

УДК: 577.336:582.282.232

## Люминесценция дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces boulardii* под действием озона

В.Д.Зинченко<sup>1</sup>, И.П.Горячая<sup>1</sup>, И.В.Говор<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина);

<sup>2</sup>ГНУ «Институт монокристаллов НАН Украины» (Харьков, Украина)

vd\_zin@mail.ru, irynagor@gmail.com

Исследовали хемилюминесценцию дрожжей *S. cerevisiae* и *S. boulardii* при введении в суспензию клеток озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 5 мг/л. Интенсивность вспышек хемилюминесценции снижается при последовательном введении порций озонированного физиологического раствора вплоть до полного исчезновения люминесценции. Люминесцентный ответ клеток на озон восстанавливается после некоторой выдержки обработанных озоном клеток. Хемилюминесценция наблюдается на интактных клетках и не наблюдается после нагрева клеток до 100°C.

**Ключевые слова:** хемилюминесценция, озон, антиоксидантная защита, оксидативный стресс.

## Люмінесценція дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і *Saccharomyces boulardii* під дією озону

В.Д.Зінченко, І.П.Горяча, І.В.Говор

Досліджена хемілюмінесценція дріжджів *S. cerevisiae* і *S. boulardii* при введенні в суспензію клітин озонованого фізіологічного розчину з концентрацією озону 5 мг/л. Інтенсивність спалахів хемілюмінесценції знижується при послідовному введенні порцій озонованого фізіологічного розчину аж до повного зникнення люмінесценції. Люмінесцентна відповідь клітин на озон відновлюється після деякої витримки оброблених озоном клітин. Хемілюмінесценція спостерігається на інтактних клітинах і не спостерігається після нагрівання клітин до 100°C.

**Ключові слова:** хемілюмінесценція, озон, антиоксидантний захист, оксидативний стрес.

## Luminescence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* yeasts under ozone effect

V.D.Zinchenko, I.P.Goriacha, I.V.Govor

Chemiluminescence of *S. cerevisiae* and *S. boulardii* yeasts when introducing into cell suspension of ozonized physiologic solution with ozone concentration of 5 mg/l is studied. The intensity of chemiluminescence bursts reduces at consequent administration of the portions of ozonized physiologic solution up to complete disappearance of luminescence. Luminescent response of cells to ozone recovers after some maintenance of ozonized cells. Chemiluminescence is observed in intact cells and is not observed after heating the cells up to 100°C.

**Key words:** chemiluminescence, ozone, antioxidant defense, oxidative stress.

### Введение

Окисление озоном органических соединений во многих случаях сопровождается хемилюминесценцией. Явление хемилюминесценции наблюдается при озонлизе фенолов (Туренко, Челибанов, 2004), фуллеренов (Булгаков и др., 2002), diazosоединений (Мухаметзянова и др., 2005), при обработке озоном воды, содержащей органические загрязнители (Воронцов и др., 2011), озон вызывает окисление и люминесценцию люминола в водных растворах (Арджанов и др., 1976). Люминесценция при озонлизе органических веществ, как правило, сопровождает процессы глубокой деструкции молекул (например, раскрытие ароматического кольца).

Особенность взаимодействия озона с живыми системами состоит в том, что реакция живой системы на озон проявляется при его дозах на несколько порядков ниже тех, которые способны вызывать деструкцию органических соединений и гибель клетки. Озон вызывает оксидативный стресс

живых систем, что при определенных условиях приводит к активации процессов метаболизма и изменению в работе про- и антиоксидантных систем (Pryor et al., 2006). Это дает основания ожидать, что данные изменения можно наблюдать методом хемилюминесценции, позволяющим регистрировать излучения фотонов при протекании свободнорадикальных процессов в живой системе (Владимиров, 1966; Владимиров, Потапенко, 2006; Владимиров, Проскурина, 2009). Интерес к данным микроорганизмам вызван тем, что они являются промышленными штаммами, широко применяемыми на практике. Ранее было показано, что при введении в суспензию клеток *S. cerevisiae* озона в определенных низких дозах возрастает скорость деления и роста данных клеток (Буряк, 2008). В данной работе сообщается о результатах наблюдения хемилюминесценции клеток *S. cerevisiae* и *S. boulardii* под действием озона.

