

зависит от их начальной концентрации. Показано, что эффекты воздействия на спектральные характеристики молекул ФХ дегидратированных и гидратированных форм пиридина и его производных имеют полимодальный характер и зависят от их соотношения в липидной фазе. На основе полученных данных сделано предположение о роли процесса дозозависимой дегидратации в реализации феномена "малых доз" биологически активных веществ.

Ключевые слова: дегидратация, пиридин, производные пиридина, фосфатидилхоллин, сухие пленки, инфракрасная спектроскопия.

Резюме

Лозовий В.П., Бичко А.В., Артеменко О.Ю. Роль процесів дегідратації в механізмі впливу малих концентрацій піридину та його похідних на клітинні мембрани.

Методом інфрачервоної спектроскопії сухих плівок фосфатидилхоліну (ФХ) був досліджений механізм дегідратації піридину та його похідних при контакті з межею розподілу "ліпід/р-н електроліту" в крайових точках діапазону малих концентрацій (10^9 , 10^5 М). Показано, що ступінь дегідратації досліджених сполук прямо залежить від їх початкової концентрації. Показано, що ефекти впливу на спектральні характеристики молекул ФХ дегідратованих та гідратованих форм піридину та його похідних мають полімодальний характер і залежать від їх співвідношення в ліпідній фазі. На основі отриманих даних зроблено припущення щодо ролі процесу дегідратації в реалізації феномена "малих доз" біологічно активних речовин.

Ключові слова: дегідратація, піридин, похідні піридину, фосфатидилхолін, сухі плівки, інфрачервона спектроскопія.

Summary

Lozovy V.P., Bychko A.V., Artemenko O.Yu. The role of dehydration process in the mechanism of pyridine and its derivatives low concentrations action on the cell membrane.

The mechanism of pyridine and its derivatives dehydration in contact with the boundary between "lipid/electrolyte sol." in the extreme points of the low concentrations range (10^9 , 10^5 M) was investigated by phosphatidylcholine (PC) dry films infrared spectroscopy. The compounds dehydration degree is directly depends on their initial concentration. The dependence from their ratio in the lipid phase and polymodal character of the effects of dehydrated and hydrated forms of pyridine and its derivatives on PC spectral characteristics was shown. According to the data the role of dose-limiting process of dehydration in the phenomenon of biologically active substances low doses realization was assumed.

Key words: dehydration, pyridine, pyridine derivatives, phosphatidylcholine, dry films, IR-spectroscopy.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.Романюк

ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ДРІЖДЖОВОЇ КУЛЬТУРИ В ПРОЦЕСІ СТАРІННЯ ПОПУЛЯЦІЇ ПРИ ДІЇ ІНДУКТОРА АПОПТОЗУ

О.О.Парілова, Д.В.Ватліцов, Т.З.Богдан, К.М.Ігрунова,
О.М.Дуган

Національний технічний університет України "КПІ"
Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л.Шупика

Вступ

Дані літератури свідчать про те, що дріжджі здатні до запуску механізму запрограмованої клітинної загибелі з різних вагомих причин [1,2]. Зокрема, для *Saccharomyces cerevisiae* дослідженими індукторами апоптозу є α -фактор (статевий феромон), оцтова кислота, амоній, АФК, підвищена температура, старіння, вірусні токсини, K1 та K2B, зиготин, азид натрію та підвищена експресія генів проапоптичних білків ссавців, делеція гена гістонового шаперону, пошкодження ядерної ДНК тощо [1]. Передчасна смерть старих та ушкоджених клітин протягом життєвого циклу та під час голодування збільшує шанси решти популяції вижити та утворити спори, таким чином зростає ймовірність, що клон продовжуватиме існувати [2]. Отже, альтруїстична клітинна загибель через активацію високо консервативного, самодеструктивного, ферментативного механізму надає перевагу для популяції, розширюючи її генетичне різноманіття [1].

