

BİOLOGİYA

UOT 535.79

ULTRABƏNÖVŞƏYİ – B ŞÜALARININ
MAYA GÖBƏLƏYİ HÜCEYRƏLƏRİNDƏ LÜSİGENİN
XEMİLÜNESSENSİYASINA TƏSİRİ

N.K.KÖÇƏRLİ, S.T.HÜMMƏTOVA

*Bakı Dövlət Universiteti**sam_bio@mail.ru*

Tədqiqat işinin məqsədi ultrabənövşəyi -B (UB-B) şüalarının müxtəlif dozaları ($2.2 \cdot 10^4$ erq/mm^2 ; $3.0 \cdot 10^4$ erq/mm^2 ; $3.7 \cdot 10^4$ erq/mm^2 ; $4.5 \cdot 10^4$ erq/mm^2) ilə təsir edilmiş maya göbələyi hüceyrələrində Lüsigenin - bis-N-methylacridinium nitrat (Lus⁺⁺) xemilüminessensiya (XL) reaksiyasının intensivliyinin öyrənilməsidir. Superoksid-anion radikalının XL üsulu ilə tədqiqi radikalların qatılığını deyil, onların iştirak etdiyi reaksiyanın sürətini xarakterizə edir. Müəyyən olunmuşdur ki, UB-B şüalarının dozası artdıqca Lüsigenin xemilüminessensiya intensivliyi və XL çıxımı kontrol nümunə ilə müqayisədə dozadan asılı olaraq artır. Beləliklə, UB-B şüalarının təsirindən sonra maya göbələyi hüceyrələrinin plazmatik membranında NADPH-oksidaza ferment kompleksinin aktivləşməsi aşkar edilmişdir.

Açar sözlər: Xemilüminessensiya (XL), Lüsigenin-(Lus⁺⁺) , Malondialdehid (MDA), Ultrabənövşəyi şüalar (UB-B), lipidlərin peroksidləşməsi (LPO).

Ədəbiyyatdan məlumdur ki, biologiyada Lüsigenin xemilüminessensiya (LüsXL) xassəsindən hüceyrələrdə və toxumada süperoksid anion O₂ • - radikalını təyin etmək üçün bir zond kimi geniş istifadə olunur [4, 6, 8, 10].

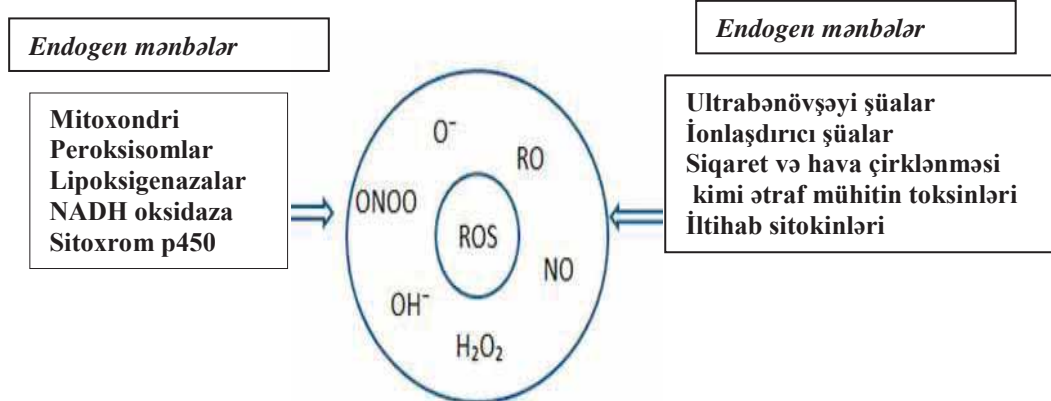
Vladimirov və əməkdaşları tərəfindən müəyyən edilmişdir ki, LüsXL-si mitoxondridə yaranan superoksid anion radikalının (*O₂-) reaksiyalarını araşdırmağa imkan verir, həmçinin izolə olunmuş mitoxondridə, hüceyrənin və bütün orqanların fermentativ və membran sistemlərində superoksid radikallarının öyrənilməsi üçün tətbiq olunur [9].