### Материалы и методы

С целью получения и обработки информации об интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) исследуемых клеток использовали хемилюминометр (Пат. №72111, 2012) который включает в себя: блок регистрации сигналов ХЛ на базе фотоэлектронного умножителя ФЭУ–106 (область спектральной чувствительности 300–830 нм), блок подачи химических реагентов в исследуемый образец со специально разработанной кюветой (Пат. №73452, 2012), блок управления, в котором используется микропроцессорная обработка сигналов. Для регистрации сигналов использовали персональный компьютер, который подключали к ФЭУ через интерфейс.

Озон получали путем электролиза, пропускавая газообразный кислород через озонатор барьерного типа (Филиппов и др., 2008). Концентрация озона в полученной озono-кислородной смеси составляла 50 мг/л. Озон растворяли в физиологическом растворе путем барботирования озono-кислородной смесью при температуре тающего льда, до достижения концентрации в растворе 5 мг/л. Концентрацию растворенного озона определяли спектрофотометрическим методом на приборе Specord UV VIS по значению экстинкции на полосе Хартли (255 нм) (Лунин и др., 1998). Для получения более низких концентраций растворенного озона исходный раствор разбавляли физиологическим раствором. Люминол квалификации ХЧ производства Шосткинского завода химреактивов (Украина) растворяли в диметилсульфоксиде (ХЧ, Реахим, Россия) в концентрации  $10^{-2}$  моль/л и хранили в холодильнике. Перед началом эксперимента раствор разбавляли калий-фосфатным буфером (15 ммоль/л, pH=8,3) до концентрации  $10^{-6}$  моль/л и вводили в исследуемый образец. Использовали дрожжи *S. cerevisiae* и *S. boulardii*, выращенные на скошенном агаровом геле. Смыв клеток разбавляли дистиллированной водой. Концентрацию клеток в суспензии определяли подсчетом под микроскопом в камере Горяева. Суспензию клеток объемом 0,5–1,5 мл помещали в кювету люминометра и при помощи дозатора порционно добавляли озонированный физиологический раствор, регистрируя возникающее излучение. Перемешивание образца не применяли. Эксперименты проводили при комнатной температуре.

### Результаты и их обсуждение

#### Люминесценция дрожжей *S. cerevisiae* под действием озона без люминола.

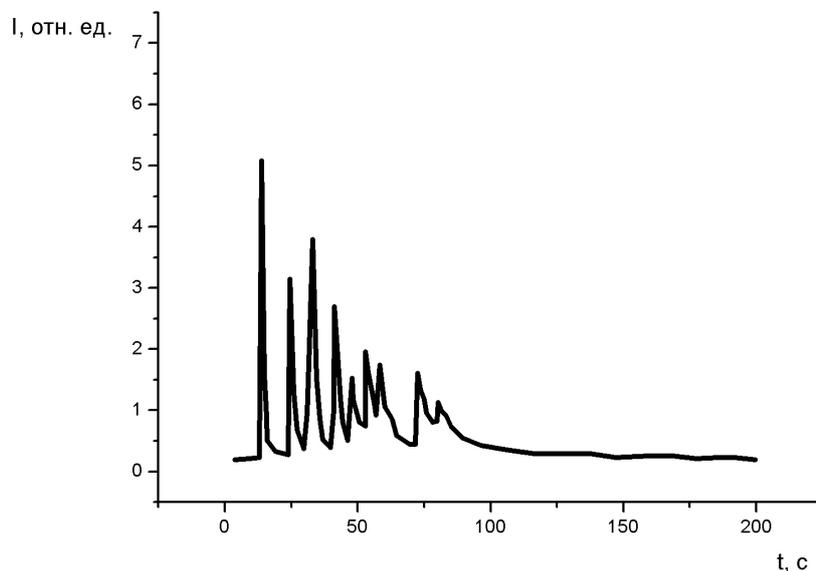
На рис. 1 представлены осциллографические записи вспышек люминесценции клеток *S. cerevisiae* при введении в суспензию клеток озонированного физиологического раствора.

Люминесценция клеток при введении озона в данных условиях эксперимента проявляется в виде вспышки, длящейся менее 10 сек (рис. 1А). Последующие добавления озонированного физиологического раствора приводят к уменьшению амплитуды вспышки вплоть до полного исчезновения реакции клеток на введение озона. На рис. 1Б представлена запись люминесценции этих же клеток через 30 мин. Реакция клеток на введение озона восстанавливается, и люминесценция регистрируется снова. Подобным образом проявляется действие озона и на клетках *S. boulardii*. Люминесценция под действием озона не наблюдается в клетках после их нагревания до 100°C.