Зміни в мітохондріальному мембранному потенціалі використовують як маркер мітохондріальної активності та життєздатності клітин, а також як один з критеріїв, що вказує на активацію процесу апоптозу в клітині [3]. Мітохондріальна мембранна пермеабілізація розглядається як безповоротна точка в численних моделях запрограмованої клітинної загибелі [3, 4, 5]. Дійсно, мітохондрії обумовлюють внутрішній шлях апоптозу, а також відіграють ключову роль в зовнішньому механізмі

його запуску [1, 6]. Визначення та оцінка ранніх мітохондріальних змін дозволяє ідентифікувати клітини, що проявляють апоптичний та некротичний фенотип.

Класичний підхід до вивчення старіння в дріжджових клітинах заснований на встановленні реплікативної тривалості життя [7, 8]. Крім того, апоптоз пов'язаний з хронологічним та реплікативним старінням, що обмежує тривалість життя, підтримує генетичні варіанти в межах популяції, як наслідок підтримує генетичний консерватизм [1]. Одна з причин пригнічення життєздатності дріжджової культури і відповідно її біосинтетичної активності в процесі бродіння є дія стрес-факторів та продуктів метаболізму, що є індукторами запрограмованої смерті дріжджових клітин [2]. Тому виникає потреба в дослідженні життєздатності дріжджової популяції при дії індуктора.

Метою роботи було оцінити життєздатність та особливості клітинного циклу дріжджової культури в процесі старіння популяції за звичайних умов та під час оксидативного стресу, індукovanого ефектором.

Матеріали та методи досліджень

Об'єкт дослідження - промисловий штам *Saccharomyces cerevisiae* Y-563 - триплоїдний гібрид, який має підвищену генеративну активність та здатний зброджувати мелясне сусло концентрацією 24 - 26 %СР з накопиченням спирту до 9,4 об% [9]. Дріжджові клітини культивували при 30°C в бульйоні Сабуро мікрометодом в планшетах. Попередньо життєздатність та морфологію штаму оцінювали стандартною методикою забарвлення метиленовим синім. Дріжджову популяцію *Saccharomyces cerevisiae* Y-563 досліджували на 24-й, 48-й, 72-й годинах росту.

Оскільки проточна цитометрія дозволяє швидко і точно детектувати сигнал розсіювання світла та флуоресценцію кожної клітини, застосовували метод проточної цитометрії для моніторингу фізіологічного стану дріжджових клітин в процесі старіння [10].

Клітинний цикл, а, отже, і генеративну активність досліджуваного штаму оцінювали шляхом визначення плоідності клітин [11, 12]. Аліквоту фіксованих дріжджових клітин 10^7 ,

попередньо оброблену РНКазою А, забарвлювали флуорисцентним барвником пропідій йодидом ("Sigma"). Визначали відсоток клітин в G1-, S-, сумарно в G2- та M-фазах.

Дослідження зміни мітохондріального мембранного потенціалу проводили за стандартною методикою з флуорохромами родаміном 123 ("Fluka") та пропідій йодидом ("Sigma") [13]. Використовували відмиту дріжджову суспензію з концентрацією 10^6 кл/мл.

Дослідження індекса індукції апоптозу (ІІА) штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-563 відбувалось в два етапи: перший - визначення частоти спонтанного апоптозу в культурі, другий - визначення частоти індукovanого апоптозу. Дослідження спонтанного апоптозу дає змогу оцінити вихідний стан культури в процесі старіння популяції.

В якості індуктора додавали роз'єднувальний агент окисно-го фосфорилування - азид натрію в апоптоз індукуючій концентрації (20ММ), яка викликає пригнічення клітинного дихання та запускає в дріжджових клітинах програму апоптозу внаслідок оксидативного стресу.

Статистичну обробку проводили з використанням програми Statistica, застосовували тест Ст'юдента та описову статистику. Довірчі інтервали середніх значень визначали при $p=0,95$ шляхом підрахунку стандартної помилки. Відмінності вважали статистично значущими при $p<0,05$ ($n=8$).

Отримані результати та їх обговорення

Для визначення етапу культивування, під час якого виникає проліферативний блок, оцінювали клітинний цикл методом проточної цитометрії. Після 24 годин культивування було виявлено, що популяція дріжджів характеризувалась досить високою генеративною активністю. Так, було виявлено, що на G2/M-фазу припадало $20\pm 0,5\%$ від загальної кількості клітин (рис.1).

