Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Національна академія наук України
Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВОЙЧУК СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ

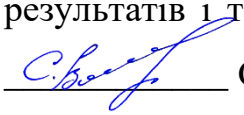
УДК: 579.234+576.314]:[57.04:612.176]:577.1/.2(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

МЕХАНІЗМИ ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ НА БІОСИНТЕЗ КОМПОНЕНТІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ, ПОЗАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ ТА ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ МІКРООРГАНІЗМІВ

03.00.07 - Мікробіологія
09 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
 С.І. Войчук

Науковий консультант: Громозова Олена Миколаївна, доктор біологічних наук

Львів - 2021

АННОТАЦІЯ

Войчук С.І. Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 "Мікробіологія" (09 - Біологія). - Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню фізико-хімічних, структурних та функціональних особливостей будови поверхневих клітинних структур (клітинної стінки (КС), позаклітинного матриксу (ПКМ) і цитоплазматичної мембрани (ЦПМ)), які відіграють роль у стійкості клітин мікроорганізмів до дії факторів стресу та створенню моделі регуляції біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ факторами фізико-хімічної природи.

На прикладі мікроорганізмів різного систематичного положення показано, що ефекти дії хімічних і фізичних факторів залежать від природи діючого чинника і від виду мікроорганізму. Відмінності в ефективності дії радіочастотного електромагнітного випромінювання (РЧ-ЕМВ) метрового, сантиметрового і міліметрового діапазонів на цито-морфологічні ознаки КС, ПКМ і ЦПМ в клітин бактерій і дріжджів, спонукали зосередити увагу на вивченні шляхів і механізмів біологічної дії фізичних чинників стресу на модельному еукаріотичному організмі, яким є дріжджі *S. cerevisiae*.

Встановлено, що процеси синтезу білків і цукрів КС і ПКМ, вміст жирних кислот (ЖК) і стеролів в мембранах виявляють надвисокі кореляційні індекси один з одним (до 99%) і разом створюють систему захисту клітин від широкого спектру чинників стресу. Виявлені окремі структурні компоненти КС, ПКМ і ЦПМ, які можуть вважатися чинниками загальної стійкості до стресів. До таких можна віднести вміст *N*-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) в КС і рівень експресії *PHO84* (P_i-транспортний канал ЦПМ). Обидва показники виявляли високу

(понад 90%) кореляційну залежність із стійкістю клітин до факторів стресу в цілому. Вміст GlcNAc, в свою чергу, тісно пов'язаний із пулом С18:х ЖК, який має відношення до формування стійкості клітин дріжджів до кислотного стресу і гіпертонічності (R = 93%-99% при $p \leq 0{,}01$-$0{,}07$). Відсутність залежності між цими показниками і величиною нанотвердості клітин вказує на те, що стійкість клітин до оцтової кислоти і антибіотиків визначається не фізичними властивостями поверхневих структур, а їх хімічною будовою і транспортними процесами в мембранах.

Серед внутрішньоклітинних елементів, чинниками загальної стійкості до стресів можна вважати окремі стероли, які були визначені як сілан,[[(3-β-22E)-ергоста-7,22-дієн-3-іл]окси]триметил- і 5-Хі-ергост-7-єн-3-β-(триметилсілокси)-. Біологічна роль цих сполук невідома, проте за результатами наших досліджень їх вміст в клітинах корелює із стійкістю до всіх вивчених факторів стресу. На противагу цим двом сполукам, пул ергостеролу виявляв лише близьку до достовірної ($p \leq 0{,}07$) залежність із стійкістю клітин до кислотного стресу.

Наномеханічні властивості (жорсткість) КС впливає не лише на стійкість клітин до осмотичних пертурбацій і механічних деформацій, але й до дії пероксидного стресу. Виявлено, що ключовим чинником нанотвердості є комплекс, який складається з *N*-ацетилгалактозаміну (GalNAc) КС і ПКМ, *N*-ацетилнейрамінової кислоти ПКМ, а також GPI-білків КС (Cwp1 і Flo11). Аналіз експресії стрес-індукованих генів показав існування високих кореляційних залежностей (понад 96% при $p < 0{,}04$) між показником нанотвердості і рівнем експресії *PPN1, GPD1* і *GRE2*. І хоча останні два гени є маркерами гіперосмотичного стресу, продукти їх експресії розташовані в цитоплазмі і пероксисомах (де регулюють біохімічні процеси перетворення гліцеролу і глікольальдегіду в умовах стресу), тобто не можуть мати безпосереднього впливу на показник жорсткості КС. А тому виявлені кореляційні залежності очевидно є непрямими.

