

ПОРІВНЯННЯ ВМІСТУ ОКИСЛЕНОГО ТА ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ В РІЗНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae* ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСУ, ІНДУКОВАНОГО НІТРОПРУСИДОМ НАТРІЮ

У даній роботі порівнюються вміст окисленого та відновленого глутатіону у різних штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* під впливом стресу, індукованого нітропрусидом натрію. Були використані два штами *S. cerevisiae* – YPH250 і YPH250-ΔУАР1. Дріжджі обробляли нітропрусидом натрію, який є донором $^{\cdot}\text{NO}$. У безклітинних екстрактах обох штамів вимірювали вміст окисленого та відновленого глутатіону. Висловлено припущення, що обробка нітропрусидом викликає у дріжджів нітрозативний і оксидативний стрес.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, глутатіон, нітрозативний стрес, нітропрусид.

Вступ

З початку відкриття у 1970-х роках важливої фізіологічної дії оксиду азоту (NO) він, як судинорозширювач і медіатор у нервовій системі, почав інтенсивно вивчатися. З цієї причини багато донорів оксиду азоту впроваджені у медичну практику й нітропрусид натрію є одним із них. Будучи відносно нетоксичним для клітин ссавців, він клінічно використовується як судинорозширювальний засіб [11]. Оксид азоту утворюється з амінокислоти аргініну за участі складної Ca^{2+} -залежної ферментної системи зі змішаною функцією, названої NO -синтазою [1; 4]. Оксид азоту бере участь у передачі сигналів у центральній нервовій системі, регуляції запрограмованої смерті клітини [3; 4]. Біологічна дія оксиду азоту встановлена через реакцію оксиду азоту з безліччю мішеней, типу гемових і сульфгідрильних груп, залізо- чи цинковмісних кластерів [5]. $^{\cdot}\text{NO}$ реагує із сульфгідрильними групами тіолів, формуючи нітрозотіоли [4; 12]. Токсичність $^{\cdot}\text{NO}$ сильно збільшується під час реакції із супероксид-аніонрадикалом ($\text{O}_2^{\cdot -}$) [5; 7; 10]. При взаємодії із супероксидом утворюється дуже реактивний пероксинітританіон. При нейтральних значеннях рН пероксинітрит формує пероксинітритову кислоту ONOOH . Пероксинітрит проявляє бактерицидний ефект і може знешкоджувати ракові клітини, але генерація надлишку пероксинітриду призводить до окисного пошкодження [2; 4,].

Для захисту від активованих форм кисню (АФК) й активованих форм азоту (АФА) мікроорганізми розвинули кілька механізмів. Відповідь *Escherichia coli* на оксидативний стрес, індукований АФК і АФА, є висококоординувана двома добре вивченими шляхами – через SoxRS і OxyR регулони. У цих мікроорганізмів оксид азоту активує SoxRS регулон [2]. Інформація щодо ефекту оксиду азоту у дріжджів вивчена недостатньо. У клітинах дріжджів *S. cerevisiae* за захист від АФК і АФА відповідає низка

антиоксидантних ферментів, а також глутатіон і інші низькомолекулярні антиоксиданти. Глутатіон – це трипептид (γ -глутамілцистеїнілглутин). У клітині він виступає низькомолекулярним антиоксидантом, який здатний безпосередньо знешкоджувати АФК. До того ж, він є субстратом кількох антиоксидантних ферментів, зокрема глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази. Співвідношення відновленого (GSH) й окисненого (GSSG) глутатіону є надійним показником окисно-відновного стану клітини [9; 10]. Тому метою даної роботи було дослідити вміст окисненого й відновленого глутатіону у дріжджів *S. cerevisiae* за дії нітрозитивного стресу, індукованого нітропрусидом натрію.

Матеріали й методи

У дослідженні використовували штами *S. cerevisiae* YPH250 (дикий тип, МАта *trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52*) і YPH250-*ΔYAP1* (так як у YPH250, але *yap1A::HIS3*).

