

БИОФИЗИКА

УДК 582.282.23.04.535.31

ИНДУЦИРОВАННОЕ КРАСНЫМ СВЕТОМ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Е.В. Пиняскина, Н.С. Беленикина, Г.Я. Фрайкин, А.Б. Рубин

(кафедра биофизики)

Известные в настоящее время процессы фотоиндуцированной реактивации и защиты клеток (Fraikin, 1992; Sancar, 1990) направлены на устранение либо предотвращение образования только одного типа летальных фотопродуктов — пиримидиновых димеров, образующихся в ДНК при действии дальнего и средневолнового ультрафиолетового (УФ) излучения (220—320 нм). До сих пор отсутствуют сведения о фотоиндуцированном повышении жизнеспособности клеток, инактивированных ближним УФ излучением (320—380 нм) и видимым светом (400—600 нм). В отличие от коротковолнового УФ летальное действие этих видов оптического излучения осуществляется по фотодинамическому механизму с участием эндогенных сенсibilизаторов и генерируемых ими активных форм кислорода, которые индуцируют образование повреждений, отличных от пиримидиновых димеров, ДНК (Peak et al., 1984; Бурчуладзе, Фрайкин, 1991; Fraikin et al., 1996).

Задача настоящей работы состояла в выявлении эффектов фотовосстановления дрожжевых клеток при их фотодинамической инактивации оптическим излучением в диапазоне 320—380 нм и 400—600 нм.

Материалы и методы

В работе исследовали дрожжи *Candida guilliermondii* ВСБ-656 (культура получена во ВНИИсинтезбелок) и *Saccharomyces cerevisiae*: дикий штамм (wt-71α) и два его мутанта: дефицитный по эксцизионной репарации ДНК штамм rad-3-2 (X36В-3А) и дефицитный по пострепликативной репарации ДНК штамм rad 50-1 (g218/4d), любезно предоставленные И.П. Арман (Институт молекулярной генетики РАН).

Культуры дрожжей выращивали по стандартной схеме (Страховская и др., 1993). Перед облучением клетки логарифмической фазы роста центрифугировали, отмывали и разводили минеральной средой (Страховская и др., 1993) с 1% сахарозы до концентрации 10^5 кл/мл. Облучение проводи-

лось при 22 ° и постоянном перемешивании суспензии.

Источником излучения служила ртутная лампа высокого давления (ДРШ-1000). Монохроматический свет в диапазоне 400—730 нм получали с помощью дифракционного спектрографа (линейная дисперсия 1 нм/мм). Рассеянное излучение более коротких длин волн отсекали фильтром БС-7. Интенсивность монохроматического света была выравнена и составляла $\sim 0,2$ Вт/м². Для выделения света разных спектральных областей использовали следующие комбинации светофильтров: БС-5 + УФС-6 (ближний УФ, 320—380 нм), ЖС-10 + СЗС-21 (видимый свет, 400—600 нм), УФС-2 + ЖС-3 (средневолновый УФ, 290—320 нм). Излучение фокусировалось на кварцевую пробирку с объектом, помещенную в закрытый термостатируемый держатель на расстоянии 15 см от лампы. Интенсивность излучения на уровне образца составляла: для ближнего УФ — 15 Вт/м², видимого света — 60 Вт/м², средневолнового УФ — 5 Вт/м². Интенсивность света измеряли высокочувствительным термoelementом Hilger FT 16.1/622 (Англия), откалиброванным по гальванометру Ф116/1. Выживаемость клеток определяли методом микроколоний (Корогодина, 1958).

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния монохроматического света в диапазоне 400—730 нм на клетки (*C. guilliermondii*), инактивированные ближним УФ излучением (320—380 нм), обнаружено, что свет красной области спектра (610, 630, 660, 680, 710 нм) значительно увеличивает их выживаемость. Поскольку было установлено (данные не приведены), что наибольшей активностью в проявлении фотореактивации дрожжей обладает свет с длиной волны 680 нм, мы в последующем изложении обозначим ее как ΦP_{680} .