Такі чинники стресу як пероксид гідрогену, оцтова кислота і сорбітол суттєво впливали на вміст мінорних цукрів КС і ПКМ, таких як *N*-ацетилглюкозамін і *N*-ацетилгалактозамін, проте ефекти суттєво змінювалися в наслідок дії на клітини РЧ ЕМВ ДВЧ-діапазону (40,68 МГц) і вміст глюкозаміну зменшувався в клітин дефектних за PPN1 і зростав в клітин дефектних за PPX1. В клітинах із подвійною делецією ефект залежав від типу стресу. При цьому, було відмічено, що за умови одночасної дії комплексу стресових факторів біологічна відповідь формується на чинник з найбільшим цито- і генотоксичним потенціалом.

Вміст мажорних складових (маноза, глюкоза) в КС під дією чинників стресу зменшується, проте відбувається пропорційне збільшення їх вмісту в ПКМ, що може вказувати на перерозподіл цукрів між КС і ПКМ.

Склад ЖК, один з небагатьох показників, який не мав залежності із дефектністю клітин за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 проте достовірно змінювався за дії окремих стресових факторів (ДВЧ-ЕМВ і антибіотика ністатина). Обидва чинники стресу знижували вміст пальмітинової (С16:0) ЖК. У випадку ністатину ефект пов’язаний із загальним зниженням рівню життєздатності клітин дріжджів, в той час як за дії ДВЧ-ЕМВ відбувається послаблення певних етапів біосинтезу ЖК, про що свідчить майже дворазове зниження рівнів експресії гену десатурази ЖК *OLE1* на фоні стабільної активності інших генів: *ELO1* (елонгази ЖК) і *FAS1* (синтетази ЖК).

Дія чинників стресу призводила до морфологічних змін в будові ядерного апарату (утворення гетерохроматину) і викликала геномну мінливість. Зокрема такі ефекти були відмічені при дії ЕМВ. РЧ-ЕМВ УВЧ-діапазону (1871 МГц, 0,1-10мкВт/см^2, 2 доби, 7 годин/добу) викликало необернену геномну мінливість. Проте НзВЧ-випромінювання з частою 57-62,5 ГГц було індуктором мітотичної рекомендації і прямих мутацій. НзВЧ-випромінювання сприяло утворенню дволанцюгових розривів молекули ДНК і посилювало подібну ж дію для УФ-випромінювання, яке в нормі викликало лише

одноланцюгові розриви. В той же час ДВЧ-випромінювання (40,68 МГц) не мало мутагенної дії.

Механізм дії РЧ-ЕМВ може базуватися на його здатності збільшувати вміст внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК). Опосередковано на це вказує майже триразове збільшення активності ферментів каталаз вже за 15 хв дії РЧ-ЕМВ (40,68 МГц). В свою чергу, неконтрольоване збільшення рівню внутрішньоклітинних АФК може викликати порушення білків, про що свідчить активація експресії *UBC6*, гену який кодує один з білків убіквітинового комплексу знешкодження дефектних білків. Рівні експресії *UBC6* збільшувалися в 1,5-2,1 раза ($p \leq 0,05$) під дією на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 15 Вт, 5-30 хв). Очевидно це призводить до зміни внутрішньоклітинної осмолярності і pH, що слугує сигналом для активації відповідних сигнальних шляхів і запуску репараційних процесів, викликає зміни в структурі КС, ПКМ і ЦПМ, що й відображається на змінених адгезивних властивостях клітин до біотичних і абіотичних поверхонь, а також у стійкості клітин дріжджів до антибіотиків.

Під дією чинників стресу в клітинах дріжджів відбувається посилення експресії низки генів-маркерів стресу *GSY2*, *RNR3*, *GRE2*, *GPD1* і *HSP12*, що в цілому вказує на реплікативний стрес. Однак стрес-індуковані транскриптомні відмінності в клітин дефектних за полі(Ф)азами вказують на існування різних шляхів формування стресових реакцій в дефектних клітинах, які очевидно опосередковані активністю ферментів PPN1 і PPX1.