У роботі застосовували такі реактиви: дріжджовий екстракт (“BioGene”, Великобританія), глутатіон окислений, НАДФН, ДТНБ, ЕДТА (“Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Німеччина), нітропрусид натрію (“Reachim”, Угорщина).

Дріжджі вирощували до стаціонарної фази росту в живильному середовищі, яке містило 2% глюкози, 2% пептону й 1% дріжджового екстракту, при 28°C на шейкері (175 коливань за хвилину). Суспензію клітин дріжджів протягом однієї години обробляли розчином нітропрусиду в таких концентраціях: 0,25; 0,5; 1; 2,5 мМ. Клітини дріжджів руйнували й осаджували в охолодженій до 5°C 2,6% сульфосаліциловій кислоті у співвідношенні 1:20 (маса:об’єм), центрифугували в закритих пластикових пробірках при охолодженні на мікроцентрифузі 15 хв при 13000 об/хв. Супернатанти переливали в чисті пластикові пробірки, тримали закритими на льоді й одразу визначали вміст окисненого та відновленого глутатіону [3].

Вміст глутатіону визначали у спряженій реакції з глутатіонредуктазою за допомогою калібрувального графіка. 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота відновлюється глутатіоном; концентрація останнього підтримується на сталому рівні завдяки відновленню окисненого глутатіону глутатіонредуктазою у присутності її кофактора – НАДФН. Протікання реакції реєстрували при довжині хвилі 416 нм. Кінцева концентрація реагентів – КФБ (100 мМ), ЕДТА (1 мМ), НАДФН (0,25 мМ), ДТНБ (0,6 мМ).

Стандартний розчин GSH готувався на охолодженій 2,6% сульфосаліциловій кислоті; його вихідна концентрація становила 0,1 мМ. Об’єм проби складав 1,25 мл. У кювету додавали спочатку суміш та глутатіонредуктазу й реєстрували базову зміну оптичної густини за хвилину при довжині хвилі 416 нм ($D_{\text{контроль}}$). Потім додавали стандартний розчин GSH і повторювали визначення ($D_{\text{глутатіон}}$). Розраховували різницю між зареєстрованими змінами оптичної густини ($\Delta D/\text{хв}$).

Для побудови калібрувального графіка використовували такі концентрації глутатіону: 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2,5 мМ. Для кожної кількості визначали

$\Delta D/\text{хв}$. За отриманими показниками оптичної густини побудували калібрувальний графік: на осі абсцис відклали кількості глутатіону, на осі ординат відповідні $\Delta D/\text{хв}$. Підібрали рівняння лінійної регресії за допомогою програми Excel.

Для визначення вмісту загального глутатіону визначали швидкості реакції відновлення ДТНБ, додаючи замість стандартного розчину глутатіону супернатант у такій кількості, щоб потрапити в межі калібрувального графіка. Розраховували концентрацію загального глутатіону, використовуючи рівняння регресії і такі формули:

$$Y = a \cdot X + b, \quad (1)$$

де: Y – $\Delta D/\text{хв}$; X – вміст глутатіону (відповідає певній кількості стандартного розчину); a і b – коефіцієнти регресії. З даного рівняння знайшли вміст глутатіону у даній пробі:

$$X = (Y - b) / a \quad (2)$$

Розрахунок концентрації глутатіону у клітинах:

$$[\text{GSH}] = \frac{n \cdot V_{\text{пр.}}}{n_{\text{прен.}} \cdot \text{OD}_{600}} \cdot 2 / k, \quad (3)$$

де: $[\text{GSH}]$ – концентрація глутатіону, мкмоль/ OD_{600} ; n – вміст глутатіону, розрахований за калібрувальним графіком; $V_{\text{пр.}}$ – об'єм проби; $n_{\text{прен.}}$ – об'єм препарату; мкл; OD_{600} – початкова оптична густина в колбах; 2 – перерахунковий коефіцієнт на концентрацію стандартного розчину глутатіону; k – перерахунковий коефіцієнт.