У S-фазі відбувається активний синтез ДНК, що характеризує проліферативну активність популяції. В добовій культурі рівень клітин, що перебувають в S-фазі, досягав $8\pm 0,3\%$ від загальної кількості клітин. Подальші дослідження показали істотну інтенсивність реплікації ДНК (S-фаза) на 48 годині культивування, що становила $15\pm 3\%$. Найменші значення ($5\pm 1,68\%$)

отримано на третю добу. Отримані результати можуть свідчити про запуск процесу старіння дріжджової популяції.

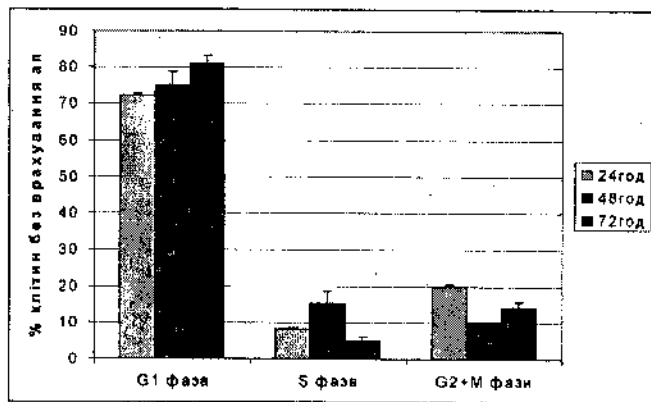


Рис. 1. Вплив тривалості культивування на клітинний цикл дріжджів штамму *Saccharomyces cerevisiae* Y-563.

Відсоток клітин, що перебувають в G1-фазі, корелював з віком популяції та дорівнював відповідно $72 \pm 0,6\%$, $75 \pm 3,6\%$ та $81 \pm 2,4\%$ (рис. 1). G1 фаза містить певну частину клітин, що залишаються в ній та не вступають S-фазу. Це відбувається для уникнення реплікації пошкодженої ДНК та передачі генетичних аномалій потомству, оскільки вони є дефектними. Постійний приріст значення G1-фази в процесі росту свідчить про вплив тривалості культивування на вміст пошкоджених клітин.

Зниження швидкості росту популяції, тобто редукція приросту кількості клітин, пояснюється накопиченням в середовищі продуктів життєдіяльності дріжджів, що гальмують поділ клітин, та порушенням живлення внаслідок дефіциту поживних компонентів в середовищі.

Наступним етапом дослідження було визначення змін мітохондріального мембранного потенціалу клітин дріжджів, що дає змогу оцінити функціональний резерв клітин, виявити відсотковий вміст та диференціювати клітини за типом загибелі (апоптоз чи некроз). Дослідження ж спонтанного та індукованого апоптозу дає змогу розрахувати індекс індукції апоп-

тозу. Опираючись на значення ІА, оцінювали функціональний резерв популяції клітин.

Результати дослідження спонтанного апоптозу дріжджів під час культивування протягом трьох діб виявили, що в 1- та 2-добовій культурах кількість клітин, котрі загинули в результаті спонтанного апоптозу становила $16,5 \pm 2\%$ та $12,1 \pm 0,5\%$ від загальної кількості відповідно (рис.2). Смерть старих, стерильних чи дефектних дріжджових клітин, а також загибель частини популяції в умовах жорсткої конкуренції за поживні компоненти, тобто шляхом апоптозу, може гарантувати виживання решти, а, отже, і клону. Чітка ілюстрація цієї концепції альтруїстичної загибелі спостерігається вже на 72 години культивування, на що вказує суттєве зростання відсотку спонтанного апоптозу до $28,6 \pm 0,4\%$.

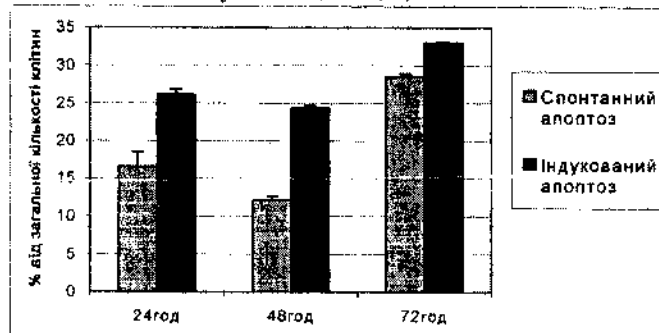


Рис. 2. Вплив тривалості культивування на рівень спонтанного та індукованого апоптозу дріжджів.

