

УДК 579.22:53.047

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *SACCHAROMICES CEREVISAE* ПОСЛЕ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ*

Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, А.В. Фомина, О.С. Воронова

Ульяновский государственный университет

В работе рассмотрено влияние фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) на параметры системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» клеток *Saccharomices Cerevisae*. Выявлено дозозависимое изменение уровня МДА, каталазы, потенциала GSH/GSSG после ФСЛИ. Методом атомно-силовой микроскопии выявлено статистически значимое снижение ригидности мембраны дрожжевых клеток после воздействия ФСЛИ.

Ключевые слова: фемтосекундное лазерное излучение, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, ригидность, *Saccharomices cerevisae*.

Введение. Изучение влияния различных физических факторов на биологическую активность ценных микроорганизмов, таких как дрожжи, имеет большое теоретическое и практическое значение. Дрожжи (*Saccharomices Cerevisae*) являются удобной моделью, применяющейся при многочисленных фото-биологических исследованиях в качестве альтернативы клеточным культурам и экспериментальным животным [13, 14]. Различают 2 основные группы способов активации дрожжевых клеток: химические (антимикробные и ферментные препараты; минеральные вещества Zn, Fe, Cu, Se) и физические (температура, оптическое излучение, ультрафиолет; комплексная обработка дрожжей молекулярным кислородом и магнитным полем и др). В серии экспериментальных работ по облучению *S. Cerevisae* доказано, что эффект лазерного воздействия на дрожжевые клетки неоднозначен, зависит от дозы, времени облучения и температурных режимов [5, 6]. В работах Ж.К. Усембаевой установлено, что лазерное излучение с длиной волны 632,8 нм может служить фактором оптимизации в управлении процессами метаболизма [4]. Э.Ш. Исмаиловым исследовано влияние лазерного излучения на рост, развитие и продуктивность дрожжевых микроорганизмов. Показано, что при определенных параметрах

лазерное излучение оказывает стимулирующее, благоприятное воздействие, которое выражается в увеличении биомассы дрожжей и повышении их энергии брожения при выращивании на жидких питательных средах [2]. Актуальным является изучение возможности использования фемтосекундных лазерных импульсов (ФСЛИ) в биомедицинских исследованиях ввиду предполагаемого отсутствия термического эффекта, высокой пиковой мощности (кВт) при низкой средней (мВт). Исследований по изучению влияния фемтосекундных лазеров на морфофункциональное состояние *S. Cerevisae* в доступной нам литературе не найдено.

Цель исследования. Оценка влияния фемтосекундного лазерного излучения на морфофункциональное состояние *S. Cerevisae*.

Материалы и методы. В исследовании использована суточная культура *Saccharomices Cerevisae*. Жидкая питательная среда для культивирования клеток состояла из 2 % сахарозы, 2 % пептона и 1 % дрожжевого экстракта. Характеристики используемого фемтосекундного лазера: длительность импульса – $82 \cdot 10^{-15}$ с; частота следования импульсов – $(200-250) \cdot 10^{-15}$ с⁻¹, средняя мощность – 1,26 мВт; пиковая мощность – 6 кВт; длина волны – 1550 нм. Облучение проводилось в пластиковых чашках Петри диаметром 35 мм на расстоянии 7 см от световода лазера. Интенсивность облучения составила $0,82$ Вт/см².

* Работа поддержана грантом государственного задания Минобрнауки России.

Плотность потока энергии при этом составила 0,49, 0,74, 1,47, 2,95 Дж/см² при экспозиции соответственно 10, 15, 30, 60 мин. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по уровню вторичного продукта – малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрически при 535 нм [1]. Активность каталазы определяли по А.И. Карпищенко [3]. Для определения соотношения глутатиона окисленного и восстановленного использовали спектрофотометрический метод, основанный на окислении GSH 2-нитро-5-тиобензойной кислотой [10]. Для оценки топологии и ригидности мембраны *S. Cerevisiae* использован метод сканирующей зондовой микроскопии (SolverPro, NT-MDT, Россия). Применялись фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0,2 Н/м, радиус закругления кончика составлял 10 нм. Дрожжевые клетки сканировались в полуконтактном режиме. Ригидность мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [8].

Статистическая значимость полученных результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, коэффициента корреляции Спирмена с применением программы Stata 6.0.