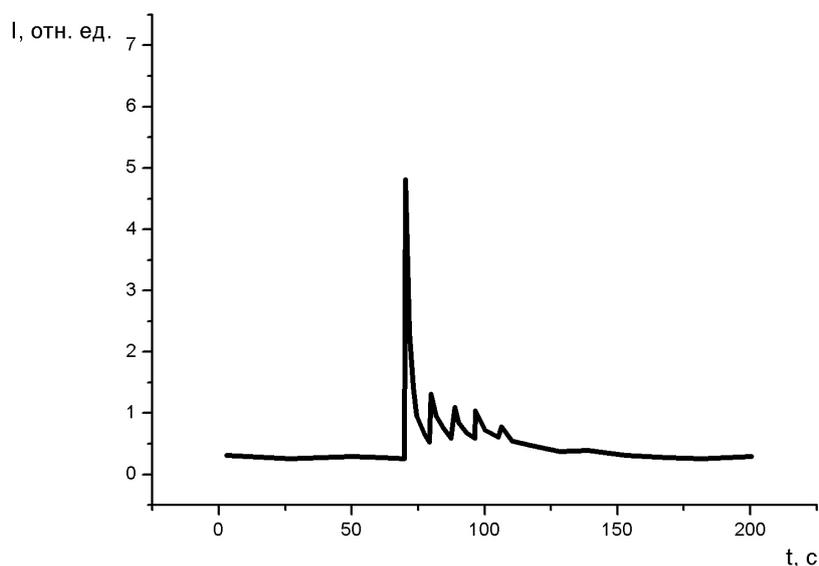
Возникновение люминесценции при введении в клетки сильного экзогенного окислителя, по нашему мнению, может быть объяснено действием, по крайней мере, двух механизмов:

- реакция антиоксидантных систем клеток, направленная на нейтрализацию избыточного оксиданта, при этом возможно возбуждение нейтральных атомов и молекул, переход которых в основное состояние сопровождается излучением квантов света (Воронцов и др., 2011; Арджанов и др., 1976; Владимиров, 1966);

- излучение света при перекисном окислении липидов под действием сильного окислителя.



А



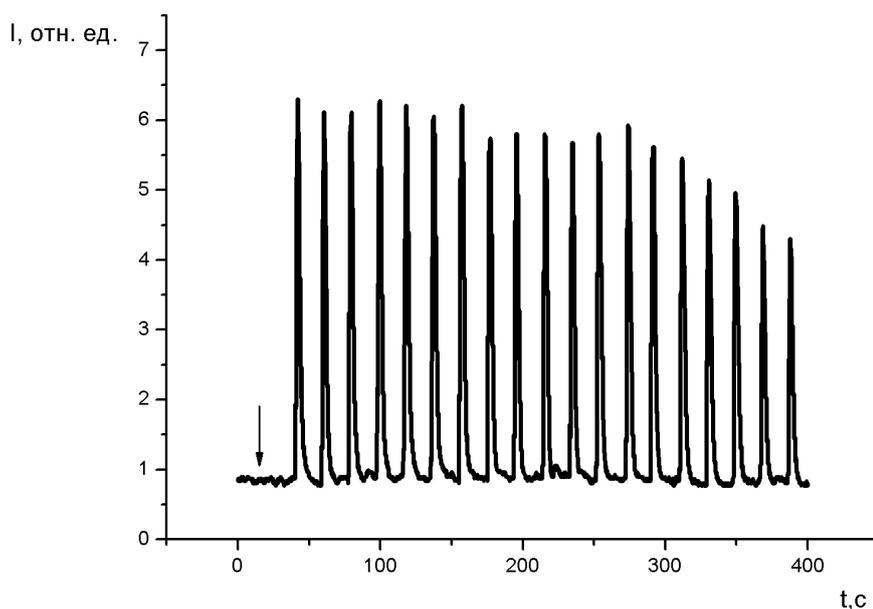
Б

**Рис. 1.** Осциллографическая запись люминесценции дрожжей *S. cerevisiae* под действием озона. А – в суспензию клеток объемом 1 мл, концентрация  $10^6$  кл/мл, вводили порции озонированного физиологического раствора объемом 0,1 мл с концентрацией озона 5 мг/л, до прекращения реакции клеток на озон до исчезновения вспышек; Б – тот же образец; запись через 30 мин после прекращения реакции клеток на озон

Однако в инактивированных нагреванием клетках, в которых механизмы антиоксидантной защиты не работают, свечение не наблюдается. Это дает основание полагать, что основной вклад в свечение клеток под действием озона вносит реакция их антиоксидантных систем на избыток окислителя. Отсюда следует, что количество озона, при котором прекращается люминесцентный ответ клеток на его введение, может быть использовано как мера антиоксидантной активности клеток.

