

UOT 535.371

**TEMPERATUR STRESİNİN MAYA GÖBƏLƏYİ HÜCEYRƏLƏRİNDƏ  
OKSİGENİN FƏAL FORMALARININ MİQDARINA TƏSİRİ****N.K.KÖÇƏRLİ, S.T.HÜMMƏTOVA, G.E.RÜSTƏMOVA***Bakı Dövlət Universiteti**natella.kocharli@gmail.com, sam\_bio@mail.ru*

*Təqdim olunan işin məqsədi temperatur stresinin maya göbələyi hüceyrələrinə təsirdən sonra oksigenin fəal formalarının (OFF) miqdarının dəyişməsi ilə hüceyrələrin yaşama qabiliyyəti arasında qarşılıqlı əlaqəni tədqiq etməkdir. Müəyyən olunmuşdur ki, temperatur stresi (40 -50° C) Candida guilliermondii maya göbələyi hüceyrələrində OFF miqdarının artmasına səbəb olur. OFF miqdarının artmasını onların təsiri nəticəsində hüceyrələrdə 2,7 -dixlorflüoressteinin (DCF) kontrolla müqayisədə flüoressensiya intensivliyinin yüksəlməsi və antioksidant - askorbin turşusunun DCF flüoressensiyasını zəiflətməsi subut edir. Həmçinin hüceyrələrin temperatur stresindən əvvəl antioksidant və ya 2,4 -dinitrofenol (DNF) protoforu ilə işlənilməsi onların yaşama qabiliyyətini artırır. Güman edilir ki, DNF yüksək qatılıqları hüceyrələrin temperaturun təsirinə qarşı davamlılığında mühüm rol oynayan digər funksiyalara mənfə təsir göstərir.*

**Açar sözlər:** oksigenin fəal formaları (OFF), temperatur stresi, DCF flüoressensiyası, maya göbələyi hüceyrələri

Oksigenin fəal formalarının miqdarının artması hər hansı stress amilin təsirinə qarşı canlı orqanizmin universal cavab reaksiyasıdır. Şəraitdən asılı olaraq OFF canlı orqanizmdə müdafiə mexanizmlərinin aktivləşməsinə və ya hüceyrələrin ölümünə səbəb ola bilər. Butun canlı orqanizmlərdə oksidləşmə - reduksiya reaksiyaları baş verir ki, onların da məhsulları OFF /6/ . Hüceyrədə yaranan OFF əsasən sinqlet oksigeni ( $O_2^-$ ), superoksid radikalı ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogen peroksidi ( $HO_2^{\bullet}$ ), hidrosil radikalını ( $OH^{\bullet}$ ) göstərmək olar /7/.

Ədəbiyyat məlumatına görə yüksək temperaturun təsiri nəticəsində bitki hüceyrələrində hidrogen peroksidin miqdarı artır /16, 24, 26/. Bu proses hüceyrələrdə antioksidant fermentlərinin artmasına həm də azalmasına səbəb olur /16, 26 /. Heyvan və maya göbələyi hüceyrələrində OFF əsas mənbəyi mitoxondri hesab olunur /15, 18/. Mitoxondridə OFF əsasən oksidləşdirici fosforlaşma zamanı yaranır, lakin hər hansı stress nəticəsində mitoxondridə OFF miqdarı daha sürətlə artır /19, 25/. Ədəbiyyat məlumatına görə OFF tənəffüs zənciri komponentləri və əsasən kompleks I və kompleks III tərəfindən sintez

olunur. Müəlliflər tərəfindən müəyyən olunmuşdur ki, *Saccharomyces cerevisiae* hüceyrələrindən ayrılmış mitoxondridə, OFF əsas mənbəyi NADH-dehidrogenazalardır /4, 9, 10 /.

OFF bioloji strukturları (zülal, lipid, nüklein turşuları) zədələyərək hüceyrədə baş verən fizioloji-biokimyəvi prosesləri pozur /3/. OFF hüceyrə membranında lipidlərə təsir edərək peroksidləşməyə səbəb olur və nəticədə membranın funksiyaları pozulur və keciriciliyi artır /1/. Hüceyrələrin normal yaşama qabiliyyətinin saxlanılması üçün ATF sintezini qorumaq şərti ilə tənəffüsü oksidləşdirici fosforlaşmadan qismən ayırmaqla OFF miqdarını azaltmaq mümkündür /20, 13, 22 /. Bu mexanizm “yumşaq ayırma” (“mild” uncoupling) adlanır. Mitoxondri membranının  $H^+$  protonları üçün keciriciliyini artırmaqla buna nail olunur və nəticədə oksigendən istifadə olunma artır. Oksigenin qatılığının azalması hesabına OFF yaranması prosesi zəifləyir.