Отримані результати свідчать, що азид натрію достовірно знижував життєздатність дріжджових клітин за рахунок запуску програми апоптозу. Однак аналіз результатів виявив, що в 72-годинній культурі *S. cerevisiae* Y-563 на фоні високого значення індукованого апоптозу відбувалося зростання показників спонтанного на 12% та 16% в порівнянні з результатами, отриманими після 24 та 48 годин культивування (рис. 2). Це свідчить про дріжджових клітин резервом, а отже виснаження культури в процесі культивування.

В даній роботі для оцінки функціонального резерву дріжджової культури в процесі старіння популяції був застосований діагностичний алгоритм з урахуванням вихідного стану клітин [14]. Дослідження ПА виявило, що культивування супроводжувалось процесами активації популяції і відображалось зниженням ПА після 48 годин культивування. Так, ПА дводобової дріжджової культури становив $0,487 \pm 0,021$ у.о. на протигагу значенню ПА добової культури $0,631 \pm 0,07$ у.о. Однак на 72 годині культивування спостерігали зростання ПА, що відповідало значенню $0,866 \pm 0,01$ у.о. (рис.3). Результати дослідження 72-годинної культури вказують на зниження функціонального резерву дріжджової культури, обумовлене процесами старіння та голодування при вичерпанні поживних компонентів із культурального середовища.

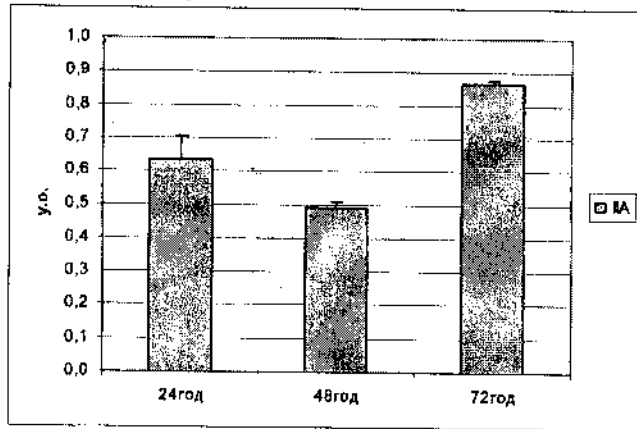


Рис. 3. Вплив тривалості культивування на значення індекса індукції апоптозу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-563.

Значення частоти апоптозу та ПА підтверджуються результатами тесту на проліферативну активність популяції дріжджів на всіх досліджених строках культивування.

Згідно рис. 4 кількість клітин загинлих шляхом некрозу корелювала з віком популяції. Однак вміст некротичних клітин був неістотним та досягав максимального значення відповідно на 72 годині культивування - $0,98 \pm 0,12\%$. Частота некрозу в

1- і 2-добовій культурах дорівнювала $0,03 \pm 0,006\%$ та $0,1 \pm 0,01\%$ відповідно.

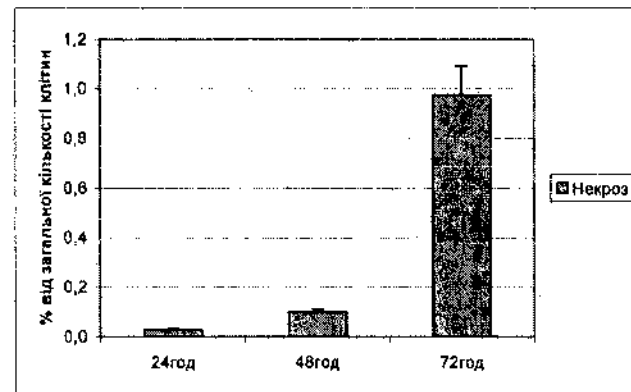


Рис. 4. Вплив тривалості культивування на відсоток некротичних клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-563.

Оскільки кожна дріжджова клітина лімітована кількістю поділів, то процес фізіологічного старіння забезпечує природній сценарій, в котрому апоптоз, на відміну від некрозу, проявляється в цілому як перевага для клону, про що свідчать отримані результати.