Для визначення вмісту окисленого глутатіону в препаратах брали 0,8 мл супернатанту, інкубували протягом 1 год із 2-вінілпіридином. Під час інкубації відновлений глутатіон зв'язувався з вінілпіридином, а окислений з ним не реагував. Далі визначали вміст окисленого глутатіону. У процесі реакції окислений глутатіон відновлювався глутатіонредуктазою. Для розрахунків (GSSG) використовували формулу (3), проте значення ділили на 2, оскільки з однієї молекули окисленого глутатіону утворювалися дві молекули відновленої форми.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "Мупова". Експериментальні дані представлені як середнє значення \pm його похибка [8].

Результати й обговорення

Глутатіон це низькомолекулярний трипептид (γ -глутамілцистеїнілглутин). Більша частина внутрішньоклітинного глутатіону (85%) присутня у цитоплазмі [9; 10]. При обробці дріжджів *S. cerevisiae* нітропрусидом натрію у різних концентраціях ми встановили, що нітропрусид натрію не впливав на вміст відновленого глутатіону в обох штаммах (рис. 1).

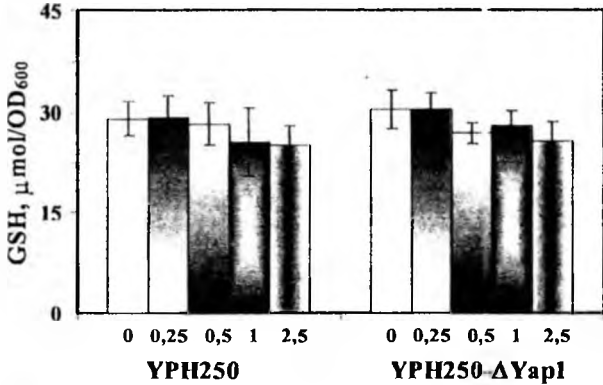


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону при обробці нітропрусидом у концентраціях 0,25-2,5 мМ.

Відновлений глутатіон (GSH) може окислюватися до дисульфіді глутатіону (GSSG) електрофільними сполуками, зокрема активними формами азоту. Окислення глутатіону відбувається у відповідь на нітрозативний стрес [9; 10; 12]. У штаму YPH250 вміст окисленого глутатіону зростає зі збільшенням концентрації нітропрусиду (рис.2). У штаму *YAP1Δ* вміст окисленого глутатіону в контролі був у два рази вищий, ніж у батьківського ($P < 0,025$).

Концентрація (GSH + 2GSSG) позначається як вміст загального глутатіону в клітині. Відношення GSH/GSSG використовують як індикатор окисно-відновного стану клітини. Важливо відзначити, що зміна відношення GSH/GSSG активує у клітині кілька сигнальних шляхів, через які відбувається вплив на проліферацію і апоптоз – запрограмовану смерть клітин [12]. Нітропрусид збільшує відношення окисленого глутатіону до відновленого в дикого штаму, але в штаму *YAP1Δ* це не спостерігається (рис. 3). Збільшення відношення окисленого глутатіону до відновленого показує, що нітропрусид натрію може викликати нітрозативний стрес у клітинах дріжджів *S. cerevisiae*.

Отже, зростання концентрації окисленого глутатіону й, відповідно, відношення (2GSSG/GSH) показує, що дія різних концентрацій нітропрусиду у дріжджів призводить до нітрозативного стресу. Хоча концентрація відновленого глутатіону тільки демонструє тенденцію до зниження, подвоєння концен-

трації окисленого глутатіону може відобразити зміну внутрішньоклітинного окисно-відновного стану [9; 12].