Люминесценция дрожжей *S. cerevisiae* и *S. boulardii* под действием озона в присутствии люминола.

На рис. 2 представлена запись люминесценции клеток *S. boulardii* под действием озона в присутствии люминола в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л.



**Рис. 2. Запись люминесценции клеток *S. boulardii* под действием озона в присутствии люминола.** Концентрация клеток  $3 \cdot 10^6$  кл/мл, объем образца 1,5 мл. При введении в суспензию клеток 0,25 мл раствора люминола с концентрацией  $2,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л (момент введения указан стрелкой) вспышки люминесценции не наблюдается. Последующее введение озонированного физиологического раствора (концентрация озона 5 мг/л) порциями по 0,1 мл приводит к возникновению вспышек люминесценции

Люминол вводили в суспензию клеток непосредственно в кювете люминометра. Видно, что в момент введения люминола (отмечено стрелкой) люминесценция не наблюдается. Однако если далее в суспензию клеток вводить порционно озонированный физиологический раствор, то наблюдается серия вспышек люминесценции с амплитудой, уменьшающейся при введении каждой последующей порции озонированного физиологического раствора. Увеличивая таким способом дозу введенного озона, можно добиться исчезновения вспышек люминесценции.

Можно думать, что люминесценция в данном эксперименте вызвана окислением люминола озоном и не связана с присутствием клеток. На рис. 3 представлена запись люминесценции люминола при той же его концентрации и при введении такой же дозы озона, как и в предыдущем эксперименте, но в отсутствие клеток.

Видно, что высвечивание люминесценции длится около 2 минут, тогда как в присутствии клеток вспышка люминесценции длится около 5 сек. Объяснение может состоять в том, что в системе с клетками присутствуют антиоксидантные системы, нейтрализующие часть избыточного озона.

Данное предположение было проверено в эксперименте, результаты которого представлены на рис. 4.

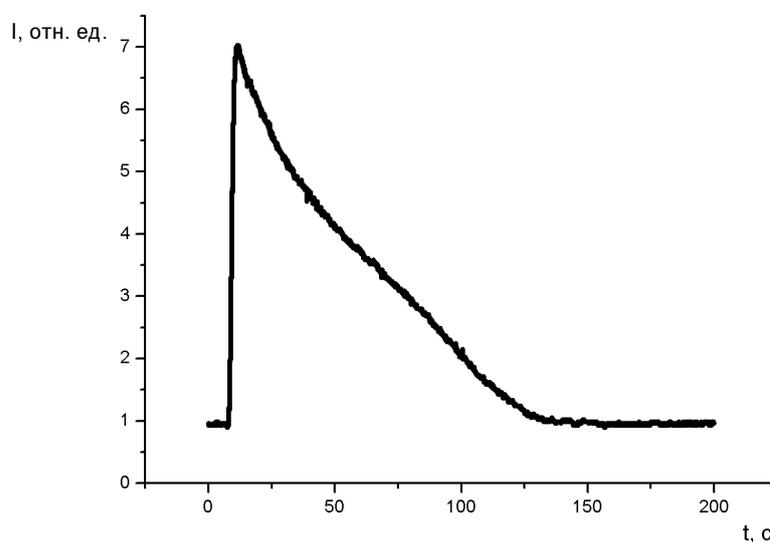


Рис. 3. Запись люминесценции люминола под действием озона в отсутствие клеток в водном растворе