Типичная кривая, характеризующая зависимость фотовосстановления жизнеспособности клеток от дозы облучения красным светом (680 нм), приведена на рис. 1, из которого видно, что максимальный

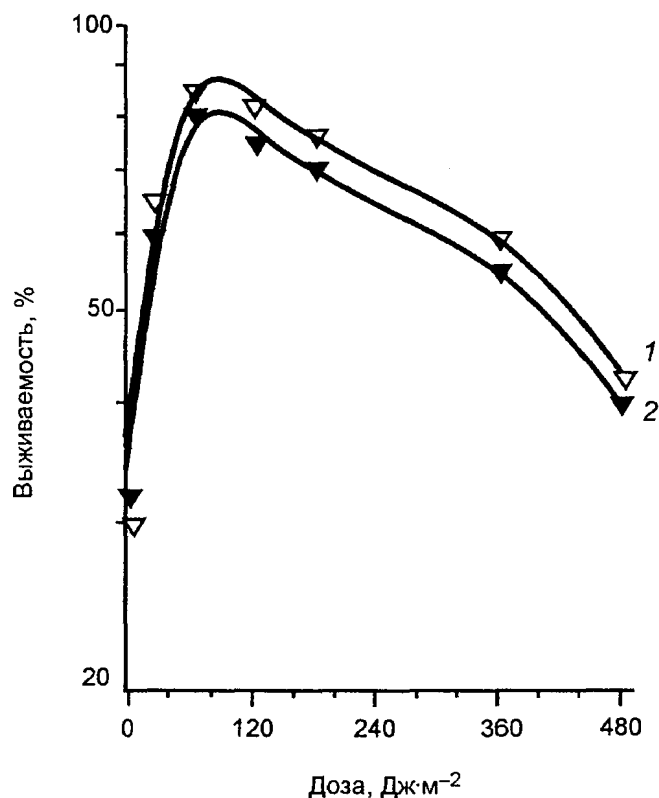


Рис. 1. Зависимости фотовосстановления клеток *C. guilliermondii*, инактивированных ближним УФ (320–380 нм; 70 кДж/м²), от дозы облучения монохроматическим светом 680 нм при 22 °C (1) и 4 °C (2)

уровень ΦP_{680} достигается уже при кратковременном (несколько мин) воздействии монохроматического света в малых дозах. С увеличением времени (дозы) облучения эффективность ΦP_{680} снижается.

Следует отметить, что установленная форма дозовой кривой ΦP_{680} аналогична форме соответствующих кривых, полученных нами ранее при изучении индуцированного монохроматическим красным светом восстановления дрожжей *C. guilliermondii*, инактивированных средневолновым УФ излучением (290–320 нм) (Фрайкин и др., 1995). Кроме того, мы показали, что на эффективность ΦP_{680} при ближней УФ инактивации клеток, как в случае действия средневолнового УФ излучения (Фрайкин и др., 1995), не влияет понижение температуры до 4 °C во время облучения монохроматическим светом (см. рис. 1). Эти данные позволяют считать, что в фотовосстановлении клеток при летальном действии ближнего УФ излучения участвует та же чувствительная к красному свету система, что и при действии средневолнового УФ излучения. Это в свою очередь свидетельствует о том, что данная система активна не только в отношении пиримидиновых димеров, но и фотодинамических повреждений ДНК, например одноцепочечных разрывов, которые при ближнем УФ облучении играют важную роль в инактивации клеток (Peak et al., 1984; Бурчуладзе, Фрайкин, 1991).

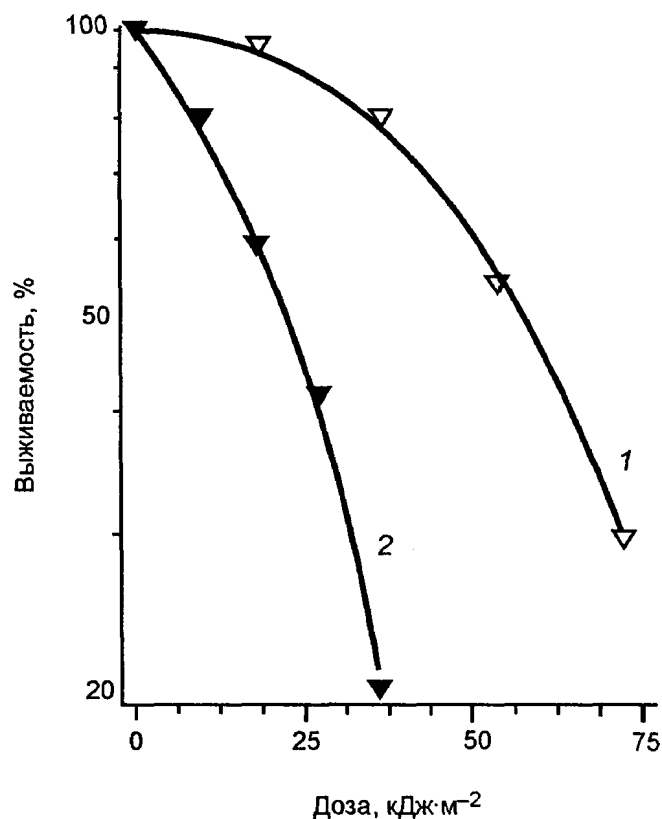


Рис. 2. Кривые выживаемости клеток *S. cerevisiae*, облученных ближним УФ (320–380 нм): 1 — дикий штамм, 2 — мутантный штамм *rad 50-1*