Yılan L. və əməkdaşları tərəfindən, lüsigen/riboflavinin xemilüminessensiyası aşkar edilmiş və dofaminin təsirindən lüsigen/riboflavin birləşməsinin xemilüminessensiya intensivliyinin artması müəyyənləşdirilmişdir, eyni zamanda bu üsulun dofaminin aşkarlanması üçün ən yaxşı üsul olduğu göstərilmişdir.

Ədəbiyyat məlumatına görə *Candida guilliermondi* hüceyrələrinin

membranında fosfolipidlər 30% təşkil edir. Bu həmin hüceyrənin AOA-nın yüksək olmasını güman etməyə imkan verir. Onu da qeyd etməliyik ki, 280-320 nm dalğa uzunluqlu UB-B şüalarla şüalanmış hüceyrənin biomembranında lipidlərin peroksidləşməsi prosesi dozadan bilavasitə asılıdır [3].

UB-B şüalarının təsirindən hüceyrələrin membranında və daxili quruluşunda baş verən dəyişikliklər oksigenin fəal formalarının əmələ gəlməsində mühüm rol oynayır və hüceyrədə oksidləşdirici stressin yaranmasına səbəb olur. Canlı orqanizmlərdə olan antioksidantların əsas vəzifəsi tək-cə oksigenin fəal formalarını zərərsizləşdirmək deyil, həm də onların təsirindən hüceyrədə əmələ gələn toksiki məhsulları aradan götürməkdir [3].



Səh.1. Reaktiv oksigen növlərinin mənbələri [11].

Superoksid-radikalı NADPH-oksidaza sistemində sintez olunan və oksigenin ilkin aktiv forması kimi müəyyən olunur. Hüceyrələrdə Lus⁺⁺XL-nın tətqiqi bu hüceyrələrdə NADPH-oksidazanın aktivliyini xarakterizə etməyə imkan verir. Maya göbələyi hüceyrələrində NADPH mənbəyi əsasən karbohidratların eksozomonofosfat yolu ilə oksidləşməsi hesab olunur.

Superoksid anion radikalı O⁻² hüceyrənin sitoplazmatik membranında NADPH-oksidaza kompleksi ilə molekulyar oksigenin birelektronlu bərpası reaksiyasında əmələ gəlir. Bu radikal həm də endoplazmatik şəbəkənin membranında və ya mitoxondrinin daxili membranında tənəffüs zəncirində NADPH-oksidaza kompleksi vasitəsilə yarana bilər [1,5]. Məlumdur ki, lüsigenin yalnız superoksid radikalının təsiri ilə oksidləşir və lüminessensiya edir. Superoksid-anion radikalının XL üsulu ilə tətqiqi radikalın qatılığını deyil, onların iştirak etdiyi reaksiyanın sürətini xarakterizə edir. Şəkil 1-də lüsigenin təsir mexanizmi göstərilmişdir [2, 7].

Tətqiqat obyektı və metodları

XL metodu sərbəst radikalın miqdarının ölçülməsi üçün tətbiq edilən ən dəqiq metodlardan biri hesab edilir. Bu metod oksigenin aktiv radikalı arasında gedən rekombinasiya reaksiyaları zamanı ayrılan kimyəvi enerjinin işıq enerjisinə çevrilməsinə əsaslanır.

Tədqiqat obyektini kimi *Candida guilliermondii* U-916 maya göbələyi hüceyrələrindən istifadə edilmişdir. Maya göbələyi hüceyrələri suslo-aqar (4° Ball) qidalı mühitində 30°C temperaturda becərilmişdir. Aparılmış təcrübələrdə maya göbələyi hüceyrəsinin 3 günlük kulturasından istifadə edilmişdir. Hüceyrələr distillə suyu ilə yuyulduqdan sonra suspenziya halına keçirilmişdir və optik sıxlığı ($D=1,0 \times 10^8$ hüc/ml) kFk-2 fotoelektrokolorimetri ilə təyin edilmişdir.

