УДК 579.222: 57.021: 577.24

ДЕФЕКТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПОСИЛЮЮТЬ ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ГЛІОКСАЛЮ НА ДРІЖДЖІ *Saccharomyces cerevisiae*

Г. М. СЕМЧИШИН

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: semchyshyn@pu.if.ua

Гліоксаль належить до активних карбонільних сполук і може мати як екзогенне, так й ендогенне походження. Зокрема, його кількість зростає внаслідок порушення балансу внутрішньоклітиного метаболізму глюкози, а також інших редуктивних вуглеводів. Завдяки наявності двох карбонільних груп, гліоксаль легко вступає в реакцію глікації, що призводить до розвитку карбонільного стресу. Дослідження на різних модельних системах демонструють тісний взаємозв'язок між карбонільним та оксидативним стресами. Проте щодо участі антиоксидантної системи в захисті організмів від карбонільного стресу відомо мало. Крім того, вплив гліоксалю на живі організми вивчений менше, ніж вплив таких активних карбонільних сполук як, наприклад, малоновий альдегід і метилгліоксаль. Для вивчення потенційної ролі антиоксидантної системи у захисті організмів від карбонільного стресу, індукованого гліоксалем, використано пекарські дріжджі Saccharomyces cerevisiae. Показано, що штами, які мають дефекти за різними ділянками антиоксидантного захисту, є чутливішими до гліоксалю, ніж вихідний дикий штам. Одержані дані підтверджують зв'язок між карбонільним та оксидативним стресами і свідчать про важливість антиоксидантної системи в захисті пекарських дріжджів від карбонільного стресу, спричиненого гліоксалем.

Ключові слова: Saccharomyces cerevisiae, гліоксаль, карбонільний стрес, антиоксидантний захист.

Хімічна модифікація біологічних молекул за неензиматичних перетворень часто призводить до утворення продуктів, що майже не піддаються деградації, а отже поступово накопичуються в організмі. До таких процесів належать, зокрема, вільнорадикальне окислення і неензиматичне глікозилювання (глікація). Обидва процеси прийнято вважати одними з основних причин старіння, втрати функціональних можливостей організму і розвитку різноманітних захворювань [1–4]. Серед найвірогідніших ініціаторів неензиматичних реакцій виділяють такі високореакційні сполуки як, наприклад, активні форми кисню (АФК) та активні карбонільні сполуки (АКС).

Одними з найреакційноздатніших серед АКС є дикарбонільні сполуки: малоновий альдегід, метилгліоксаль, гліоксаль, глюкозон, 3-дезоксиглюкозон, рибозон тощо. Найкраще вивчені на сьогодні малоновий альдегід і метилгліоксаль, а про такі α-дикарбонільні сполуки як, наприклад, гліоксаль відомо значно менше [5]. Проте встановлено, що гліоксаль досить поширена сполука і може мати як екзогенне, так й ендогенне походження [4, 6–8]. Наприклад, дим пожеж, багать і цигарок, вихлопні гази автомобілів, смог, туман, деякі побутові миючі засоби містять гліоксаль у досить великих кількостях [8]. Крім повітря, гліоксаль виявлений у зразках ґрунту, ґрунтової і морської води та морських відкладеннях. Різноманітні соуси та олії, хліб, пиво, вино, чай, кава, йогурт, а також продукти, які зазнали ферментації, запікання, підсмажування, також є джерелами гліоксалю [8, 9]. З довкілля гліоксаль може потрапляти в організм через легені, шкіру або травний тракт, що іноді істотно впливає на його рівень у тканинах та органах.

Гліоксаль може утворюватися в організмі як побічний продукт клітинного метаболізму (рис. 1). Особливо вміст АКС, у тому числі й гліоксалю, суттєво зростає при порушенні метаболізму глюкози та інших редукуючих вуглеводів внаслідок автоокислення самих вуглеводів, а також ранніх продуктів глікації, утворених за їх участю, зокрема, основ Шиффа і продуктів Амадорі [3, 4, 6, 7]. Слід зауважити, що при цьому також зростає інтенсивність утворення таких АФК, як супероксид-аніон-радикал та пероксид водню [7, 10]. Попри тісний взаємозв'язок АКС із метаболізмом вуглеводів, показано, що гліоксаль може також утворюватись і під час пероксидного окислен-