Bu usulla OFF istehsalının azalması hüceyrələrdə qocalmanın potensial ləngimə mexanizmidir /8, 17/. DNF “yumşaq ayırıcı” qatılıqlarının təsiri nəticəsində hüceyrə kulturasının böyümə və ölüm kinetikasi dəyişmiş və yaşama qabiliyyəti artmışdır. Ehtimal olunur ki, optimal qatılıq  $5 \cdot 10^{-7}$  до  $5 \cdot 10^{-5}$  M diapazonundadır. Maya göbələyi hüceyrələrində qocalma prosesi öyrənilərkən, müəyyən edilmişdir ki, DNF həm xronoloji və həm də replikativ yaşama müddətini artırır /14 /. Qeyd edilmişdir ki, DNF müxtəlif model obyektlərə müsbət təsirinə baxmayaraq, o cox kiçik diapazonda olan qatılıqlarda müsbət təsir göstərir.

Ədəbiyyatda temperatur stressi zamanı hüceyrədə OFF artması ilə onların yaşama qabiliyyəti arasında qarşılıqlı əlaqə barədə fikirlər ziddiyyətlidir. Temperaturun hüceyrələrə təsiri zamanı bu cavab reaksiyasının mexanizminin öyrənilməsi praktiki əhəmiyyətə malikdir.

Təqdim olunan işin məqsədi temperaturun maya göbələyi hüceyrələrinə təsiri zamanı OFF yaranması ilə hüceyrələrin yaşama qabiliyyəti arasında qarşılıqlı əlaqəni tədqiq etməkdir.

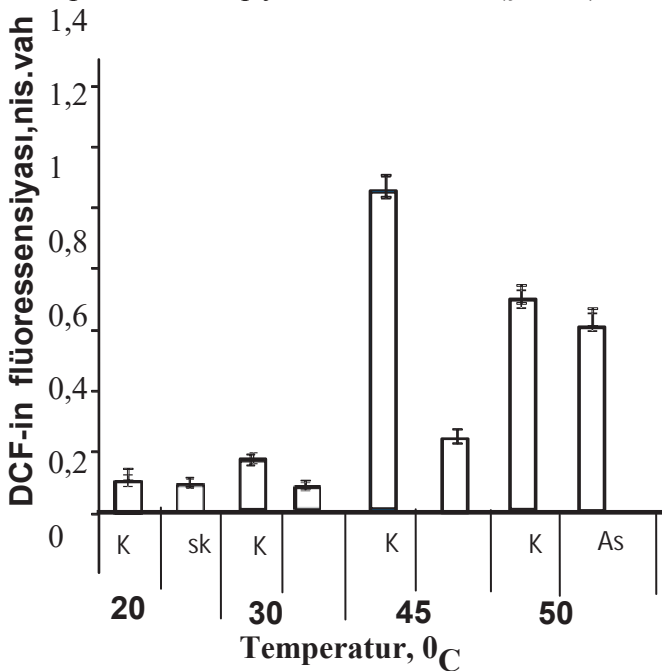
### **Tədqiqat obyekti və metodları**

Təcrübələrdə *Candida guilliermondii* maya göbələyi hüceyrələrindən istifadə olunmuşdur. Maya göbələyi hüceyrədə baş verən prosesləri, həmçinin stressə qarşı cavab reaksiyasını öyrənmək üçün əlverişli model obyektidir. OFF miqdarını təyin etmək üçün 2,7-dixlorhidroflüoresstein diasetat ( $H_2DCFH-DA$ , Molecular Probes) istifadə olunmuşdur /11, 12/. Bu flüoressensiyaedici maddə deyil, lakin OFF təsiri nəticəsində flüoressensiyaedici 2,7-dixlorflüoressteinə (DCF) çevrilir. Hüceyrə suspenziyasına 5 mkM qatılıqda  $H_2DCFH-DA$  əlavə edilmişdir və 10 dəq inkubasiya olunmuşdur. Hüceyrələr fosfat buferi ilə yuyulduqdan sonra analiz edilmişdir. OFF spektrofliorimetrik üsulla təyin edilmişdir, həyəcanlandırıcı işığın dalğa uzunluğu  $\lambda_{həyəc} = 488$  nm, emissiyanın dalğa uzunluğu isə  $\lambda_{em} = 520$  nm olmuşdur. Maya göbələyi hüceyrələrinin yaşama qabiliyyəti makrokoloniya üsulu ilə təyin edilmişdir.