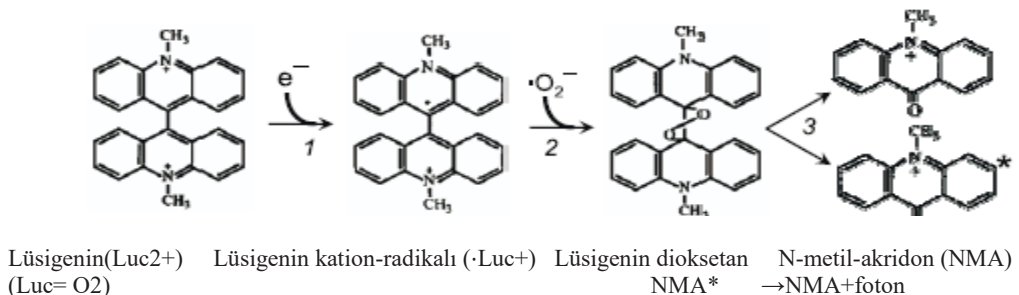
UB-B şüa mənbəyi kimi UFS-2 işıq filtri ilə təchiz olunmuş PRK-4 civə lampasından istifadə edilmişdir. Hüceyrələr kvardsan hazırlanmış sınaq şüşələrində şüa mənbəyindən 10 sm məsafədə yerləşdirilmişdir. Kontrol kimi şüalanmamış maya göbələyi hüceyrələrindən istifadə edilmişdir.

Lus⁺⁺XL-nin intensivliyi impuls rejimində işləyən kvantometrik qurğuda təyin olunmuşdur. Tədqiqat işində işıq dedektoru kimi FEG-85 tipli fotoelektron gücləndiricisindən istifadə olunmuşdur. Bundan əlavə UŞ-2 tipli geniş diapozonlu gücləndiricilərdən və PST-200 tipli dekartronlu hesablayıcı cihazdan istifadə olunmuşdur. Alınan nəticələr KSP-4 tipli özüyazan cihazda qeyd edilmişdir. Qurgu impuls rejimində işləmişdir. Maya göbələyi hüceyrələri suspenziyasına lütseginin 10^{-5} M qatılıqda əlavə olunmuşdur və XL qurğusunda xemilüminessensiya reaksiyasının intensivliyi təyin olunmuşdur [1].

Alınan nəticələr və onların müzakirəsi

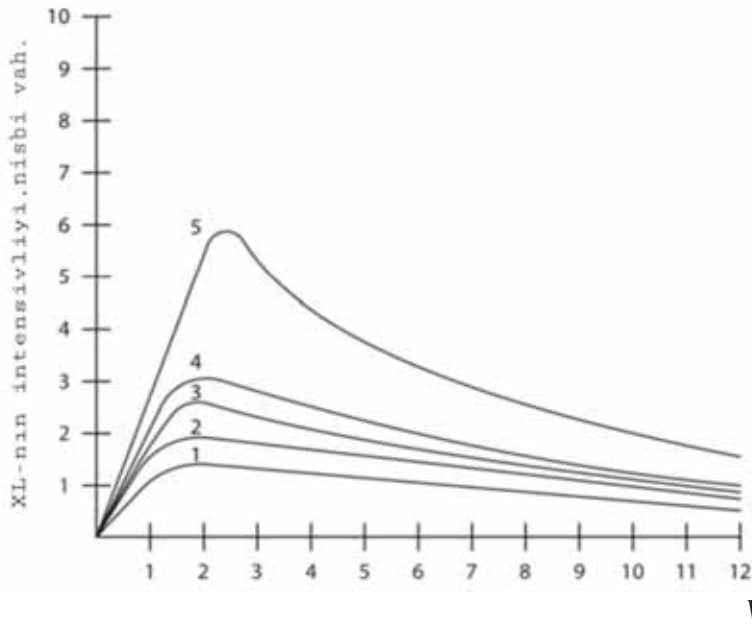
Biologiya, tibb, o cümlədən farmakologiya, kosmetologiya sahələrində müxtəlif bioloji mayelərdə (plazma, tüpürək, sidik), farmakoloji preparatlar və bioloji aktiv qatqılar, içkilər və qida əlavələrində antioksidant göstəricilərini öyrənmək üçün geniş tətbiq olunan xemilüminessensiya (XL) üsulu ilə maya göbələyi hüceyrələrində Lus⁺⁺- (bis-N-methylacridinium nitrat-) xemilüminessensiya reaksiyasının intensivliyinə UB-B şüalarının müxtəlif dozalarının təsiri öyrənilmişdir.