Результаты и обсуждение. Реакции биологической системы на лазерное излучение в видимой и ближней ИК-областях связаны с физическими и химическими модификациями в фотоакцепторных молекулах, компонентах дыхательной цепи [9]. Такие изменения могут быть следствием изменений окислительно-восстановительных свойств и ускорения переноса электрона, изменения биохимической активности из-за переходного локального нагрева хромофоров, одноэлектронного автоокисления. Для достижения фотобиологических макроэффектов могут быть активированы различные пути протекания реакций. Каскад клеточных биохимических реакций, следующих за основными физическими и/или химическими изменениями, индуцируется светом в фотоакцеп-

торных молекулах, которые не требуют добавочного света для активации. Эти эффекты связаны с изменениями гомеостаза клетки. Кроме того, важными являются окислительно-восстановительные процессы: увеличение окисления связано с увеличением жизнеспособности клетки, а снижение окисления – с торможением. Клетки с более низким рН, при котором окислительно-восстановительный статус снижается, более чувствительны к возбуждающему действию света, чем клетки с нормальными параметрами.

С химической точки зрения, окислительный стресс представляет собой значительное увеличение клеточного редокс-потенциала или существенное снижение восстановительной способности клеточных редокс-пар, таких как окисленный/восстановленный глутатион [7].

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о дозозависимом увеличении содержания продукта ПОЛ – малонового диальдегида, которое наблюдается только при 1,47 и 2,95 Дж/см². При небольших значениях плотности потока энергии (0,49 и 0,74 Дж/см²) данные статистически значимо от контроля не отличаются.

Изучение активности фермента эндогенной антиоксидантной системы – каталазы – в культуральной среде *S. Cerevisiae* после воздействия ФСЛИ показало, что наблюдается незначительное снижение активности исследуемого фермента, наиболее выраженное при 1,47 Дж/см² (табл. 1). Таким образом, возрастание уровня МДА при одновременном снижении активности каталазы позволяет предполагать возникновение окислительного стресса при ФСЛИ в дозах 1,47 и 2,95 Дж/см². ФСЛИ стимулирует ПОЛ только при накоплении определенной дозы световой энергии.

Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют о статистически значимом снижении ригидности и, соответственно, об увеличении упругих свойств мембраны клеток *S. Cerevisiae* после ФСЛИ. Изменения наблюдаются при всех изученных плотностях потока энергии.

Таблица 1

**Параметры системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты»
в культуре *S. Cerevisiae* после ФСЛИ при разных плотностях потока энергии**

Параметр	Контроль	Плотность потока энергии, Дж/см ²			
		0,49	0,74	1,47	2,95
Каталаза, ммоль/мин/л	0,560±0,061	0,480±0,043	0,450±0,047	0,370±0,041*	0,390±0,044*
МДА, мкмоль/л	9,68±0,43	9,74±0,50	9,57±0,49	14,06±1,25*	13,36±0,98*

Примечание. * – данные статистически значимо отличаются от контрольных.

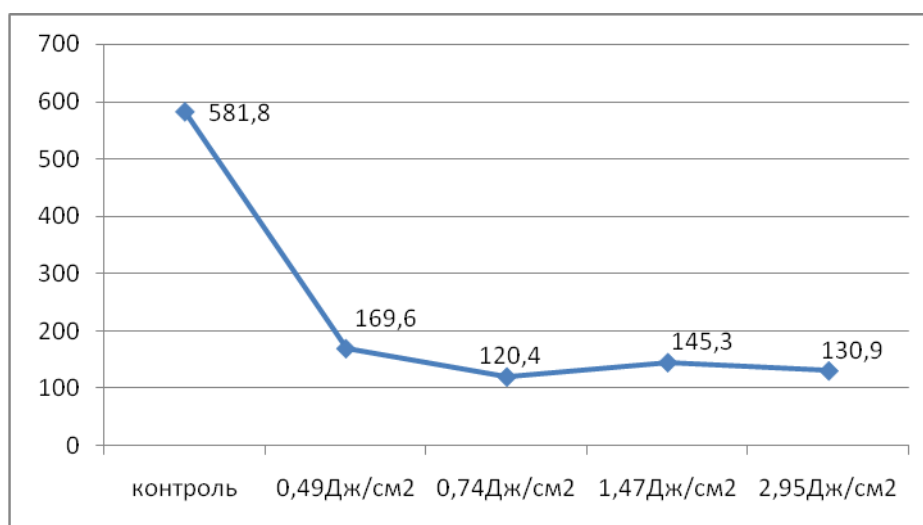


Рис. 1. Ригидность мембраны *S. Cerevisiae* после различных доз ФСЛИ

Изучение окислительно-восстановительного потенциала клеток *S. Cerevisiae* по уровню GSSG/GSH показало, что наиболее выраженные изменения наблюдаются при 0,49 Дж/см² – 0,204±0,058 и при 1,47 Дж/см² – 0,198±0,070, что статистически значимо ниже контрольных данных – 0,341±0,090. Таким образом, изменение окислительно-восстановительного потенциала *S. cerevisiae* после воздействия ФСЛИ свидетельствует о снижении уровня восстановленного глутатиона, что ряд авторов связывает с развитием оксидативного стресса [11, 12].