### Alınan nəticələr və onların müzakirəsi

Ədəbiyyatdan məlumdur ki, temperatur stressi maya göbələyi hüceyrələrində OFF formalarının artmasına səbəb olur /4, 9, 10, 23/. Maya göbələyi hüceyrələrinə 45°C temperaturun 30 dəqiqə müddətində təsirindən sonra öyrənilən parametrlərdə baş verən dəyişikliklər təhlil edilmişdir.

Müəyyən edilmişdir ki, kontrol hüceyrələrdə OFF miqdarı azdır (şəkil 1). Temperaturun təsirindən (45°C, təsir müddəti 30 dəqiqə) OFF miqdarı artır. Kontrol hüceyrə suspenziyasına antioksidləşdirici-askorbin turşusu əlavə olunduqda DCF flüoressensiyasının intensivliyi ilə xarakterizə olunan OFF miqdarına təsir etmir. Lakin temperaturun hüceyrələrə təsiri zamanı askorbin turşusu OFF miqdarının azalmasına effektiv təsir göstərir. Aydın olmuşdur ki, temperaturun təsir müddəti artdıqca (45°C, təsir müddəti 15-60 dəqiqə) maya göbələyi hüceyrələrinin yaşama qabiliyyəti azalır (şəkil 2). Həmin hüceyrə suspenziyasına askorbin turşusu əlavə olunduqda hüceyrələrin temperaturun təsirinə qarşı davamlılığı artır. Temperaturun (50°C, 30 dəq.) təsirindən hüceyrələrin yaşama qabiliyyəti xeyli azalır, lakin 50°C temperaturda hüceyrədə OFF miqdarı 45°C temperaturla müqayisədə daha azdır (şəkil 1).

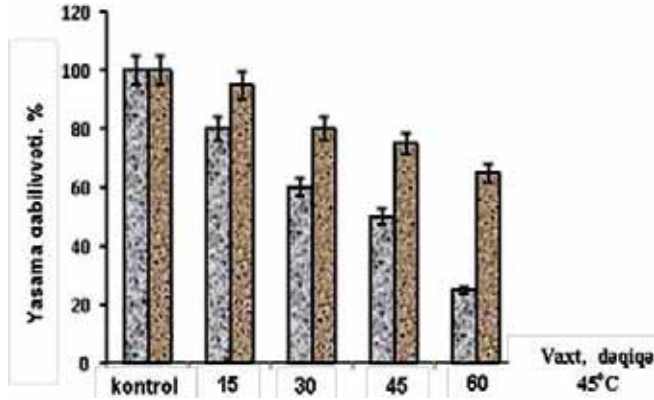


Şək. 1. Temperatur stressinin (30- dəqiqə) maya göbələyi hüceyrələrində OFF əmələ gəlməsinə təsiri

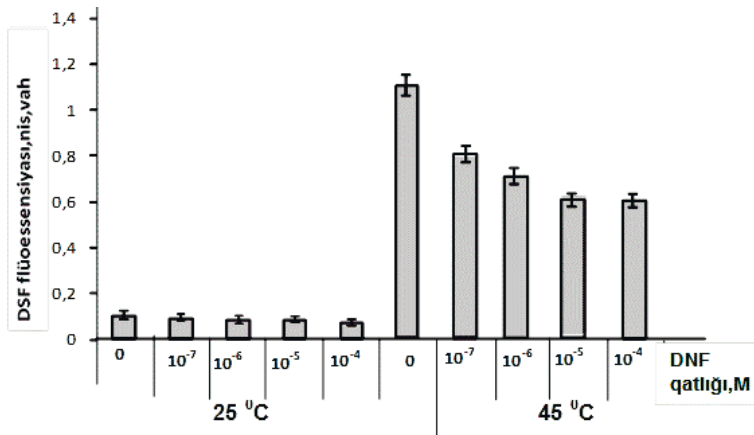
Təcrübədə alınmış nəticələrə əsasən güman edilir ki, mülayim temperaturun hüceyrələrə təsiri zamanı onların ölümünün əsas səbəblərindən biri OFF miqdarının artmasıdır. Sərt temperaturun təsiri zamanı isə hüceyrələrin ölümü fərqli mexanizm ilə inkişaf edir.