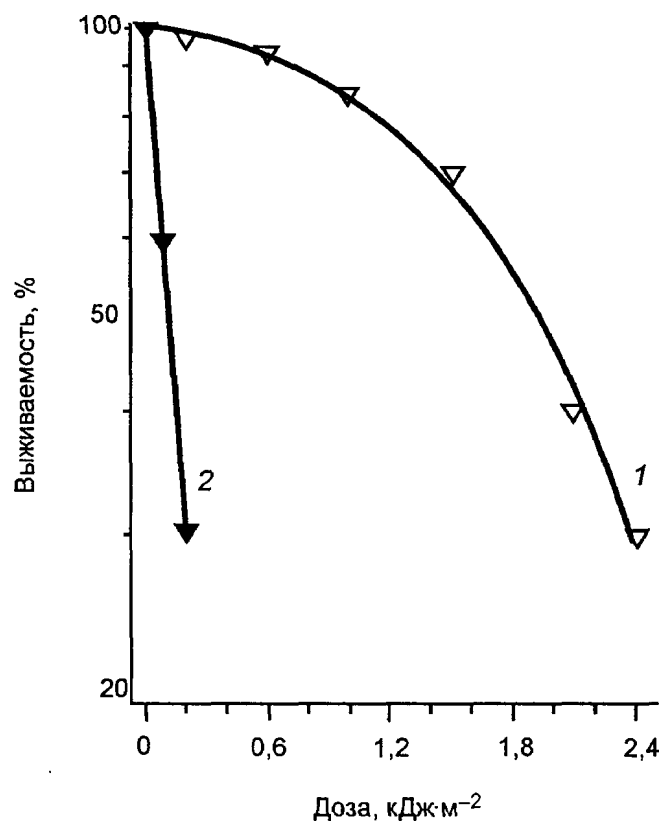


Рис. 3. Кривые выживаемости клеток *S. cerevisiae*, облученных средневолновым УФ (290–320 нм): 1 — дикий штамм, 2 — мутантный штамм *rad 3-2*

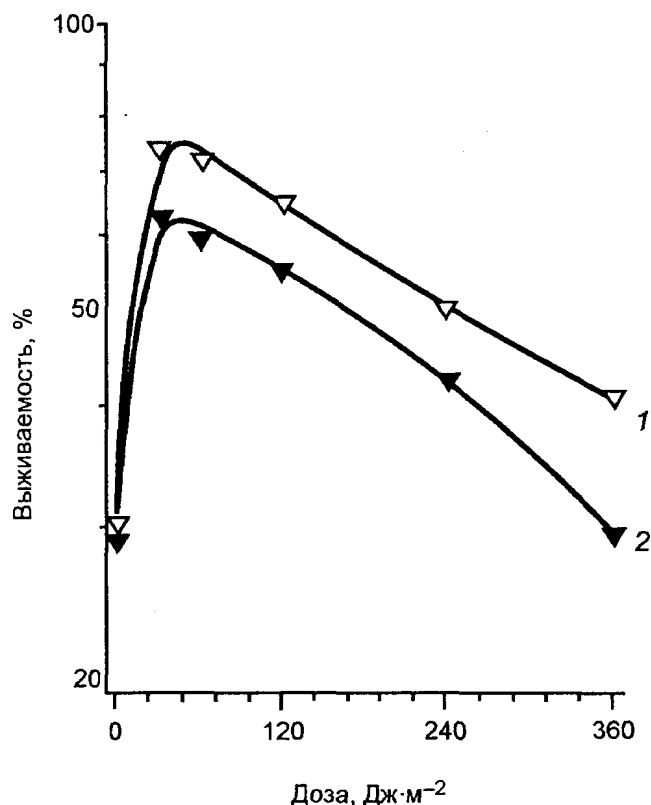


Рис. 4. Зависимости фотовосстановления клеток *S. cerevisiae*, инактивированных ближним УФ (320–380 нм), от дозы облучения монохроматическим светом 680 нм:

1 — дикий штамм, 2 — мутантный штамм rad 50-1. Дозы ближнего УФ излучения: 70 кДж/м² (1); 30 кДж/м² (2)