Şəkil 2-də XL-nin kinetik əyriləri göstərilmişdir. Şəkildən görüldüyü kimi kontrol nümunədə Lus⁺⁺XL-nin intensivliyi şüalanmış hüceyrə suspenziyası ilə müqayisədə daha aşağı intensivliklə xarakterizə olunur.



Şəkl. 2. Lüsigenin xemilüminessensiya reaksiyası.

Fikrimizcə bu, kontrol kimi istifadə olunan hüceyrə suspenziyasında superoksid anion radikalının əmələ gəlmə sürətinin zəif olması ilə əlaqədardır. $Lus^{++}XL$ -nin intensivliyi birzırvəli əyri ilə müşayiət olunur. Zirvənin hüdudu isə XL reaksiyasında yaranan superoksid anion radikalının miqdarına uyğun gəlir. UB-B şüaları ilə şüalanmış hüceyrə suspenziyasında $Lus^{++}XL$ reaksiyasının sürəti artır və kontrollu müqayisədə $Lus^{++}XL$ -nin maksimum qiymətinə çıxma vaxtı azalır, bu da superoksid anion radikalının aktivliyinin artmasını göstərir. Şəkildən də görüldüyü kimi maya göbələyi hüceyrələrini UB-B şüaların 4.5×10^4 erq/mm² dozası ilə şüalandırdıqda $Lus^{++}XL$ -nin intensivliyi ən yüksək qiymətlə xarakterizə olunur və həmçinin zirvə altı sahə artır. Belə ki, UB-B şüaları ($2.2 \cdot 10^4$ erq/mm²; $3.0 \cdot 10^4$ erq/mm²; $3.7 \cdot 10^4$ erq/mm²; $4.5 \cdot 10^4$ erq/mm²) ilə təsir edilmiş göbələyi hüceyrələrində ilk anlarından $Lus^{++}XL$ intensivliyi artmağa başlayır və şüalanma intensivliyi maksimal qiymət aldıqdan sonra tədricən azalmağa başlayır. Şəkil 3-də UB-B şüaları ($2.2 \cdot 10^4$ erq/mm²; $3.0 \cdot 10^4$ erq/mm²; $3.7 \cdot 10^4$ erq/mm²; $4.5 \cdot 10^4$ erq/mm²) ilə təsir edilmiş maya göbələyi hüceyrələrində $Lus^{++}XL$ -nin dozadan asılılığı göstərilmişdir.