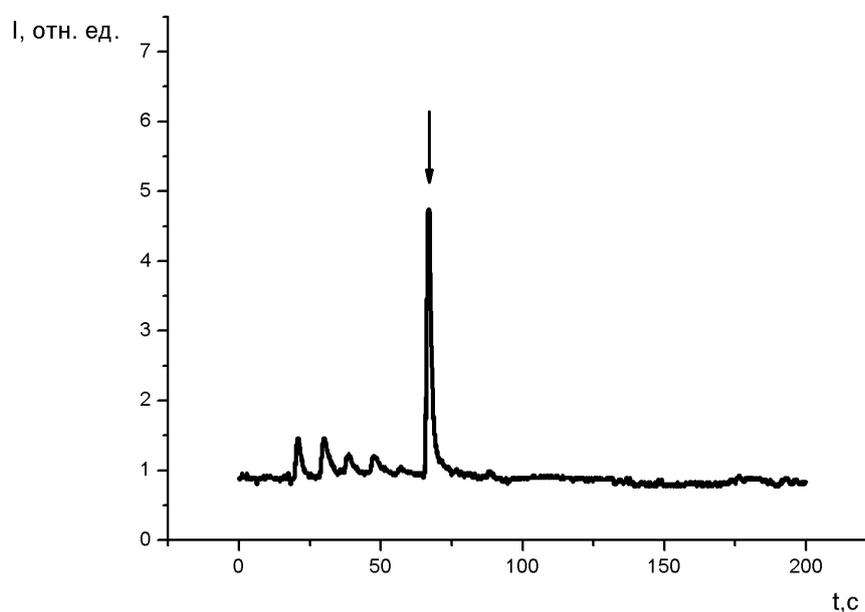


Рис. 4. Запись люминесценции клеток *S. bouardii* при введении люминола (момент введения указан стрелкой) после того, как клетки были обработаны озоном до исчезновения всплеск люминесценции в ответ на озон

В суспензію кліток *S. boulardii*, которые были предварительно обработаны озоном до прекращения вспышек люминесценции в ответ на озон, был введен люминол в таком же количестве, как и в эксперименте, представленном на рис. 3. При этом была зарегистрирована вспышка люминесценции. Отсюда следует, что клетки дрожжей после воздействия на них озона по схеме, представленной на рис. 1А, не погибают, а сохраняют свою способность нейтрализовывать избыточный окислитель. В итоге, светосумма вспышки ХЛ (площадь под кривой вспышки) уменьшается.

Таким образом, обнаружено, что в ответ на введение озона в суспензию дрожжевых клеток возникает люминесценция, интенсивность которой снижается с увеличением дозы введенного озона, вплоть до полного исчезновения люминесцентного ответа клеток на озон. Через некоторое время реакция клеток на озон восстанавливается. Наблюдаемые эффекты можно объяснить тем, что в системе происходит явление временной остановки деления и роста клеток в ответ на стресс (Pryog et al., 2006). Временное исчезновение реакции клетки на озон означает, что её ресурсы для сопротивления окислительному стрессу исчерпаны. При этом чем больше доза озона, при которой достигается состояние остановки деления и роста клеток, тем более устойчивы клетки к окислительному стрессу. Предельный случай – у клеток в инактивированном состоянии, после нагрева до 100°C, ответа на окислительный стресс быть не может. Соответственно, у таких клеток не наблюдается люминесцентной реакции на введение озона.

### Выводы

На примере дрожжей *S. cerevisiae* и *S. boulardii* показано существование явления люминесценции интактных клеток под действием озона, которое не наблюдается на инактивированных клетках после их нагревания. Полученные результаты показывают, что люминесцентный ответ клеток на введение озона может быть использован для определения антиоксидантного статуса клеток.

Авторы выражают благодарность И.П.Высеканцеву за представленные для исследований образцы клеток.