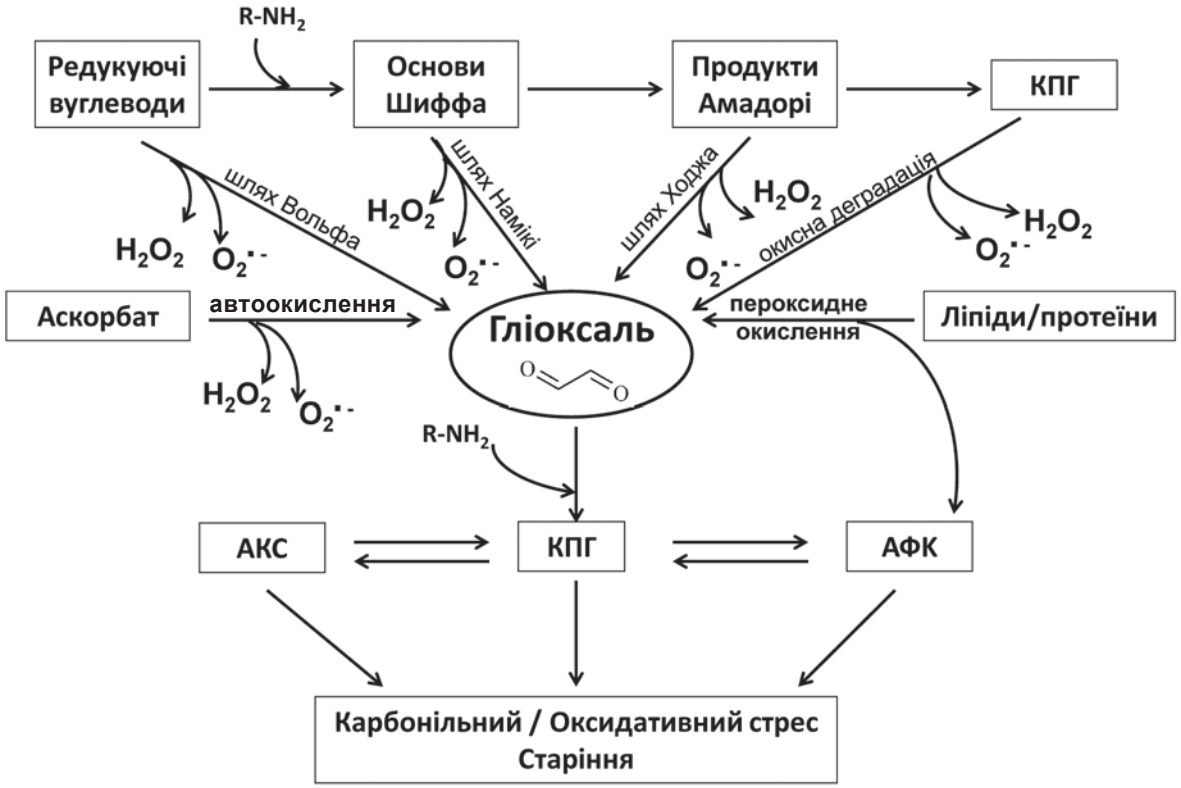

Рис. 1. Метаболізм гліоксалю. Прийняті скорочення: АКС – активні карбонільні сполуки; АФК – активні форми кисню; КПГ – кінцеві продукти глікації

ня ліпідів, деградації глікованих та окислених протеїнів і нуклеїнових кислот [4, 5, 8].

Завдяки наявності двох карбонільних груп, гліоксаль є високореакційною електрофільною сполукою і відносно легко вступає в реакцію глікації з нуклеофілами, особливо протеїнами, амінокислотами, амінофосфоліпідами, нуклеїновими кислотами і нуклеотидами [3]. Кінцеві продукти глікації (КПГ) мало піддаються деградації і накопичуються з віком [2, 3, 9]. Водночас, частково розщеплюючись у живих організмах, продукти неензиматичного глікозилювання часто є джерелом АКС і АФК, замикаючи, так зване, хибне коло глікації і вільнорадикального окислення, що призводить до розвитку карбонільного/оксидативного стресу [3, 9]. В залежності від тривалості впливу факторів розрізняють хронічний та гострий стрес, відповідь організмів на які іноді суттєво відрізняється [3, 9, 11–13].

Як зазначено вище, вплив гліоксалю на живі організми вивчено недостатньо. Отже, метою представленої роботи було розширити знання про роль гліоксалю як потенційного фактора карбонільного/оксидативного стресу і прискореного старіння, а також його зв'язок з антиоксидантною системою. Для дослідження як модель було обрано одноклітинні організми – пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* за дії спричиненого гліоксалем хронічного та гострого карбонільного стресу.

Матеріали і методи

Генетичну характеристику досліджуваних штамів *Saccharomyces cerevisiae*, наведено в табл. 1. У роботі використовували такі реактиви: дріжджовий екстракт і пептон (Fluka, Німеччина); гліоксаль, БСА, 2,4-динітрофенілгідразин, етилендіамінтетраацетат (EDTA), кумасі яскраво-синій G-250, глюкоза, фенілметилсульфонілфторид, трихлороцтова кислота і реактив Джірарда-Т (Sigma, США). Решта реактивів – вітчизняного виробництва (чда та вище).

Дріжджі вирощували при 28 °С на шейкері (175 коливань за хв) протягом 24 год у живильному середовищі YPD, яке містило 2,0% пептону, 1,0% дріжджового екстракту та 2,0% глюкози. У відповідних експериментах для створення умов хронічного карбонільного

Таблиця 1. Генетична характеристика штамів Saccharomyces cerevisiae

Штам	Генотип	Джерело
YPH250	MAT**a** *trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52*	[14]
ΔGSH1	YPH250 *gsh1 Δ::LEU2*	[15]
ΔCAT1ΔCAT2	YPH250 *ctt1Δ::URA3 cta1Δ::TRP1*	[14]
ΔSOD1ΔSOD2	YPH250 *sod1Δ::kanMX sod2 Δ::TRP1*	[16]
ΔYAP1	YPH250 *yap1Δ::HIS3*	[17]

стресу до середовища культивування YPD додавали гліоксаль (50 або 100 мМ).

Криві росту досліджуваних культур виражали як зміну абсорбції з часом за λ 600 нм. Розрахунок часу подвоєння кількості клітин у логарифмічній фазі та тривалість лаг-фази здійснювали за формулами [18]:

$$T = \frac{(t_2 - t_1) \cdot lg2}{lgA_2 - lgA_1}$$

та

$$L = t_2 - t_1 + \frac{T \cdot (lgA_2 - lgA_1)}{lg2},$$

де T – час подвоєння кількості клітин, год; L – тривалість лаг-фази, год; $t_2 - t_1$ – період експоненційної фази, год; A_1 і A_2 – значення абсорбції, які відповідають часу t_1 і t_2.

Для створення умов гострого карбонільного стресу клітини вирощували у середовищі YPD протягом 24 год, після чого до одержаних експериментальних культур додавали гліоксаль різних концентрацій з наступною інкубацією при 28 °С протягом 1 год. Життєздатність клітин визначали крапельним методом [19, 20]. Для цього контрольні (без гліоксалю) та дослідні суспензії (інкубовані з гліоксалем відповідних концентрацій) з однаковою кількістю дріжджових клітин (10^4), у вигляді крапель об'ємом 5 мкл поміщали на тверде агаризоване середовище YPD із наступною інкубацією при 28 °С протягом 3 діб.

Безклітинні екстракти одержували дезінтеграцією клітин на вортекс-міксері зі скляними кульками діаметром 450–500 мкм (Sigma, США) в середовищі гомогенізації, яке містило 50 мМ калій-фосфатного буфера (pH 7,0), 0,5 мМ EDTA, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Скляні кульки і незруйновані рештки клітин осаджували при 13 000 g протягом 15 хв.

Вміст карбонільних груп протеїнів визначали за кількістю динітрофенілгідразонів, які утворювались внаслідок взаємодії цих груп із 2,4-динітрофенілгідразином [21, 22]. Концентрацію динітрофенілгідразонів визначали спектрофотометрично за λ 370 нм. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярного поглинання динітрофенілгідразонів 22 $мМ^{-1}см^{-1}$ [21]. Результати представлені у нмолях на мг протеїну.

Вміст α-дикарбонільних сполук визначали за їх взаємодією з реактивом Джірарда-Т [22–24]. Абсорбцію комплексу, який утворюється під час взаємодії реагенту Джірарда-Т з α-дикарбонільними сполуками у 30 мМ натрій-тетраборатному буфері (pH 9,2), визначали за λ 325 нм. Для розрахунків використовували коефіцієнт екстинкції для гліоксалю 18,8 $мМ^{-1}см^{-1}$ [23]. Результати представлено в гліоксалевих еквівалентах (нмоль) на мг протеїну.