Şəkil 3. Maya göbələyi hüceyrələrində lüsigenin XL intensivliyi

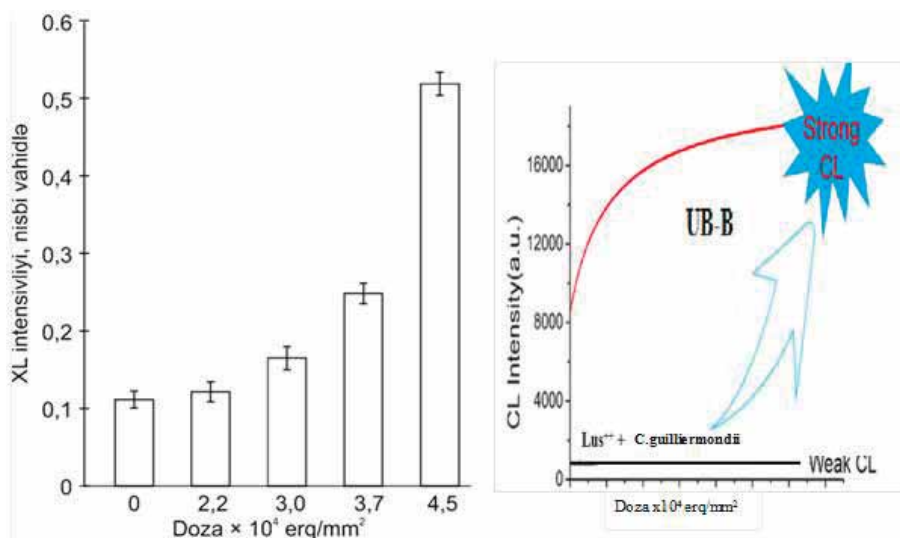
1- Kontrol, 2- $2.2 \cdot 10^4$ erq/mm², 3- $3.0 \cdot 10^4$ erq/mm², 4- $3.7 \cdot 10^4$ erq/mm², 5- $4.5 \cdot 10^4$ erq/mm²

Təcrübənin nəticələrindən aydın olur ki, UB-B şüalarının maya göbələyi hüceyrələrinə təsiri zamanı $Lus^{++}XL$ intensivliyinin dəyişməsi sərbəst radikalın miqdarının artması və eyni zamanda antioksidant müdafiə sistemi fermentlərinin aktivliyinin zəifləməsi ilə əlaqədardır.

Bizim apardığımız tədqiqatlarda UB-B şüalarının maya göbələyi hüceyrə

rələrində lipidlərin peroksidləşmə prosesinə (LPO) təsiri öyrənilmişdir [7].

Müəyyən olunmuşdur ki, UB-B şüalarının təsirindən sonra maya göbələyi hüceyrələrində malondialdehidinin (MDA) miqdarı dozadan asılı olaraq artır (0.7×10^4 - 4.5×10^4 erq/mm²). MDA-nın miqdarının artması LPO prosesinin sürətlənməsini göstərir. 3.0×10^4 erq/mm² doza ilə şüalanmış hüceyrələrdə MDA miqdarı kontroldan 2 dəfə çoxdur və ən yüksək qiymətlə xarakterizə olunur. Hüceyrələrə UB-B şüalarının daha yüksək dozasının (3.7×10^4 erq/mm²) təsirindən sonra MDA miqdarı azalır [7].



Şəkil 4. Maya göbələyi hüceyrələrində LüsXL-nin UB-B şüalarının dozasından asılılığı

Ədəbiyyatdan məlumdur ki, MDA oksidləşdirici stress üçün bir göstəricidir [3]. *C.guilliermondii* maya göbələyi hüceyrələrinə UB-B şüalarının yüksək dozalarının təsiri zamanı MDA miqdarının azalmasını hüceyrənin funksional halının tamamilə zəifləməsi və ya reparasiya proseslərinin aktivləşməsi ilə əlaqələndirmək olar.

Beləliklə, UB-B şüalarının təsirindən sonra maya göbələyi hüceyrələrinin plazmatik membranında NADPH-oksidadza ferment kompleksinin aktivləşməsi aşkar edilmişdir. Aldığımız nəticələr maya göbələyi hüceyrələrində NADPH-oksidadzanın UB-B şüalarının mühüm fotoaktivatorlardan biri olduğunu güman etməyə imkan verir.

ƏDƏBİYYAT

1. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная Хемилюминесценция //Успехи биологической химии, т. 49, 2009, с. 341-388.
2. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика // Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. М., 2013, с. 6-7.
3. Рощупкин Д.И., Анасов А.К., Мургина М.А., Лоркипанидзе А.Т. Фотопревращение

мембранных липидов и его роль в изменении функции биомембран под действием УФ-излучения //Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения М.: Наука, 1988, т. 29, с. 79-93.