Təqdim olunan işdə temperaturun maya göbələyi hüceyrələrinə təsiri zamanı klassik protonofor 2,4-dinitrofenolun (DNF) OFF miqdarına və hüceyrələrin yaşama qabiliyyətinə təsiri öyrənilmişdir. Aşkar edilmişdir ki, DNF qatılığı ( $1 \times 10^{-6}$  M –  $1 \times 10^{-4}$  M) artdıqca onun OFF coxalmasını zəiflətmək qabiliyyəti yüksəlir (şəkil 3).

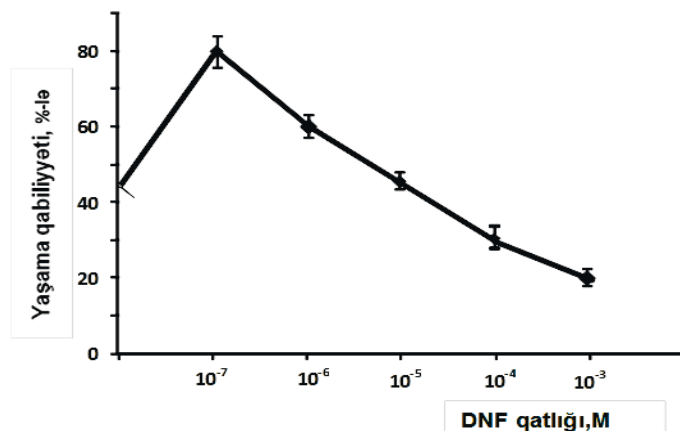
Lakin DNF kiçik qatılıqda  $1 \times 10^{-7}$  M maya göbələyi hüceyrələrin yaşama qabiliyyətini temperaturun ( $45^{\circ}\text{C}$ ) zədələyici təsirindən qoruyur və protektor xüsusiyyətinə malikdir (şəkil 4). Lakin DNF daha yüksək qatılıqda ( $1 \times 10^{-4}$  –  $1 \times 10^{-3}$  M) protektor xüsusiyyətinə malik deyildir.



Şəkil 2. Temperatur stresinin  $45^{\circ}\text{C}$  maya göbələyi hüceyrələrinin yaşama qabiliyyətinə təsiri  
 kontrol;  skorbin turşusu



Şəkil 3. DNF-un temperatur stresindən sonra maya göbələyi hüceyrələrində OFF əmələ gəlməsinə təsiri



Şəkl. 4. DHF-un temperatur stresindən sonra maya göbələyi hüceyrələrinin yaşama qabiliyyətinə təsiri

Əvvəllər apardığımız tədqiqatlar nəticəsində müəyyən olunmuşdur ki, DNF yüksək qatılıqları ( $1 \times 10^{-4}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M) ilə təsir edilmiş maya göbələyi hüceyrələrində narıncı akrininin m-san gecikmiş işıq emissiyasının intensivliyi azalır /2/.

DNF həmin qatılıqları hüceyrədə oksidləşməni fosforlaşmadan ayıran qatılıqlara uyğun gəlir /21/. Güman edilir ki, DNF yüksək qatılıqları hüceyrələrin temperaturun təsirinə qarşı davamlılığında mühüm rol oynayan digər funksiyalara mənfi təsir göstərir.

#### ƏDƏBİYYAT

1. Гарифзянов А.Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений Современные проблемы науки и образования, 2011, № 2, с. 21.
2. Гумматова С.Т., Кочарли Н.К., Абдуллаев Х.Д., Зейналова Н.М. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей. Фундаментальные исследования, 2011, №11, с.590-593.
3. Нилова И.А., и др Образование АФК в листьях пшеницы при воздействии высоких температур Труды Карельского научного центра РАН, 2019, №12, с.119-126.
4. Федосеева И.В. и др Эффект амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия, 2012, т. 77, №1, с. 99–109.
5. Adam-Vizi V. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species // Trends Pharmacol. Sci. 2006, v. 27, N 12, p. 639–45.
6. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, Annu. Rev. Plant Biol., 2004, v. 55, p. 373–399.
7. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, Physiol., 2006, v. 141, N 2, p. 391–396.
8. Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing // Exp. Gerontol. 2000, v. 35, N 6–7, p. 811–820.
9. Cao J. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production, Yeast. 2013, v. 30, N 4, p. 129–44.
10. Davidson J.F. et al Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, v. 93, N 10, p. 5116–5121.
11. Eruslanov. E. and S. Kusmartsev Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry // Methods Mol. Biol. 2010, v. 594, p. 57–72.