Концентрацію протеїну в пробах визначали за його зв'язуванням із кумасі яскраво-синім G-250, використовуючи як стандарт БСА [25]. Дані представлено як $M \pm m$ для 4–6 незалежних визначень. Статистичну обробку здійснювали, використовуючи критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Дослідження останніх років демонструють тісний взаємозв'язок між карбонільним та оксидативним стресами у різних модельних системах [3, 10, 13, 26–29]. Проте про участь антиоксидантної системи у захисті організмів від карбонільного стресу відомо мало. Для вивчення потенційної ролі антиоксидантної системи у захисті організмів від карбонільного стресу, індукованого гліоксалем, нами були використані пекарські дріжджі *S. cerevisiae*: вихідний штам YPH250 та його ізогенні похідні, дефектні за різними ділянками антиоксидантного захисту (табл. 1). Серед штамів-мутантів – ΔGSH1 (дефектний за геном біосинтезу глутатіону *gsh1*), ΔCAT1ΔCAT2 (дефектний за обома генами каталази *ctt1* і *cta1*), ΔSOD1ΔSOD2 (дефектний за обома генами супероксиддисмутази *sod1* і *sod2*) і ΔYAP1 (де-

фектний за *yap1* геном транскрипційного регулятора згаданих вище генів).

Для створення умов хронічного карбонільного стресу до середовища культивування дріжджів додавали гліоксаль. На рис. 2 показана крива росту *S. cerevisiae* YPH250 у середовищі без гліоксалю (контроль) та у присутності 50 та 100 мМ гліоксалю. Як бачимо, характер росту цього штаму подібний за всіх використаних у дослідженні умов. У табл. 2 наведено основні параметри росту батьківського штаму YPH250 та його похідних мутантів. Якщо порівняти тривалість лаг-фази кривих росту різних штамів за контрольних умов, видно, що цей показник подібний у трьох досліджуваних штамів, а саме YPH250, ΔCAT1ΔCAT2 і ΔYAP1. У штамі ΔGSH1 тривалість лаг-фази коротша приблизно у 2 рази, а у ΔSOD1ΔSOD2 – довша у 2 рази, ніж у вихідного штаму YPH250. Відомо, що мікроорганізми після інокуляції у середовище культивування певний час пристосовуються до нових умов [18], тому тривалість лаг-фази, назагал, відображає адаптаційний потенціал дріжджів. З табл. 2 видно, що різні штами дріжджів навіть за контрольних умов демонструють різну адаптаційну здатність. Щодо часу подвоєння кількості клітин, який визначає швидкість росту культур в експоненційній фазі, то слід зауважити, що цей параметр залежить від особливостей штаму. Зокрема, швидкість поділу клітин штамів ΔCAT1ΔCAT2 і ΔYAP1 майже не відрізняється від такої у вихідного штаму YPH250. Проте клітини штамів ΔGSH1 та ΔSOD1ΔSOD2 ділились відповідно у 2,7 раза швидше та 3,4 раза повільніше, ніж клітини батьківського штаму. У цілковитій відповідності до залежності попередніх двох показників від особливостей досліджуваних штамів знаходиться також і кількість клітин у культурах на 24-ту год росту (табл. 2). Як бачимо, цей показник також подібний за контрольних умов у штамів YPH250, ΔCAT1ΔCAT2 і ΔYAP1. Водночас, кількість клітин на 24-ту год росту у штамів ΔGSH1 і ΔSOD1ΔSOD2 у 1,2 раза відповідно вища та нижча, ніж у вихідного штаму YPH250.

Як було зазначено, додавання гліоксалю до середовища культивування майже не впливає на ріст батьківського штаму YPH250. Так, з усіх досліджуваних показників тільки час подвоєння кількості клітин вихідного

Таблиця 2. Тривалість лаг-фази (год), час подвоєння кількості клітин на експоненційній фазі росту (год) та кількість клітин у культурах S. cerevisiae на 24-ту год росту (A_{600}) без гліоксалю (контроль) та за його присутності (50 та 100 мМ) (M ± m, n = 4)

Штам та умови культивування		Тривалість лаг-фази, год	Час подвоєння кількості клітин, год	A_{600}
YPH250	контроль	2,50 ± 0,27	3,39 ± 0,43	0,87 ± 0,05
	50 мМ ГО	2,68 ± 0,19	4,28 ± 0,30	0,85 ± 0,04
	100 мМ ГО	2,66 ± 0,11	4,60 ± 0,23*	0,91 ± 0,02
ΔGSH	контроль	1,17 ± 0,06#	1,27 ± 0,11#	1,07 ± 0,02#
	50 мМ ГО	1,25 ± 0,08#	2,08 ± 0,18*,#	1,00 ± 0,02*,#
	100 мМ ГО	1,76 ± 0,12*,#	2,98 ± 0,21*,#	0,99 ± 0,02*,#
ΔCAT1ΔCAT2	контроль	2,49 ± 0,12	4,82 ± 0,23#	0,87 ± 0,03
	50 мМ ГО	3,89 ± 0,40*,#	4,92 ± 0,50	0,61 ± 0,07*,#
	100 мМ ГО	3,86 ± 0,35*,#	5,20 ± 0,47	0,61 ± 0,04*,#
ΔSOD1ΔSOD2	контроль	5,12 ± 0,67#	11,4 ± 1,5#	0,74 ± 0,02#
	50 мМ ГО	9,43 ± 1,12*,#	16,6 ± 1,5*,#	0,39 ± 0,03*,#
	100 мМ ГО	12,5 ± 1,0*,#	28,4 ± 3,6*,#	0,37 ± 0,05*,#
ΔYAP1	контроль	2,52 ± 0,31	4,54 ± 0,47	0,86 ± 0,04
	50 мМ ГО	3,41 ± 0,21*,#	5,03 ± 0,50	0,88 ± 0,06
	100 мМ ГО	4,57 ± 0,27*,#	7,09 ± 0,63*,#	0,67 ± 0,10*,#

*Вірогідно відмінне від контрольних значень для відповідного штаму ($P < 0,05$). #Вірогідно відмінне від відповідних значень для вихідного штаму YPH250 ($P < 0,05$). Прийняті скорочення: ГО – гліоксаль.