Ефективність дії факторів стресу, так само як і склад КС, ПКМ і ЦПМ суттєво залежали від дефектності клітин за поліфосфатазами PPN1 і PPX1. Ці ферменти перебувають на різних метаболічних шляхах і відіграють вагому роль не лише для формування повноцінної фенотипової відповіді клітин на дію стресів але й залучені до процесів біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, процесів адгезії і міжклітинної взаємодії, до стійкості клітин до антибіотиків й інших процесів. Фермент PPX1 приймає участь у формуванні стійкості до кислотного стресу викликаного дією оцтової кислоти, а фермент PPN1

долучений до формування відповіді на дію з боку пероксидного стресу і гіперосмотичного шоку. Окрім того PPN1 регулює шляхи активації адаптивної відповіді. В клітин дефектних за PPX1 значно змінювався склад білків КС з луго-чутливими зв'язками, що посилювалося за подвійної делеції: в КС таких клітин присутні білки з мол. вагою до 30 кДа, яких не виявлено в клітин батьківського штаму і в клітин дефектних за PPN1. Проте, дефектність за PPN1 впливає на кількісний вміст білків КС з нековалентними зв'язками.

Дефектність клітин за полі(Ф)азами викликає посилення експресії гену *STI1*, який кодує білок кошаперону *hsp90* і pH-специфічного індикатора *PDR12*. Водночас, клітини, дефектні за PPN1 (включаючи клітини подвійного мутанта) виявляли посилення експресії гену *GPD1*, який кодує гліцерол-3-Ф-дегідрогеназу. Приймаючи до уваги, що дефектність за полі(Ф)азами не впливала на ростові показники клітин дріжджів і ефективність споживання субстратів (глюкози і фосфору), отриманий результат може вказувати на посилення синтезу *альфа*-амілоїдних білків і зміну внутрішньоклітинного pH, які мають місце в клітинах дріжджів дефектних за цими полі(Ф)азами. Дефектність за PPN1 додатково викликає ще й зміну внутрішньоклітинної тонічності.

За дії чинників стресу відбуваються структурні зміни в КС, ПКМ і ЦПМ, які можуть бути безпосередньою причиною більш високої стійкості клітин дріжджів до антибіотиків, або ж впливати на адгезивні властивості клітин. Так дія пероксидного стресу і випромінювання ДВЧ (40,68 МГц) і УВЧ (1871 МГц) діапазонів сприяли збільшенню стійкості клітин дріжджів до антибіотиків поліенового і азолового ряду, в той час як кислотний стрес навпаки знижував цей показник. Гіперосмотичний стрес ефективно збільшував стійкість до антибіотиків лише в клітин дефектних за PPN1, включаючи клітини подвійного мутанта. Ключовими елементами для формування мікробної стійкості до антибіотиків виявилися рівень глюкозаміну в КС і ергостеролу в ЦПМ, а також рівень експресії *PHO84*, гену, який кодує білок трансмембранного каналу транспорту фосфату.

При вивченні адгезивних властивостей клітин дріжджів на моделі кобальт-хромових (Wironit, Wirobond 280, Gialloy PA) і нікель-хромових (Viron 99, Virocer plus, Gialloy CB/N) стоматологічних сплавів металів, а також на моделі взаємодії клітин дріжджів із клітинами ссавців (епітеліоподібні і фібробластні клітини) було визначено, що ДВЧ-ЕМВ, в обох моделях, збільшує величину адгезії. Проте у випадку адгезії до сплавів металів можливою причин такого ефекту може бути збільшення стійкості клітин дріжджів до токсичних іонів металів (Ni2+, Cr3+), які можуть утворюватися на поверхні сплавів в результаті хемокорозії В той час як у випадку клітин ссавців такий ефект пов'язаний зі зміною властивостей адгезинів на поверхні клітин дріжджів.