Висновки

1. Дослідження клітинного циклу показало, що на 48 годині культивування кількість клітин в S-фазі сягає максимального значення ($15 \pm 3\%$), що свідчить про значну метаболічну активність і, в подальшому, призводить до прискорення виснаження популяції, що відображається підвищенням ПА.

2. Встановлено, що здатність дріжджової культури протистояти дії азиду натрію в апоптоз-індукуючій концентрації (20мМ) редукується на 72 годині культивування, що пов'язано зі зниженням її функціонального резерву.

3. Запропоновано комплексний підхід для оцінки життєздатності промислових штамів, оснований на визначенні індексу індукції апоптозу та проліферативної активності популяції.

Література

1. Шемарова И.В. Пути передачи апоптотических сигналов в клетках низших эукариот / И.В. Шемарова // Цитология. - 2007. - Т. 49, №3. - С. 229 - 242.
2. Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war: review / S. Buttner, T. Eisenberg, E. Herker [et al.] // The Journal of Cell Biology. - 2006. - Vol. 175. - P. 521-525.
3. Sapienza K. Mitochondrial involvement in aspirin-induced apoptosis in yeast / K. Sapienza, W. Bannister, R. Balzan // Microbiology. - 2008. - Vol. 154. - P. 2740-2747.
4. Bernardi P. A mitochondrial perspective on cell death / P. Bernardi, V. Petronilli, F. Di Lisa // Trends Biochemistry Science. - 2001. - Vol. 26. - P. 112 - 117.
5. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* / R.D. Silva, R. Sotoca, B. Johansson [et al.] // Molecular Microbiology. - 2005. - Vol. 58, Issue 3. - P. 824-834.
6. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast / A.I. Pozniakovskiy, D.A. Knorre, O.V. Markova [et al.] // The Journal of Cell Biology. - 2005. - Vol. 168. - P. 257-269.
7. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary phase cultures / C. Allen, S. Buttner, A.D. Aragon [et al.] // The Journal of Cell Biology. - 2006. - Vol. 174. - P. 89 - 100.
8. Bitterman K.J. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin / K.J. Bitterman, O. Medvedik, D.A. Sinclair // Microbiology and Molecular Biology Reviews - 2003. - Vol. 67: - P. 376-399.
9. Пат. 1306949 А1 СССР, С 12 N 1/16. Гибридный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* У-563, используемый для сбраживания мелассного сусла повышенной концентрации в двухпродуктовом производстве спирта и хлебопекарных дрожжей / Ильина Л.Д., Косиков К.В., Тка-

ченко А.Ф. [и др.]; заявитель и патентообладатель ВНИИ новых видов продуктов и добавок, НИИ общей генетики им. Вавилова. - №4018419/28-13; заявл.19.12.85; опубл. 30.04.87. Бюл.№16. - 3 с.

10. Davey H.M. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the Importance of Single-cell analyses / H.M. Davey, D.B. Kell // Microbiological reviews. - 1996. - P. 641-696.

11. Ludovico P. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry / P. Ludovico, F. Sansonetti, M. Corte-Real // Microbiology. - 2001. - Vol. 147. - P. 3335 - 3343.

12. Krishan A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining / A. Krishan // The journal of cell biology. - 1975. - Vol. 66. - P. 188 - 193.

13. Sazer Sh. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast / Sh. Sazer, S.W. Sherwood // Journal of Cell Science. - 1990. - Vol.97. - P. 509 - 516.

14. Патент України на корисну модель № 65985 А. Спосіб оцінки функціонального резерву мононуклеарних клітин крові з використанням принципу "золотого перерізу" / Ігрунова К.М. Зареєстровано 15 березня 2004 р.

Резюме

Парілова О.О., Ватліцов Д.В., Богдан Т.З., Ігрунова К.М., Дуган О.М. Оцінка життєздатності дріжджової культури в процесі старіння при дії індуктора апоптозу.