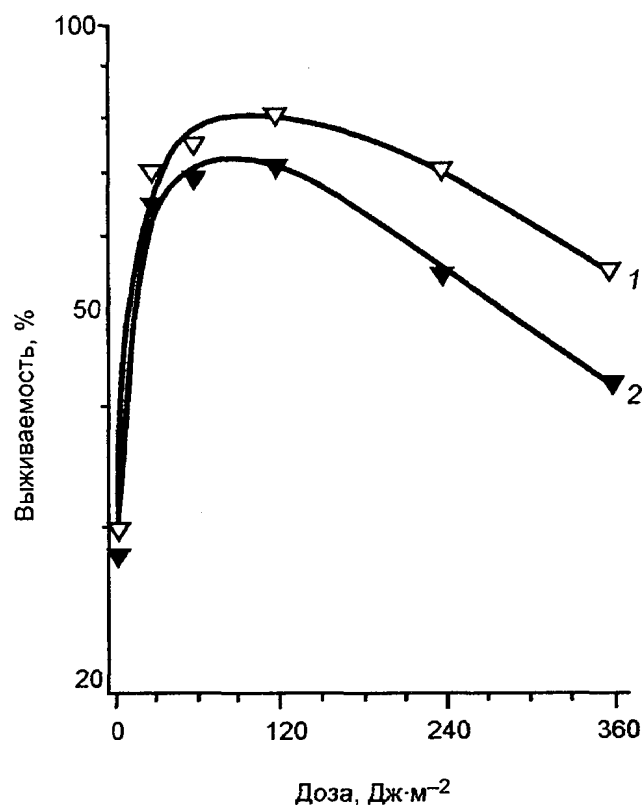


Рис. 5. Зависимости фотовосстановления клеток *S. cerevisiae*, инактивированных средневолновым УФ (290–320 нм), от дозы облучения монохроматическим светом 680 нм:

1 — дикий штамм, 2 — мутантный штамм rad 3-2. Дозы средневолнового УФ излучения: 2,4 кДж/м² (1); 0,2 кДж/м² (2)

Известно, что УФ индуцированные повреждения могут ликвидироваться системами репарации ДНК, из которых основными являются эксцизионная и пострепликативная. Поэтому представлялось целесообразным проверить, не связан ли механизм ФР₆₈₀ с фотоиндуцированной активацией этих репарационных систем.

Для решения поставленного вопроса мы исследовали способность к ФР₆₈₀ дрожжей *S. cerevisiae* — дикого штамма и его мутантов, дефицитных по эксцизионной (rad-3-2) и пострепликативной (rad 50-1) репарации ДНК. Предварительно было показано, что клетки мутантных штаммов более чувствительны к ближнему УФ (rad 50-1) и средневолновому УФ (rad 3-2) по сравнению с диким штаммом (рис. 2, 3). Опыты по фотореактивации проводились по следующей схеме: клетки дикого штамма и мутантов rad 50-1 и rad 3-2 облучали фиксированными дозами ближнего УФ или средневолнового УФ, снижавшими их выживаемость до одного и того же уровня (~30%), после чего их подвергали воздействию монохроматического света 680 нм. Как следует из полученных данных (рис. 4, 5), ФР₆₈₀ мутантных штаммов наблюдается, причем ее эффективность примерно такая же, как и у дикого штамма. Эти данные могут указывать на то, что фотовосстановление дрожжей, инактивированных УФ излучением, осуществляет-

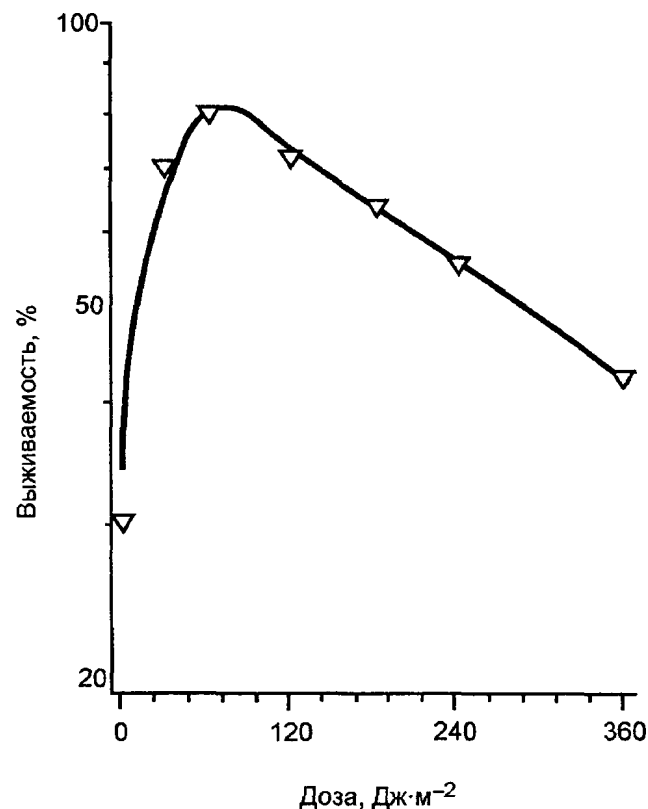


Рис. 6. Зависимость фотовосстановления клеток *C. guilliermondii*, инактивированных видимым светом (400–600 нм; 216 кДж/м²), от дозы облучения монохроматическим светом 680 нм

ся без участия эксцизионной и пострепликативной репарации.