Таким чином, в результаті проведених досліджень були встановлені основні структурні елементи КС, ПКМ і ЦПМ, які відіграють роль у формуванні стійкості клітин дріжджів до дії чинників стресу хімічної природи (пероксидний і кислотний стреси, гіпертонічність), антибіотиків і генотоксичних агентів. Запропоновано механізм біологічної дії неіонізуючого випромінювання радіочастотного діапазону і встановлено внутрішньоклітинні шляхи, через які відбувається модуляція синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ за дії факторів фізичної і хімічної природи. Запропонована модель впливу РЧ-ЕМВ може слугувати основою для розробки методів керованого синтезу компонентів структур КС, ПКМ і ЦПМ, а радіочастотне ЕМВ метрового-міліметрового діапазонів може бути використано для надання стійкості мікроорганізмам до цито- і генотоксичних чинників, які широко використовуються в агро- і біотехнологічній галузях, і слугуватиме охороні довкілля, тощо.

***Ключові слова**: стрес, неіонізуюче електромагнітне випромінювання радіочастотного діапазону, мікроорганізми, дріжджі, поліфосфатази, позаклітинний матрикс, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана.*

ANNOTATION

Voychuk S.I. Mechanisms of action of stress factors on the biosynthesis of components of the cell wall, extracellular matrix and cytoplasmic membrane of microorganisms. - Qualifying scientific work on the manuscript rights.

Thesis submitted for the degree of Doctor of Biological Sciences (doctor of sciences) in specialty 03.00.07 - microbiology (09 - Biology). - Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv. - Institute of cell biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

The doctoral thesis is related to the study of physicochemical, structural, and functional features of cell wall (CW), extracellular matrix (ECM), and cytoplasmic membrane (CPM) which play a role in the resistance of microorganisms to stress factors and to create a model of regulation of biosynthesis of the components of CW, ECM, and CPM by physical and chemical factors.

Studies carried out with microorganisms of various systematic position shown that the effects of chemical and physical factors depend both on the nature of the factor and the type of microorganism. The differences in the efficiency of radio frequency electromagnetic fields (RF-EMFs) of meter, centimeter, and millimeter wave bands to impact the cyto-morphological features of CW, ECM, and CPM in bacterial and yeast cells, stimulated to study the pathways and mechanisms of biological action of physical stresses using yeast *S. cerevisiae* which is the model eukaryotic organism.

Identified that the processes of biosynthesis of proteins and sugars of CW and ECM, the content of fatty acids (FAs) and sterols in membranes have high correlation indexes with each other (up to 99%) and together create a system of cell protection against a wide range of stress factors. The separate structural components of CW, ECM, and CPM which can be considered as factors of the general resistance to stresses were revealed. These include the content of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) in the CW and the expression level of *PHO84* (P_i-transport channel in CPM). Both indicators showed a high (over 90%) correlation with the resistance of cells to stress factors in general. The content of GlcNAc, in turn, is closely related to the quantity

of C18:x FAs, which is related to the formation of resistance of yeast cells to acid and hyperosmotic stresses (R = 93%-99% at $p \leq 0.01$-0.07). The lack of relationship between these indicators and the magnitude of cell nano-stiffness indicates that the resistance of cells to acetic acid and antibiotics is determined not by the physical properties of surface structures, but by their chemical composition and by transport processes in membranes.

Among intracellular elements, several sterols can be considered as the factors of general resistance to stresses. These are silane,[[(3-β-22E) -ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl- and 5-Xi -ergost-7-en-3-β- (trimethylsiloxy) -. The biological role of these compounds is unknown, but according to our studies, their content in yeast cells correlates with resistance to all studied stressors. In contrast to these two compounds, ergosterol showed only a close to significant ($p \leq 0.07$) correlation with the yeast cells resistance to acid stress. Nanomechanical properties (stiffness) of CW affects not only the resistance of cells to osmotic perturbations and mechanical deformations, but also to the action of peroxide stress. It was found that the key factor of cell stiffness is a complex consisting of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) of CW and ECM, *N*-acetylneuraminic acid of ECM, as well as CW GPI-proteins (Cwp1 and Flo11). Analysis of expression of several genes which are markers of stresses showed the existence of high correlation (over 96% at $p < 0.04$) between the CW stiffness and the expression level of *PPN1*, *GPD1* and *GRE2*. Although the last two genes are markers of hyperosmotic stress, their products located in the cytoplasm and peroxisomes (where they regulate the biochemical processes of conversion of glycerol and glycol aldehyde under stress), i.e. these two genes cannot directly affect the CW stiffness. Therefore, the identified correlations are obviously indirect.