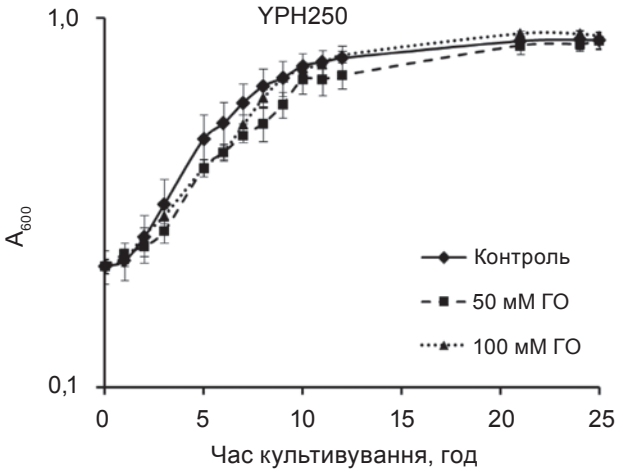

Рис. 2. Криві росту S. cerevisiae YPH250 у живильному середовищі з 50 мМ та 100 мМ гліоксалем (ГО), n = 4

штаму дещо зростає за умов додавання 100 мМ гліоксалю до середовища культивування. Присутність гліоксалю, назагал, сповільнювала ріст дефектних штамів. Тривалість лаг-фази кривих росту мутантів у середньому збільшується у 1,4–2,4 раза порівняно з відповідними контрольними показниками. Найбільшого впливу при цьому зазнали штами, дефектні за каталазою та супероксиддисмутазою. Водночас, присутність гліоксалю не впливає на швидкість експоненційного росту мутантних клітин ΔCAT1ΔCAT2 та сповільнює його у штамів ΔGSH1 і ΔYAP1 приблизно в 1,5 раза. Найповільнішим було подвоєння клітин у ΔSOD1ΔSOD2 штаму у присутності 100 мМ гліоксалю (у 2,5 раза повільніше, ніж у контролі). Слід зауважити, що кількість клітин на 24-ту годину росту у мутантних штамів знижується майже в усіх досліджуваних випадках. Найвираженіший ефект при цьому спостерігається у штамів, дефектних за каталазою і супероксиддисмутазою, зокрема досліджуваний показник знижується відповідно у 1,4 та 2,0 раза у присутності гліоксалю порівняно з контрольними умовами.

Таким чином, сповільнення росту та зниження кількості клітин на 24-ту год росту мутантних штамів, особливо дефектних за первинними ензимами антиоксидантного захисту, свідчить про важливу роль цього захисту від карбонільного стресу, спричиненого гліоксалем. Загалом, одержані дані добре узгоджуються з інформацією про участь згаданих вище ензимів в адаптації пекарських дріжджів до карбонільного стресу, спричиненого редукуючими моносахаридами [13, 26].

Відомо, що чутливість мікроорганізмів до стресових чинників може істотно відрізнятися у різних диких штамів [30–32]. Нещодавно було виявлено, що гліоксаль за концентрації 45,5 мМ призводить до сповільнення росту дикого штаму *S. cerevisiae* НО на 50% [5]. На відміну від цього, його присутність у середовищі культивування майже не впливає на ріст штаму YPH250 (табл. 2). Слід зазначити, що ми не вперше зауважуємо вищу стійкість штаму YPH250 до стресових факторів, порівняно з іншими дикими штамами пекарських дріжджів, які широко застосовуються дослідниками [6, 31, 32]. Щодо штамів-мутантів, використаних у цьому дослідженні, то одержані результати узгоджуються з попередніми даними про більшу чутливість до метилгліоксалю та гліоксалю дріжджів, дефектних за геном *yap1*, порівняно з вихідним штамом *S. cerevisiae* НО [5]. Водночас, було виявлено, що штам ΔSOD1 демонструє підвищену чутливість до метилгліоксалю, але не до гліоксалю [5]. Раніше також було показано, що транскрипційний фактор Yap1, однією з найважливіших функцій якого є регуляція захисту дріжджів від оксидативного стресу [33, 34], певним чином залучений до відповіді дріжджів на дію метилгліоксалю [35, 36].

Важливим показником оксидативного/карбонільного стресу та старіння, який також залежить від особливостей росту дріжджів, є вміст карбонільних груп протеїнів [16, 22, 37–42]. На рис. 3, *А* показано залежність цього параметру від особливостей штамів за їх росту в присутності 50 мМ гліоксалю та без нього (контроль). Як видно, присутність гліоксалю в середовищі культивування протягом 24 год спричинює вірогідне зростання вмісту карбонільних груп протеїнів у клітинах всіх без винятку штамів. Слід зазначити, що за умов як контролю, так і стресу, цей показник не відрізняється у вихідного штаму YPH250 та двох мутантів ΔCAT1ΔCAT2 і ΔGSH1. Штам ΔYAP1 як у контролі, так і в присутності гліоксалю демонструє вищий рівень карбонільних груп протеїнів порівняно з батьківським штамом. Це свідчить про важливу роль регуляторного протеїну Yap1 у захисті дріжджів від стресу за даних експериментальних умов. Водночас, штам, дефектний за супероксиддисмутазою, демонструє показник нижчий, ніж у батьківського штаму у 2 та 1,5 раза відповідно за контрольних та стресо-

вих умов. Раніше нами було показано на іншій лінії штамів, похідних від *S. cerevisiae* EG103, що одинарні (ΔSOD1 і ΔSOD2) та подвійний (ΔSOD1ΔSOD2) мутанти також мають нижчий рівень карбонільних груп протеїнів, порівняно з батьківським штамом [38, 39].

Результати, одержані в цьому та попередніх дослідженнях, вказують на неоднозначну роль СОД у процесах окислення протеїнів у клітинах дріжджів. Зокрема, як можливе пояснення, нами раніше було запропоновано, що за певних експериментальних умов *in vivo* супероксиддисмутаза може виконувати подвійну (як антиоксидантну, так й прооксидантну) роль [38, 39]. До цього подібні припущення висловлювались тільки на основі експериментів, проведених у системах *in vitro* [43, 44].