Установление того факта, что действие обнаруженной нами светочувствительной реактивирующей системы неспецифично в отношении природы повреждения ДНК, привело к постановке вопроса о возможном ее участии в восстановлении клеток при образовании фотоповреждений не только в генетическом аппарате, но и в других клеточных структурах.

Ранее в наших исследованиях было установлено, что при фотодинамической инактивации дрожжей (*C. guilliermondii* и *S. cerevisiae*) большими дозами видимого света (400—600 нм) основной мишенью является не ДНК, а плазматическая мембрана (Fraikin et al., 1996). Проведенные в настоящей работе эксперименты с использованием описанных выше оптимальных при ФР₆₈₀ режимов облучения показали, что инактивированные видимым светом клетки можно восстановить при воздействии на них монохроматическим светом в области 600—730 нм с максимальной эффективностью ре-

активации при 680 нм. Принципиально важно, что типичная дозовая кривая фотореактивации в этом случае (рис. 6) имеет такой же вид, как и аналогичные дозовые кривые при ФР₆₈₀ клеток, инактивированных УФ излучением (см. рис. 1, 4, 5). Следовательно, в фотовосстановлении жизнеспособности дрожжей, инактивированных видимым светом, участвует та же светочувствительная система, что и при летальном действии УФ излучений. Иными словами, данная реактивирующая система активна не только при образовании различных повреждений ДНК, но и в случае фотодинамической деструкции плазматических мембран.

Общий характер закономерностей проявления эффектов фотовосстановления жизнеспособности дрожжевых клеток при их инактивации УФ излучениями и видимым светом свидетельствует о том, что в их основе лежит единый, ранее не известный фотоиндуцированный реактивирующий механизм, не специфичный в отношении природы летальных повреждений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бурчуладзе Т.Г., Фрайкин Г.Я. 1991. Изучение механизма НАД⁺-Н-сенсibilизируемого образования разрывов в ДНК при облучении ближним УФ светом // Молекулярная биология. 25. Вып. 4. 955—959.

Корогодин В.И. 1958. Формы инактивации дрожжевых клеток ионизирующей радиацией // Биофизика. 3. Вып. 2. 206—209.

Страховская М.Г., Иванова Э.В., Фрайкин Г.Я. 1993. Стимулирующее влияние серотонина на рост дрожжей *Candida guilliermondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* // Микробиология. 62. Вып. 1. 46—49.

Фрайкин Г.Я., Пиняскина Е.В., Страховская М.Г., Рубин А.Б. 1995. Новая фотоиндуцированная защитная система в клетках *Candida guilliermondii* при летальном действии средневолнового ультрафиолетового излучения // Докл. АН. 343. № 2. 265—267.

Fraikin G.Ya. 1992. Photoprotection by serotonin // Biological Effect of Light. Berlin; New York. P. 458—462.

Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Rubina A.B. 1996. The role of membranebound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 34. N 1. 129—135.

Peak J.G., Peak M.J., MacCoss M. 1984. DNA breakage caused by 334 nm UV-light is enhanced by naturally occurring nucleic acid components and nucleotide coenzymes // Photochem. Photobiol. 39. N 6. 713—716.

Sancar G.B. 1990. DNA photolyases: Physical properties, action mechanism and roles in dark repair // Mutat. Res. 236. 147—160.

Поступила в редакцию
14.02.06

REDLIGHT INDUCED RECOVERY OF YEAST VIABILITY UNDER PHOTODYNAMIC EFFECT OF OPTICAL RADIATION

E.V. Pinyaskina, N.S. Belenikina, G.Ya. Fraikin, A.B. Rubin

The effects of yeast photorecovery after the cell photodynamic inactivation by optical radiation of near-ultraviolet (320—380 nm) and visible (400—600 nm) ranges of the spectrum have been revealed. Red light at 680 nm possessed maximum efficiency, and the maximum levels of photoreactivation were observed upon short-term irradiation (minutes). Data obtained show for the first time a possibility of cell photorecovery under producing photodynamic damages in cellular structures.