### Список литературы

- Арджанов И.В., Грищенко В.С., Домостроева Н.Г. и др. Автоматическое измерение концентрации озона в воде // Измерительная техника. – 1976. – №5. – С. 70–72. /Ardzhanov I.V., Grishhenko V.S., Domostroyeva N.G. i dr. Avtomaticheskoye izmereniye kontsentratsii ozona v vode // Izmeritel'naya tekhnika. – 1976. – №5. – S. 70–72./
- Булгаков Р.Г., Мусавирова А.С., Абдрахманов А.М. и др. Хемилюминесценция при озонолизе растворов фуллерена С60 // Журн. приклад. спектроскопии. – 2002. – Т.69, №1. – С. 192–196. /Bulgakov R.G., Musavirova A.S., Abdrakhmanov A.M. i dr. Khemilyuminestsentsiya pri ozonolize rastvorov fullerena S60 // Zhurn. priklad. spektroskopii. – 2002. – T.69, №1. – S. 192–196./
- Буряк И.А. Применение озона для повышения эффективности криоконсервирования эритроцитов и дрожжей *Saccharomices cerevisiae*. Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 2008. – 20с. /Buryak I.A. Primeneniye ozona dlya povysheniya effektivnosti kriokonservirovaniya eritrotsitov i drozhzhey Saccharomices cerevisiae. Avtoreferat diss. ... kand. biol. nauk. – Khar'kov, 2008. – 20s./
- Владимиров Ю.А. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях. – М.: Наука, 1966. – С. 25–32. /Vladimirov Yu.A. Sverkhslabye svecheniya pri biokhimicheskikh reaktsiyakh. – M.: Nauka, 1966. – S. 25–32./
- Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М.: Дрофа, 2006. – 287с. /Vladimirov Yu.A., Potapenko A.Ya. Fiziko-khimicheskiye osnovy fotobiologicheskikh protsessov. – M.: Drofa, 2006. – 287s./
- Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т.49. – С. 341–388. /Vladimirov Yu.A., Proskurina Ye.V. Svobodnyye radikaly i kletochnaya khemilyuminestsentsiya // Uspekhi biologicheskoy khimii. – 2009. – T.49. – S. 341–388./
- Воронцов А.М., Пацовский А.П., Никанорова М.Н. Возможности применения озонотемиллюминесценции для оценки содержания органических веществ в природной воде // Водные ресурсы. – 2011. – Т.38, №5. – С. 548–552. /Vorontsov A.M., Patsovskiy A.P., Nikanorova M.N. Vozmozhnosti primeneniya ozonokhemilyuminestsentsii dlya otsenki sodержaniya organicheskikh veshhestv v prirodnoy vode // Vodnyye resursy. – 2011. – T.38, №5. – S. 548–552./
- Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998. – 480с. /Lunin V.V., Popovich M.P., Tkachenko S.N. Fizicheskaya khimiya ozona. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1998. – 480s./
- Мухаметзянова А.А., Сафиуллин Р.Л., Запольских В.В. Хемилюминесценция при озонолизе дифенилдиазометана // Химическая физика. – 2005. – Т.24, №8. – С. 60–63. /Mukhametzyanova A.A., Safiullin

R.L., Zapol'skikh V.V. Khemilyuminestsentsiya pri ozonolize difenildiazometana // Khimicheskaya fizika. – 2005. – Т.24, №8. – С. 60–63./

Туренко А.А., Челибанов В.П. Спектральные исследования процесса окисления галловой кислоты // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики. – 2004. – №15. – С. 262–266. /Turenko A.A., Chelibanov V.P. Spektral'nyye issledovaniya protsesssa okisleniya gallovoy kisloty // Nauchno-tehnicheskij vestnik informatsionnykh tekhnologiy, mekhaniki i optiki. Sankt-Peterburgskiy natsional'nyy issledovatel'skiy universitet informatsionnykh tekhnologij, mekhaniki i optiki. –2004. – №15. – С. 262–266./

Филиппов Ю.В., Вобликова В.А., Пантелеев В.И. Электросинтез озона. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2008. – 237с. /Filippov Yu.V., Voblikova V.A., Panteleyev V.I. Elektrosintez ozona. – М.: Izd-vo Mosk. un-ta, 2008. – 237s./

Пат. № 72111. Украина / МПК<sup>7</sup> G01N 21/76 (2006.01). Биолоуминометр / Зинченко В.Д., Горячая И.П., Говор И.В. Заявл. 05.01.2012. Публ. 15.08.2012. Бюл. №15. /Pat. № 72111. Ukraina / МПК<sup>7</sup> G01N 21/76 (2006.01). Biolyuminometr / Zinchenko V.D., Goryachaya I.P., Govor I.V. Zayavl. 05.01.2012. Publ. 15.08.2012. Byul. №15./

Пат. №73452. Украина / МПК<sup>7</sup> G01N 23/03 (2006). Кювета для био- и хемилуцинометров / Зинченко В.Д., Горячая И.П., Говор И.В. Заявл. 05.03.2012. Публ. 25.09.2012. Бюл. №18. /Pat. №73452. Ukraina / МПК<sup>7</sup> G01N 23/03 (2006). Kyuveta dlya bio- i khemilyuminometrov / Zinchenko V.D., Goryachaya I.P., Govor I.V. Zayavl. 05.03.2012. Publ. 25.09.2012. Byul. №18./

Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol.291 (3). – R. 491–511.

**Представлено: М.В.Косевич / Presented by: M.V.Kosevich**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 24.10.2012*