На рис. 3, *Б* показано, що інший важливий показник карбонільного стресу, вміст α-дикарбонільних сполук, подібно до попереднього параметра (рис. 3, *А*), залежить від

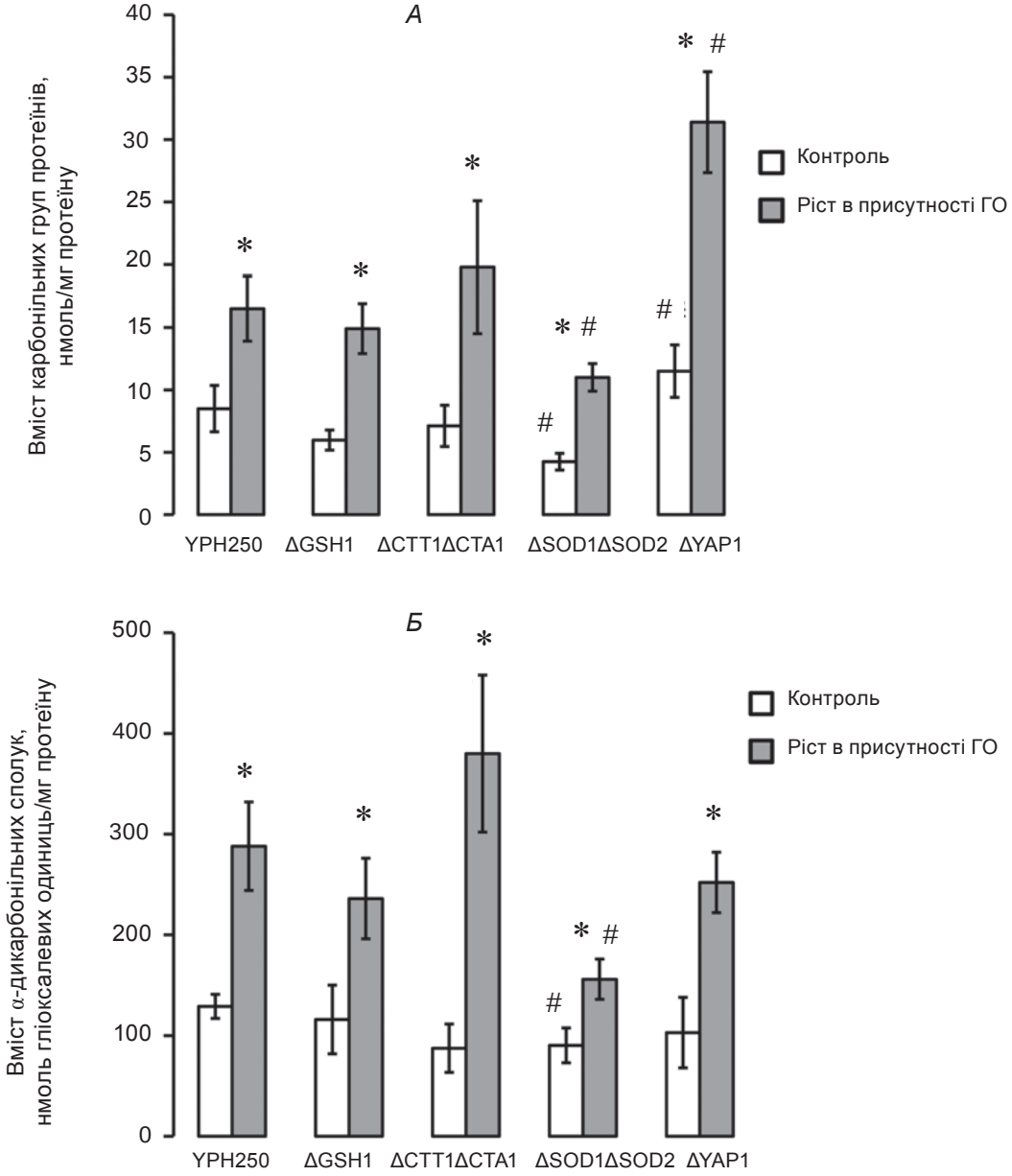

*Рис. 3. Вміст карбонільних груп протеїнів (А) та α-дикарбонільних сполук (Б) у клітинах різних штамів S. cerevisiae за умов росту в присутності 50 мМ гліоксалю (ГО) протягом 24 год (хронічний карбонільний стрес). *Вірогідно відмінне від контрольних значень відповідного штаму, P < 0,05 та # відповідних значень вихідного штаму YPH250, P < 0,05 (n = 4–6)*

особливостей штамів та присутності гліоксалю в середовищі культивування. Загалом, за дії гліоксалю рівень α-дикарбонільних сполук значно зростає у клітинах всіх досліджуваних штамів. Водночас, показник суттєво не відрізняється у різних штамів як у контрольній групі, так й за умов стресу. Проте штам, дефектний за супероксидисмутазою, демонструє вміст α-дикарбонільних сполук нижчий у 1,4 і 1,8 раза, ніж вихідний штам відповідно за умов контролю та стресу.

Оскільки чутливість організмів може бути різною до того самого чинника за хронічного та гострого стресу [3, 9, 11–13], на наступному етапі ми дослідили як впливає інкубація з 50 мМ гліоксалем протягом 1 год (гострий стрес) на дріжджі, які вирощували за контрольних умов до стаціонарної фази. Рис. 4 демонструє чутливість різних штамів дріжджів до такого стресу. У цьому разі найстійкішими до дії гліоксалю виявились клітини вихідного штаму YPH250 та штаму, дефектного за протеїном Yap1. Можна припустити, що за умов гострого гліоксалевого стресу певні компенсаторні механізми дозволяють підтримувати життєздатність мутанта ΔYAP1. Зокрема, серед інших транскрипційних факторів у пекарських дріжджів описано протеїни Skn7 та Msn2/4, що мають подібну до Yap1 функцію [33, 34]. Як бачимо (рис. 4), досліджувані штами ΔGSH1, ΔCAT1ΔCAT2 і ΔSOD1ΔSOD2 значно чутливіші до гліоксалю за даних експериментальних умов. Найвищу чутливість при цьому демонструє подвійний мутант ΔSOD1ΔSOD2. Вміст карбонільних груп протеїнів та α-дикарбонільних сполук за гострого гліоксалевого стресу в клітинах досліджуваних штамів (рис. 5), назагал, подібна до відповідних показників, одержаних за умов хронічного стресу (рис. 4). Зокрема, слід зазначити, що штам ΔYAP1 у присутності гліоксалю демонструє найвищий рівень як карбонільних груп протеїнів, так й α-дикарбонільних сполук.