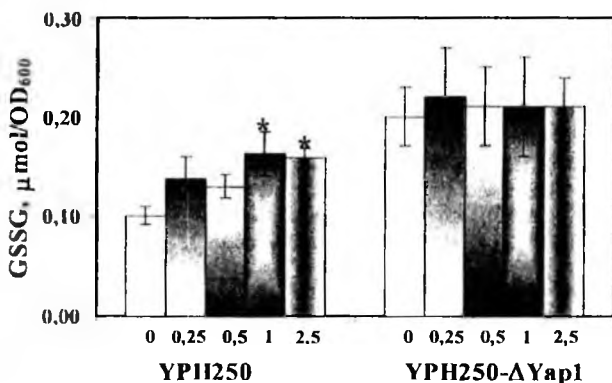


Рис. 2. Вміст окисленого глутатіону при обробці нітропрусидом у концентраціях 0,25–2,5 мМ. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення з $P < 0,05$.

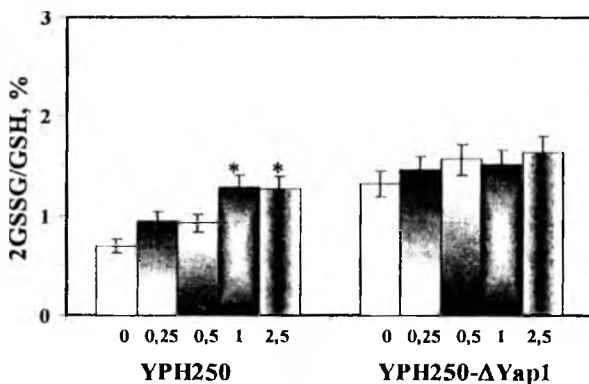


Рис. 3. Відношення окисленого глутатіону до відновленого при обробці нітропрусидом у концентраціях 0,25–2,5 мМ. *Вірогідно відрізняється від контрольного значення з $P < 0,05$.

Висновки

1. Обробка клітин дріжджів штаму YPH250 нітропрусидом викликає зростання вмісту окисленого глутатіону.

2. Зростання концентрації окисленого глутатіону в штамі YPH250 може свідчити про те, що нітропрусид натрію викликає нітрозигивний і оксидативний стреси.

1. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Дсев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Биофизика. – 1992. – Т. 29. – С. 3–250.
2. Луцзяк В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия. – 2001. – Т. 66, №5. – С. 592–609.
3. Луцзяк В.И., Багінокова Т.В., Семчишин Г.М., Господарьов Д.В. Методичні вказівки до лабораторних занять з біохімії. – Івано-Франківськ, 2006. – С. 78–80.
4. Beckman, J.S., The physiological and pathological chemistry of nitric oxide, in Nitric Oxide: Principles and Actions, J.R. Lancaster, Editor. 1996, Academic Press. – P. 1–82.
5. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite – the good, the bad, and the ugly. Am. J. Physiol., 1996. 271 (Cell Physiol. 40). – P. C1424–C1437.
6. Beckman, J.S. and J.H.M. Tsai, Reactions and diffusion of nitric oxide and peroxynitrite // The Biochemist. – 1994. – № 16. – P. 8–10.
7. Brunelli, L., J.P. Crow, and J. S. Beckman. 1995. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 316:327–334.
8. Brooks S.P. A simple computer program with statistical tests for the analysis of enzyme kinetics. – 1992. – BioTechniques. – Vol. 13. – P. 906–911.
9. Grant, C.M. 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. Mol. Microbiol. 39:533–541.
10. Halliwell, B., Gutteridge J.C. (1999) Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press. – 968 p.
11. Maltz, H., Grant M.A., and Navaroli M.C. (1971). Reactions of nitroprusside with amines. J. Org. Chem. 36:363–369.
12. Jourdain D, Jourdain FL, and Feelisch M. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. J Biol Chem 278: 15720–15726, 2003.

The levels of reduced and oxidized glutathione were studied in yeast Saccharomyces cerevisiae treated with the ¹⁵N donor – sodium nitroprusside. In work were used two strains Saccharomyces cerevisiae – YPH250 and its derivative strain YPH250-YAP1Δ. It was shown that the level of reduced glutathione was not affected by sodium nitroprusside in both studied strains. Increased level of oxidized glutathione shows that yeast cells of YPH250 strain were exposed to nitrosative/oxidative stress.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, glutathione, nitrosative stress, sodium nitroprusside.