В роботі проведено дослідження впливу тривалості культивування та дії стандартного індуктора апоптозу на життєздатність та клітинний цикл штаму *Saccharomyces cerevisiae* У-563. Результати свідчать про значне виснаження дріжджової культури вже на третю добу росту, обумовлене процесами фізіологічного старіння та вичерпанням компонентів живлення в культуральному середовищі. Запропонований підхід дозволяє оцінити рівень некрозу та апоптозу в популяції, а також її функціональний резерв з врахуванням проліферативної активності дріжджових клітин.

Ключові слова: старіння, *Saccharomyces cerevisiae* У-563, життєздатність, апоптоз, некроз, проліферативна активність.

Резюме

Парилова Е.А., Ватлицов Д.В., Богдан Т.З., Игрунова К.Н., Дуган А. М. *Оценка жизнеспособности дрожжевой культуры в процессе старения под действием индуктора апоптоза.*

В работе проведено исследование влияния длительности культивирования и действия стандартного индуктора апоптоза на жизнеспособность и клеточный цикл штамма *Saccharomyces cerevisiae* У-563. Результаты свидетельствуют о значительном истощении дрожжевой культуры на третий день роста, обусловленном процессами физиологического старения и исчерпанием питательных компонентов в культуральной среде. Предложенный подход позволяет оценить уровень некроза и апоптоза в популяции, а также ее функциональный резерв, учитывая пролиферативную активность дрожжевых клеток.

Ключевые слова: старение, *Saccharomyces cerevisiae* У-563, жизнеспособность, апоптоз, некроз, пролиферативная активность.

Summary

Parilova O.O., Vatlitsov D.V., Bohdan T.Z., Igrunova K.M. *Evaluation yeast cells viability during aging under the action of apoptosis inducer.*

It was performed investigation displaying influence of cultivating duration and effect of standard apoptosis inducer on the viability and cell cycle strain *Saccharomyces cerevisiae* У-563. The results has indicated a significant depletion of yeast culture on the third day of growth, caused on physiological aging process and the depletion of nutrients in the culture medium. The proposed approach has permitted to estimate necrosis and apoptosis frequencies in the population, its functional reserve, in view of yeast cells proliferative activity.

Key words: aging, *Saccharomyces cerevisiae* У-563, viability, apoptosis, necrosis, proliferative activity.

Рецензент: д.мед.н., проф. С.М. Федченко

УДК 615.322:582:577.114

ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ТА СИРОВИНА, ЯКІ МІСТЯТЬ САПОНІНИ

Б.П. Романюк, В.М. Фролов, Я.А. Соцька

ДЗ "Луганський державний медичний університет"

Сапоніни (від лат. sapo (saponis) - мило) складні органічні безазотисті сполуки групи глікозидів. Характерна їх властивість - це здатність давати піну схожу на мильну. Були виділені в 1810 році. Сапоніни викликають гемоліз еритроцитів у зв'язку з утворенням комплексів з холестерином мембран, як результат - оболонка еритроцита із напівпрониклої стає прониклою і, таким чином, гемоглобін виходить в плазму крові, фарбуючи її в червоний колір ("лакова" кров). Вони - безкольорні або жовтуваті гігроскопічні речовини. Розчинні в гідрофільних розчинниках (вода, метанол і етанол). Нерозчинні в бензолі, хлороформі та дітиловому ефірі. Для виявлення сапонінів в рослинній сировині використовують реакції, які ґрунтовані на їх фізичних властивостях (піноутворення), біологічних (гемоліз) та фізико-хімічних (сполучення хроматографічного розподілу їх з наступною ідентифікацією за допомогою кислих реагентів).

Сапоніни володіють широким спектром фармакологічної дії. Їх застосовують як стимулюючі та тонізуючі (женьшень, араля манжурська), седативні (сибуха блакитна), протизапальні, регулюючі водно-сольовий обмін (солодка гола), відхаркуючі, сечогінні, проносні тощо.

В залежності від будови аглікона (сапогеніну) сапоніни підрозділяють на стероїдні та тритерпенові. Стероїдні сапоніни - аглікони, яких відносять до С27-стеролам, боковий ланцюг їх підлягає метаболічним змінам з утворенням спірокетальної системи. До них відносять цигігонін, тигонін та гігомін (наперстянка пурпурова, діскорея кавказька).

Тритерпенові сапоніни - аглікони, яких представлені пентациклічними або тетрациклічними тритерпеноїдами.