Анализ корреляционных связей между уровнем GSSG/GSH и процентом делящихся клеток после различных доз ФСЛИ показал, что накопление GSSG и снижение GSH, свидетельствующие о возникновении оксидативного стресса, наиболее выражены при ФСЛИ в дозах 0,49 и 1,47 Дж/см² и коррели-

руют со снижением процента делящихся дрожжевых клеток.

Заключение. Таким образом, можно предполагать возможность изменения морфофункционального состояния дрожжевых клеток при воздействии ФСЛИ в диапазоне использованных доз.

1. *Андреева Л. И.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.

2. Действие лазерного излучения на биотехнологические свойства дрожжей / Э. Ш. Исмаилов [и др.] // Вестн. Дагестанского научного центра. – 2007. – № 29. – С. 44–46.

3. *Карпищенко А. И.* Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справочник : в 2 т. / А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – 532 с.

4. Усембаева Ж. К. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на свойства дрожжей / Ж. К. Усембаева. – URL: <http://skutis.ucoz.ru/publ/26-1-0-16>.
5. Федорова Н. Н. Лазерная активация хлебопекарных дрожжей / Н. Н. Федорова, Ж. К. Усембаева, А. Н. Нусупкулова // Электронная обработка материалов. – 1970. – № 3 (33). – С. 31–32.
6. Biostimulation effects of low-energy laser radiation on yeast cell suspensions / S. Anghel [et al.] // Proc. of SPIE. – 2000. – Vol. 4068. – P. 758–764.
7. Friedmann H. SPIE Proceedings / H. Friedmann, R. Lubart // Effects of Low-Power Light on Biological Systems. – 1996. – Vol. 2630. – P. 60–64.
8. Henderson R. M. Pushing, pulling, dragging, and vibrating renal epithelia by using atomic force microscopy / R. M. Henderson, H. Oberleithner // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2000. – Vol. 278 (5). – P. 689–701.
9. Karu T. I. Biophysical basis of low-power-laser effects / T. I. Karu // Proceedings of SPIE. – 1996. – Vol. 2802. – P. 142–151.
10. Khramtsov V. V. ESR study of proton transport across phospholipid vesicle membranes / V. V. Khramtsov, M. V. Panteleev, L. M. Weiner // J. Bioch. Biophys. Methods. – 1989. – Vol. 18. – P. 237–246.
11. Shackelford R. E. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function / R. E. Shackelford, W. K. Kaufmann, R. S. Paules // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28 (9). – P. 1387–1404.
12. Shapira M. Disruption of yeast forkhead-associated cell cycle transcription by oxidative stress / M. Shapira, E. Segal, D. Botstein // Mol. Biol. Cell. – 2004. – Vol. 15 (12). – P. 5659–5669.
13. Stanescu C. Competing phenomena in laser effects on the growth of yeast cell colonies / C. Stanescu, S. Anghel // J. of Optoelectronics and Advanced Material. – 2002. – Vol. 4, № 1. – P. 129–134.
14. Tashiro H. Yeast, a convenient model system to study the biological effects of laser irradiation / H. Tashiro, G. Lazarova // Focused on Microbial Diversity. – 1993. – Vol. 3. – P. 37–38.

FUNCTIONAL STATE OF SACCAROMICES CEREVISAE AFTER FEMTOSECOND LASER IRRADIATION

D.R. Dolgova, T.V. Abakumova, A.V. Fomina, O.S. Voronova

Ulyanovsk State University

In this work the influence of femtosecond laser irradiation on the system settings “lipid peroxidation – antioxidant” cells of *Saccaromices cerevisiae* is observed. The dose-dependent changes in the level of MDA, catalase, potential GSH/GSSG after FSLI were detected. By using the atomic-force microscopy the statistically significant decrease rigidity membrane of yeast cells after exposure femtosecond laser irradiation was detected.

Keywords: femtosecond laser irradiation, lipid peroxidation, antioxidant, rigidity, *Saccaromices cerevisiae*.