Раніше виявлено тісний взаємозв'язок між обома згаданими вище параметрами у клітинах штаму YPH250 за їх росту у присутності редукуючих моносахаридів, що свідчило про розвиток оксидативного/карбонільного стресу та старіння культур [45]. Проведені дослідження

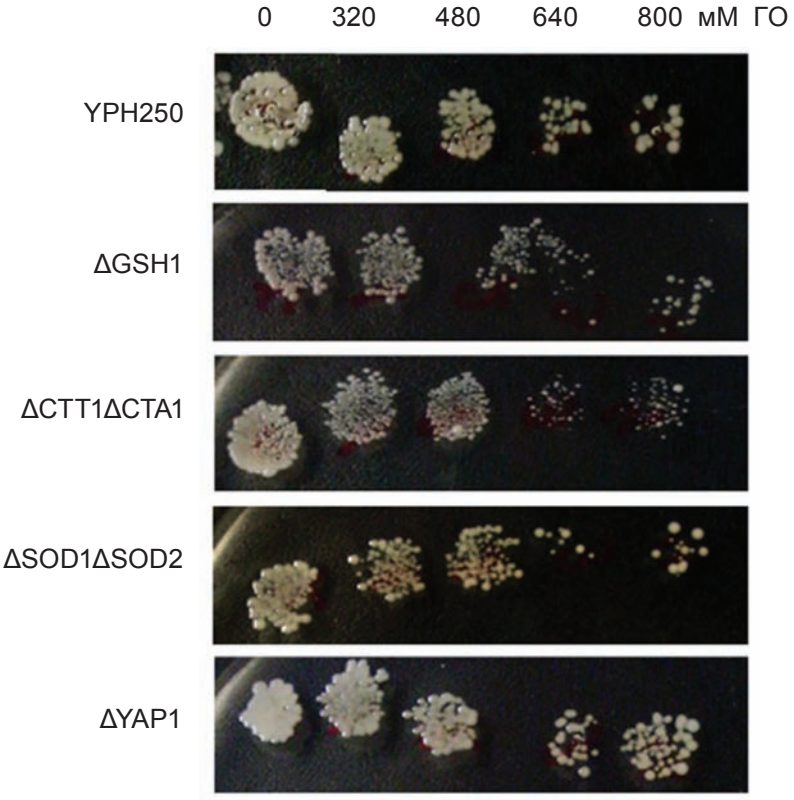

Рис. 4. Чутливість різних штамів S. cerevisiae до карбонільного стресу, індукованого гліоксалем різних концентрацій. Дріжджі вирощували в середовищі без гліоксалю протягом 24 год, після чого їх інкубували із гліоксалем (ГО) різних концентрацій протягом 1 год (гострий карбонільний стрес)

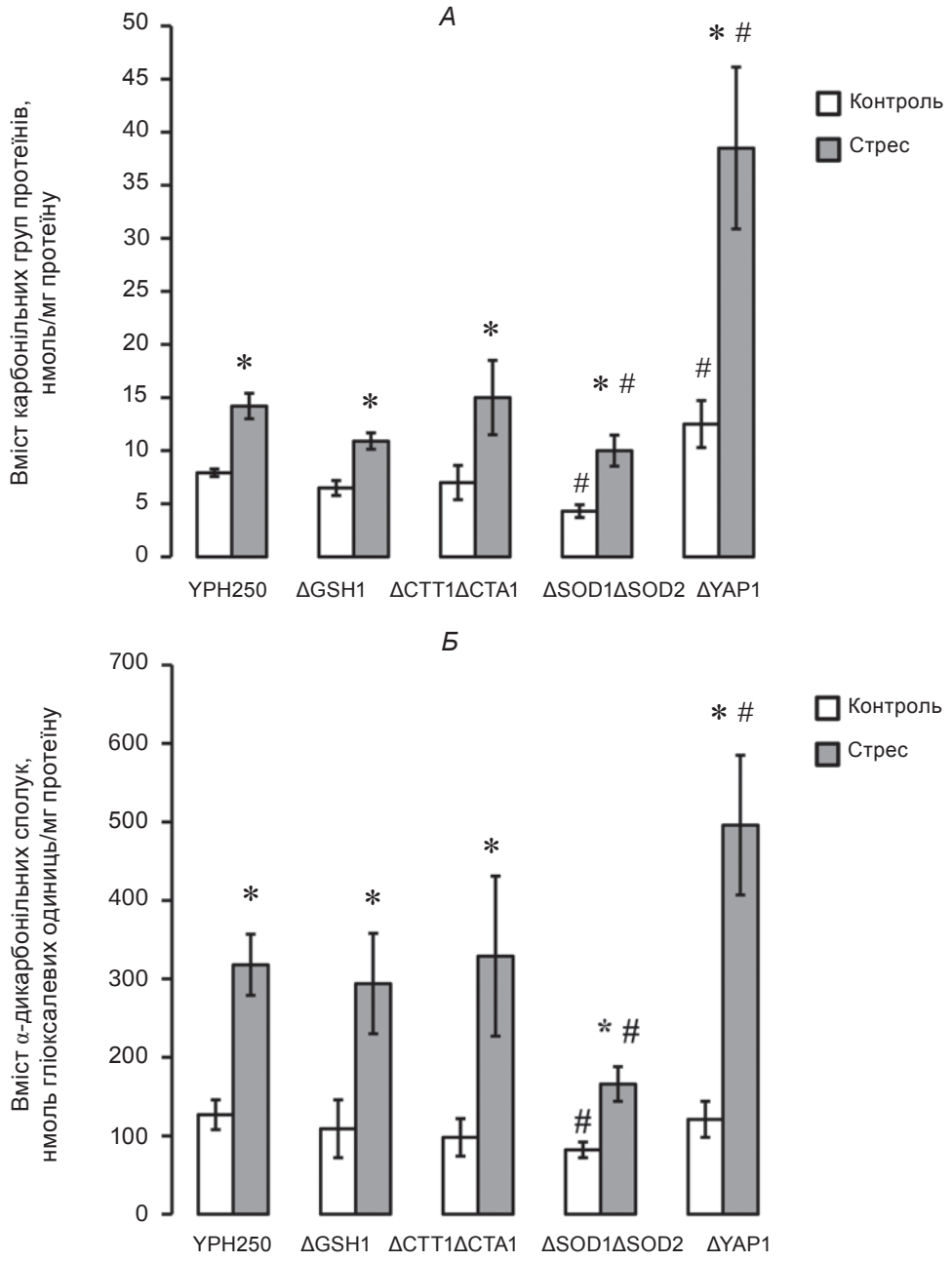

*Рис. 5. Вміст карбонільних груп протеїнів (А) та α-дикарбонільних сполук (Б) у клітинах різних штамів S. cerevisiae, вирощених без гліоксалю протягом 24 год та інкубованих після цього з 50 мМ гліоксалем протягом 1 год (гострий карбонільний стрес). *Вірогідно відмінне від контрольних значень відповідного штаму, P < 0,05 та #відповідних значень вихідного штаму YPH250, P < 0,05 (n = 4–6)*

також підтверджують, що рівень карбонільних груп протеїнів та α-дикарбонільних сполук у клітинах досліджуваних штамів тісно пов'язані між собою, особливо за гострого стресу, спричиненого гліоксалем (рис. 6). Ця особливість ще раз доводить існування спільних механізмів розвитку карбонільного та оксидативного стресів за певних умов.