4. Afanas'ev IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal'chik EV, Korkina LG. Direct enzymatic reduction of lucigenin decreases lucigenin-amplified chemiluminescence produced by superoxide ion. *Luminescence*. 2001; 16: 305–307
5. Jurga Sakalauskaite., Pranas Viskelis., Edita Dambrauskiene, Sandra Sakalauskait. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, v.93. №6. p. 1266-1271.
6. Yixiang Lan, Chao wang, Fan Yuan et al. Chemiluminescence of lucigenin/riboflavin and its application for selective and sensitive dopamine detection *Anal. chem.* 2019, 91, 3, 2135–2139
7. Kocharli N.K, Gummatova S.T. Influence of Ultraviolet-B rays and temperature on functional activity in yeast cells //Journal of Qafqaz University. Chemistry and biology 2016, v.4, p. 53-59
8. Liochev SI and Fridovich I Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry*. .Vol. 94, pp. 2891–2896, April 1997
9. Matveeva NS, Liubitskii OB, Osipov AN, Vladimirov IuA. Lucigenin-enhanced chemiluminescence of the animal tissues *Biofizika*. Nov-Dec 2007;52(6):1120-7.
10. Tor O.B. Aasen. Lucigenin-dependent chemiluminescence in monocular phagocytes. Role of superoxide anion //Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2017, v.47. p.673-679.
11. / Rahime Aslankoc, Deniz Demircip Oksidatif stresdurumunda antioksidan enzimlerin rolu –superoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve glutation peroksidaz (GPX). *Med J SDU/SDÜ Tip Fak Derg.* 2019,26(3),p.362-369 DOI: 10.17343/sduftd.566969

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ -В ЛУЧЕЙ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЛЮЦИГЕНИНА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Н.К.КОЧАРЛИ, С.Т.ГУММАТОВА

РЕЗЮМЕ

Целью настоящей работы является изучение интенсивности хемилюминесцентной (ХЛ) реакции люцигенина-нитрат бис-N -метиلاكридиния (Люц ++) в клетках дрожжей подвергнутых воздействию различных доз ультрафиолетовых-В (УФ-В) лучей ($2.2 \cdot 10^4$ эрг/мм²; $3.0 \cdot 10^4$ эрг/мм² ; $3.7 \cdot 10^4$ эрг/мм²; $4.5 \cdot 10^4$ эрг/мм²). Исследование супероксидного радикала методом ХЛ характеризует не концентрацию радикалов, а скорость реакции в которой они образуются. Установлено, что с увеличением дозы УФ-В лучей интенсивность хемилюминесценции люцигенина и выход ХЛ по сравнению с контролем увеличивается в зависимости от дозы. Выявлено, что после воздействия УФ-лучей активируется NADPH- оксидазный ферментный комплекс в плазматической мембране клеток дрожжей.

Ключевые слова: Хемилюминесценция (ХЛ), Люцигенин (Люц++), Малоновый диальдегид (МДА), Ультрафиолетовые лучи (УФ-В), Перекисное окисление липидов (ПОЛ).

THE EFFECT OF UV-B RAYS ON LUCYGENIN CHEMILUMINESCENCE IN YEAST CELLS

N.K.KOCHARLI, S.T.GUMMATOVA

SUMMARY

The aim of studied work is to find out the intensity of Lusegenin (Lus ++) (bis-N-methylacridinium nitrate-) chemiluminescence (CHL) reaction in yeast cells affected by different doses of UV-B rays ($2.2 \cdot 10^4$ erg / mm²; $3.0 \cdot 10^4$ erg / mm²; $3.7 \cdot 10^4$ erg / mm²; $4.5 \cdot 10^4$ erg / mm²). The investigation of superoxide-anion radicals by CHL method characterizes not the concentration of radicals, but the rate of their participating reaction. It has been determined that as the dose of UV-B rays increases, the chemiluminescence intensity of Lucigen and the peak area increases depending on the dose compared to the control sample. Thus, the activation of the enzyme complex NADPH-oxidase in the plasma membrane of yeast cells after exposure to UV-B rays was identified.

Key words: Lucygenin, chemiluminescence, UV radiation, lipid peroxidation, yeast cells