12. Kalyanaraman B., et al // Free radical biology & medicine. 2011, v. 52, № 1, pp. 1-6.
13. Korshunov S.S. et al High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // FEBS Lett. 1997, v. 416, N 1, p. 15–18.
14. Mookerjee S.A., et al Mitochondrial uncoupling and lifespan // Mech. Ageing Dev. 2010, v. 131, N 7–8, p. 463–472.
15. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species Biochem. J. 2009, v. 417, N 1, p. 1–13.
16. Nahar K. Et al Insights into spermine-induced combined high temperature and drought tolerance in mung bean: osmoregulation and roles of antioxidant and glyoxalase system. Protoplasma. 2017, v. 254, p. 445–460. doi: 10.1007/s00709-016-0965-z
17. Papa S. and Skulachev V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging // Detection of mitochondrial diseases, v. 21 / Eds. F.N. Gellerich and S. Zierz. Boston: Springer, 1997, p. 305–319.
18. Rigoulet M. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling, Antioxid. Redox Signal. 2011, v. 14, N 3, p. 459 – 468.
19. Schwarzländer M. et al Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge Biochim. Biophys. Acta. 2009, v. 1787, N 5, p. 468–75.
20. Skulachev V.P. Role of uncoupled and noncoupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants // Biophys. 1996, v. 29, N 2, p. 169–202.
21. Skulachev V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics // Biochimica et Biophysica Acta. 1998, № 2 (1363), c. 100–124.
22. Starkov A.A. “Mild” uncoupling of mitochondria // Bioscience Rep. 1997, v. 17, N 3, p. 273–279.
23. Sugiyama K. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*, Biochem. J. 2000, v. 352, N 1, p. 71–78.
24. Zhang X., et al Physiological and transcriptional analyses of induced post-anthesis thermotolerance by heat-shock pretreatment on germinating seeds of winter wheat. Environ. Exp. Bot. 2016, v. 131, p. 181–189. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.08.002
25. Zhang L. et al Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis* / J. Exp. Bot. 2009, v. 60, N 7, p. 2073–2091.
26. Zhao Q., et al Involvement of CAT in the detoxification of HT-induced ROS burst in rice anther and its relation to pollen fertility. Plant Cell Reports. 2018, v. 37, p. 741–757. doi:10.1007/s00299-018-2264-y

## **ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА КОЛИЧЕСТВО АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ**

**Н.К.КОЧАРЛИ, С.Т. ГУММАТОВА, Г.Э.РУСТАМОВА**

### **РЕЗЮМЕ**

Целью настоящей работы является изучение взаимосвязи между выживаемостью и изменением количества активных форм кислорода (АФК) после влияния температурного стресса на клетки дрожжей. Установлено, что температурный стресс (40-50° С) вызывает в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* усиление продукции АФК. Об этом свидетельствует повышение интенсивности флуоресценции 2,7- дихлорфлуоресцеина (DCF) по сравнению с контролем, а также способность антиоксиданта-аскорбиновой кислоты подавлять флуоресценцию DCF. Кроме того, снижение количества

АФК в результате обработки антиоксидантом или протонифором -2,4 динитрофенол (ДНФ) клеток дрожжей до температурного стресса способствует сохранению их жизнеспособности. Предполагается, что ДНФ при высоких концентрациях может отрицательно влиять на те функции, клеток, которые имеют существенную роль в устойчивости клеток дрожжей к температурному стрессу.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода (АФК), флуоресценция DCF, температурный стресс, клетки дрожжей

## **THE INFLUENCE OF TEMPERATURE STRESS ON THE AMOUNT OF ACTIVE FORMS OF OXYGEN IN THE YEAST CELLS**

**N.K.KOCHARLI, S.T.GUMMATOVA, G.E.RUSTAMOVA**

### **SUMMARY**

The purpose of this study is to investigate the interaction between the change in the amount of active forms of oxygen (AOF) and the viability of cells after the temperature stress influence on the yeast cells. It has been found that temperature stress (40 -50° C) causes an increase in the amount of AOF in *Candida guilliermondii* yeast cells. The increase in the amount of AOF is evidenced by their effect on the increase of fluorescence intensity in cells compared to the control of 2,7 - dichlorofluorescein (DCF) and the weakening of the antioxidant - ascorbic acid DCF fluorescence. Also, treatment of cells with antioxidants or 2,4-dinitrophenol (DNF) protonophores before temperature stress increases their viability. It is supposed that high concentrations of DNF adversely affect other functions that play an important role in the resistance of cells against the effects of temperature.

**Key words:** reactive oxygen species (ROS), DCF fluorescence, temperature stress, yeast cells