Порівняння тривалого та короткочасного впливу гліоксалю на вихідний штам пекарських дріжджів та його ізогенні похідні, дефектні за різними ланками антиоксидантного захисту, теж свідчить про взаємодію механізмів розвитку обох стресів. Зокрема, слід зауважити важливу роль таких компонентів антиоксидантного захисту як глутатіон, каталаза,

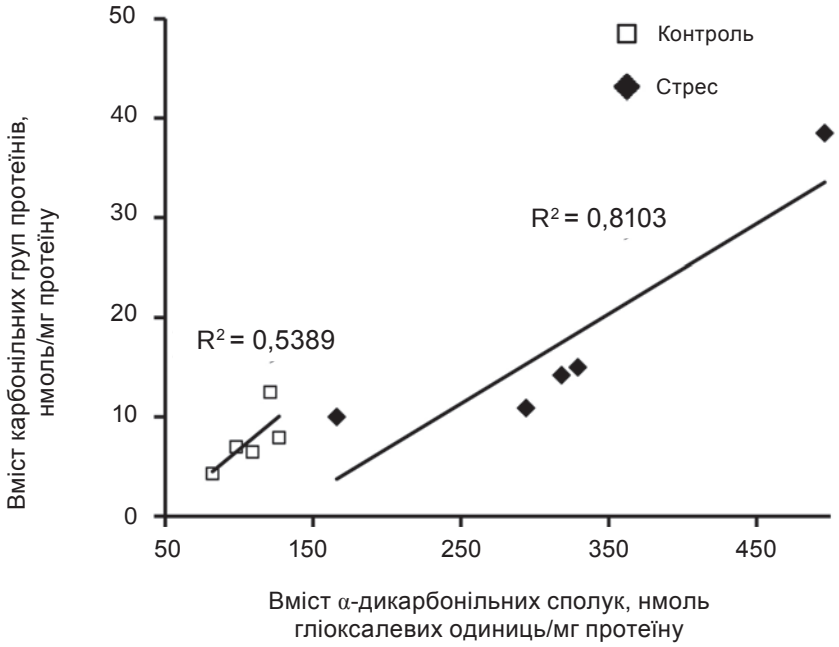

Рис. 6. Кореляція між рівнем карбонільних груп протеїнів та α-дикарбонільних сполук у клітинах досліджуваних штамів дріжджів до і після обробки 50 мМ гліоксалем протягом 1 год (n = 4–6)

супероксиддисмутаза та транскрипційний регулятор Yap1 у захисті клітин від індукованого гліоксалем карбонільного стресу. Водночас на сьогодні залишається не вивченою роль антиглікаційної системи у адаптації дріжджів до оксидативного стресу.

Подяки. Автор висловлює щиру подяку професору Yoshihara Inoue за люб'язно надані штами S. cerevisiae, а також Христині Мойсеєвій і Руслані Васильковській за технічну допомогу у постановці експериментів.

ДЕФЕКТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ УСУГУБЛЯЮТ ТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ГЛИОКСАЛЯ НА ДРОЖЖИ *Saccharomyces cerevisiae*

Г. Н. Семчишин

Прикарпатский национальный университет имени Василя Стефаника, Ивано-Франковск, Украина;
e-mail:semchyshyn@pu.if.ua

Глиоксаль принадлежит к активным карбонильным соединениям и может иметь как экзогенное, так и эндогенное происхождение. В частности, его количество увеличивается при нарушении баланса внутриклеточного метаболизма глюкозы, а также других восстанавливающих углеводов. Вследствие наличия двух карбонильных групп, глиоксаль легко вступает в реакцию гликации, приводя к развитию карбонильного стресса. Исследования на различных модельных объектах демонстрируют тесную взаимосвязь между карбонильным и окислительным стрессом. Однако об участии антиоксидантной системы в защите организмов от карбонильного стресса известно мало. Кроме того, влияние глиоксаля на живые организмы изучено меньше, чем влияние таких активных карбонильных соединений как, например, малоновый альдегид и метилглиоксаль. Для исследования потенциальной роли антиоксидантной системы в защите организмов от карбонильного стресса, индуцированного глиоксалем, использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что штаммы, имеющие дефекты по различным участкам антиоксидантной защиты, более чувствительны к глиоксалю, чем исходный дикий штамм. Таким образом, полученные данные подтверждают взаимосвязь между карбонильным и окислительным стрессами и свидетельствуют о важности антиоксидантной системы в защите пекарских дрожжей от карбонильного стресса, вызванного глиоксалем.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, глиоксаль, карбонильний стресс, антиоксидантная защита.

DEFECTS IN ANTIOXIDANT DEFENCE ENHANCE GLYOXAL TOXICITY IN THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

H. M. Semchyshyn

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine;
e-mail: semchyshyn@pu.if.ua

Glyoxal being either exogenous or endogenous compound belongs to reactive carbonyl species. In particular, its level increases under disturbance of the balance of glucose intracellular metabolism as well as of other reductive carbohydrates. Having two carbonyl reactive groups, glyoxal readily enters glycation reaction that results in carbonyl stress development. Investigations of different model systems demonstrate a strong relationship between carbonyl and oxidative stress. However, a possible role of antioxidant system in the organisms' defence against carbonyl stress is poor understood. In addition, the influence of glyoxal on living organisms is less studied than the effect of such carbonyl reactive species as malonic aldehyde or methylglyoxal. To study a potential role of antioxidant system in organisms' defence against carbonyl stress induced by glyoxal, the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used. It has been found that strains with different defects in the antioxidant defence were more sensitive to glyoxal as compared with parental wild strain. Therefore, the data obtained in the present study confirm the relationship between carbonyl and oxidative stress and reveal the important role of antioxidant system in baker's yeast defence against carbonyl stress induced by glyoxal.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, glyoxal, carbonyl stress, antioxidant defence.

