниження, особливо в штамі YIT2.

Відомо, що ГР є одним із ферментів глутатіонового циклу. Він забезпечує глутатіонпероксидазу відновленням глутатіоном. Г6ФДГ постачає НАДФН для біосинтетичних процесів; крім того, НАДФН використовується глутатіонредуктазою для відновлення окисленого глутатіону.

Рис. 6. Активність ГР (мОд/мг білка) у штаммах *S.cerevisiae* при різних концентраціях заліза (n=3).



У штамі YTT7 проявляється дуже слабка тенденція до збільшення активності СОД, ГР і Г6ФДГ (рис. 3, 5, 6), а також зростання показників оксидативного стресу (рис. 1 і 2) зі збільшенням концентрації сульфату заліза в середовищі. Отже, можна зробити висновок, що клітини дріжджів є більш чутливими до оксидативного стресу. Оскільки в дикому штамі (YRH250) і в мутантному штамі з дефектною пероксисомальною каталазою (YIT2) подібні зміни не спостерігались, то логічно зробити висновок, що цитозольна каталаза має важливе значення в забезпеченні антиоксидантного захисту у дріжджів.

Висновки

1. За умов глибинного культивування при відсутності каталази Т (штам YTT7) додавання екзогенного заліза веде до розвитку оксидативного стресу, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-активних продуктів і карбоніл-білків.

2. За даних експериментальних умов у штаму YTT7 спостерігалась тенденція до зростання активності СОД, що свідчить про активацію антиоксидантних ферментативних систем.
3. За даних умов вирощування клітин дріжджів каталаза Т відіграє більш важливу роль в антиоксидантному захисті клітин, ніж каталаза А. Це підтверджується тим, що штам YTT7 піддається оксидативному стресу зі збільшенням концентрації заліза в середовищі.

Автори статті висловлюють подяку проф. Лушаку В.І. за керівництво роботою і доц. Багнюковій Т.В. за цінні вказівки щодо написання статті.

1. Rice-Evans C.A., Diplock A.N., Symons M.C. R. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology // Elsevier, Amsterdam, 1991. – P.128-137.
2. Lenz A-G., Costabel U., Shatiel S., Levine R. L. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified of proteins by reduction with tritiated sodium borohydride // Anal. Biochem. – 1989. – 177. – P.118-125.
3. Bagnyukova T. V., Storey K. B., Lushchak V. I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation // J. Therm. Biol. – 2003. – 28. – P.21-28.
4. Ruis H., Koller F. Biochemistry, Molecular Biology, and Cell Biology of Yeast and Fungal Catalases // Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P.309-342.
5. Costa V., Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and desiccation // Molecular Aspects in Medicine, 2001. – P.217-246.
6. Yoshiharu I., Toshifumi M., Kei-ich S., Shingo I., Akiva K. Genetic analysis of glutathioneperoxidase in Oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae* // The journal of Biological chemistry. – 1999. – 27, №38. – P.27002-27009.
7. Izava Sh., Inoue Y., Kimura A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide. analysis of catalase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem J. – 1996. – №320. – P.61-67.
8. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine // Clarendon press, Oxford, 1987. – P.146-201.

Dmytro Gospodariov, Sergiy Melnyk, Uliana Rusyn, Larysa Penkiw
THE INFLUENCE OF IRON ON THE INDICES OF OXIDATIVE STRESS AND
ON THE ACTIVITIES OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN YEAST
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

The influence of different concentration of ferrous sulfate on the levels of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) and carbonyl proteins as well as on the activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase in *S. cerevisiae* strains YPH250, YTT7, YIT2 was investigated. Yeast YTT7 deficient on cytosolic catalase T showed the increased TBARS and carbonyl proteins levels and SOD activity. It is concluded that cytosolic catalase is important among antioxidant enzymic defences in yeast.