1. *Harman D.* // J. Gerontol. – 1956. – **11**, N 3. – P. 298–300.
2. *Monnier V. M., Cerami A.* // Science. – 1981. – **211**. – P. 491–493.
3. *Лозінська Л. М., Семчишин Г. М.* // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 5. – С. 16–37.
4. *Lange J. N., Wood K. D., Knight J. et al.* // Adv. Urol. – 2012. – **2012**: 819202.
5. *Hoon S., Gebbia M., Costanzo M. et al.* // G3 (Bethesda). – 2011. – **1**, N 3. – P. 219–231.
6. *O'Brien, P. J., Siraki A. G., Shangari N.* // Crit. Rev. Toxicol. – 2005. – **35**. – P. 609–662.
7. *Lee O., Bruce W. R., Dong Q. et al.* // Chem. Biol. Interact. – 2009. – **178**. – P. 332–339.
8. *Larsen S. A., Kassem M., Rattan S. I.* // Chem. Cent. J. – 2012. – **6**(1). – P. 18.
9. *Semchyshyn H. M., Lushchak V. I.* / In book: Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects, editors: Lushchak V. I. and Semchyshyn H. M., InTech. – 2012. – P. 15–46.
10. *Yim M. B., Kang S. O., Chock P.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2000. – **899**, N 1. – P. 168–181.
11. *Sohal R. S., Weindruch R.* // Science. – 1996. – **273**, N 5271. – P. 59–63.
12. *Spasojević I., Bajić A., Jovanović K. et al.* // Carbohydr. Res. – 2009. – **344**, N 13. – P. 1676–1681.
13. *Semchyshyn H., Lozinska L.* // FEMS Yeast Res. – 2012. – **12**, N 7. – P. 761–773.
14. *Izawa S., Inoue Y., Kimura A.* // Biochem. J. – 1996. – **320**. – P. 61–67.
15. *Inoue Y., Tsujimoto Y., Kimura A.* // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, N 5. – P. 2977–2983.
16. *Semchyshyn H., Abrat O., Inoue Y. et al.* // Redox Rep. – 2011. – **16**, N 1. – P. 15–23.
17. *Matsuda T., Sugiyama K., Izawa S. et al.* // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**. – P. 27002–27009.
18. *Доис Э.* Количественные проблемы биохимии. – М.: Мир, 1983. – 373 с.
19. *Ispolnov K., Gomes R. A., Silva M. S. et al.* // J. Appl. Microbiol. – 2008. – **104**, N 4. – P. 1092–1102.
20. *Gomes R. A., Vicente Miranda H., Silva M. S. et al.* // FEBS J. – 2006. – **273**, N 23. – P. 5273–5287.
21. *Levine R. L., Williams J. A., Stadtman E. R. et al.* // Methods Enzymol. – 1994. – **233**. – P. 346–357.
22. *Semchyshyn H., Lozinska L., Miedzobrodzki J. et al.* // Carbohydr. Res. – 2011. – **346**. – P. 933–938.
23. *Mitchel R. E. J., Birnboim H. C.* // Anal. Biochem. – 1977. – **81**. – P. 47–56.
24. *Sakai M., Oimomi M., Kasuga M.* // Kobe J. Med. Sci. – 2002. – **48**. – P. 125–136.
25. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
26. *Лозінська Л. М., Семчишин Г. М.* // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 4. – С. 62–71.
27. *d'Ischia M., Manini P., Napolitano A.* / In book: Oxidative Stress, Disease and Cancer, editor: Singh K., London: Imperial College Press. – 2006. – P. 333–357.
28. *Kalapos M. P.* // Chem. Biol. Interact. – 2008. – **171**, N 3. – P. 251–271.
29. *Lushchak O. V., Rovenko B. M., Gospodaryov D. V. et al.* // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2011. – **160**, N 1. – P. 27–34.
30. *Semchyshyn H., Lushchak V., Storey K.* // Biochemistry (Moscow). – 2005. – **70**, N 4. – P. 424–431.

31. *Bayliak M., Semchyshyn H., Lushchak V.* // Biochemistry (Moscow). – 2006. – **71**, N 9. – P. 1013–1020.
32. *Bayliak M., Semchyshyn H., Lushchak V.* // Cent. Eur. J. Biol. – 2007. – **2**, N 3. – P. 326–336.
33. *Lushchak V.* // Biochemistry (Moscow). – 2010. – **75**, N 3. – P. 281–296.
34. *Semchyshyn H.* // Cent. Eur. J. Biol. – 2009. – **4**, N 2. – P. 142–153.
35. *Maeta K., Izawa S., Okazaki S. et al.* // Mol. Cell. Biol. – 2004. – **24**, N 19. – P. 8753–8764.
36. *Inoue Y., Maeta K., Nomura W.* // Semin. Cell Dev. Biol. – 2011. – **22**, N 3. – P. 278–284.
37. *Lushchak V. I., Gospodaryov D. V.* // Cell. Biol. Int. – 2005. – **29**, N 3. – P. 187–192.
38. *Lushchak V., Semchyshyn H., Mandryk S. et al.* // Arch. Biochem. Biophys. – 2005. – **441**. – P. 35–40.
39. *Lushchak V., Semchyshyn H., Lushchak O. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – **338**, N 4. – P. 1739–1744.
40. *Grzelak A., Macierzyńska E., Bartosz G.* // Exp. Gerontol. – 2006. – **9**. – P. 813–818.
41. *Lushchak V.* // Biochemistry (Moscow). – 2007. – **72**, N 8. – P. 809–827.
42. *Lushchak V. I.* // Acta Biochim. Pol. – 2006. – **53**, N 4. – P. 679–684.
43. *Offer T., Russo A., Samuni A.* // FASEB J. – 2000. – **14**. – P. 1215–1223.
44. *McCord J. M.* / In book: Oxidative Stress, Cancer, AIDS, and Neurodenerative Diseases, editors: L. Montagnier, R. Olivier and C. Pasquier. – New York: Marcel Dekker. – 1997. – P. 1–7.
45. *Лозінська Л. М.* Глюкоза та фруктоза як потенційні фактори розвитку карбонільного та оксидативного стресів у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Дис. ... канд. біол. наук. – ЧНУ ім. Ю. Федьковича, 2013. – 153 с.

Отримано 13.12.2012