Stressors such as hydrogen peroxide, acetic acid and sorbitol significantly affected the content of minor sugars in CW and ECM, that are *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine, but the effects changed significantly due to the action on the RF-EMF (40.68 MHz) and the glucosamine content decreased in the PPN1-deficient cells and increased in PPX1-deficient cells, while in the double-mutant cells the effect depended on the type of stress. Same time, it was determined that under the

simultaneous action of a complex of stressors, the biological response is formed to the factor with the greatest cyto- and/or genotoxic potential.

The content of major components (mannose, glucose) in the CW under the action of stress factors decreases, but there is a proportional increase in their content in the ECM, which may indicate a redistribution of sugars between the CW and ECM.

The content of FAs was one of the few indicators that did not depend on the defect of cells by polyphosphatases (poly(P)ases) PPN1 and PPX1, but significantly changes under the action of certain stressors (VHF-EMF and the antibiotic nystatin). Both stress factors reduce the content of palmitic FA (C16:0). In the case of nystatin, the effect is associated with a general decrease in the cell viability, while under the action of VHF-EMF the effect connects to a weakening of some stages of FAs biosynthesis, as evidenced by almost twofold decrease in the levels of expression of FAs desaturase *OLE1* while expression of *ELO1* and *FAS1* that code FAs elongase and FAs synthetase, respectively, remain quite stable.

The action of stress factors led to morphological changes in the structure of the nuclear apparatus (formation of heterochromatin) and caused genomic instability. The ability of the RF-EMF of 1871 MHz (0.1-10 μW/cm^2, 2 days, 7 h/day) to cause genomic instability was irreversible but did not show a connection with the possible mutagenic effect of these factors. Among of the studied types of EMFs only RF-EMF with a frequency of 57-62.5 GHz was an inducer of mitotic recombination and direct mutations. This type of EMF contributed to the formation of double-strand breaks in the DNA molecule and enhanced the same effect for UV-radiation, which normally caused only single-strand breaks. At the same time, the EMF of 40.68 MHz had no mutagenic effect.

The mechanism of action of RF-EMFs may be based on its ability to increase the content of intracellular reactive oxygen species (ROS). Indirectly, this is indicated by an almost threefold increase in the activity of catalase enzymes that was marked 15 min after the action of RF-EMF of 40.68 MHz. In turn, an uncontrolled increase in the level of intracellular ROS can cause protein disruption, thar was evidenced by the activation of expression of *UBC6*, a gene encoding one of the proteins of the

ubiquitin complex that destroy the defective proteins. *UBC6* expression levels increased 1.5-2.1-fold ($p \leq 0.05$) under the action on the yeast cells of the EMF 40.68 MHz (15 W, 5-30 min). Possibly this leads to changes in intracellular osmolarity and pH, which serves as a signal for activation of the corresponding signaling pathways and initiate the processes of reparation, causes changes in the structure of CW, ECM, and CPM, which are reflected in the altered adhesive properties of cells to biotic and abiotic surfaces and in the changes of cell resistance to antibiotics as well.

Under the influence of stress factors in yeast cells, the expression of several stress marker genes *GSY2*, *RNR3*, *GRE2*, *GPD1*, and *HSP12* is enhanced, which generally indicates a replicative stress. However, the stress-induced transcriptomic differences in the cells defective by poly(P)ases indicate the existence of different ways of forming stress responses in defective cells, which are apparently mediated by the activity of enzymes PPN1 and PPX1.

The effectiveness of stress factors, as well as the composition of CW, ECM, and CPM significantly depended on the cell deficiency on polyphosphatases PPN1 and PPX1. These enzymes participate at the different metabolic pathways and play an important role not only for the formation of a complete phenotypic response of cells to stresses but also involved in the biosynthesis of CW, ECM, and CPM components, adhesion and intercellular interaction, cell resistance to antibiotics, *etc*. The enzyme PPX1 is involved in the formation of resistance to acid stress caused by the action of acetic acid, and the enzyme PPN1 is involved in the formation of the response to the action of peroxide stress and hyperosmotic shock. In addition, PPN1 regulates the activation of the adaptive response. In the PPX1-deficient cells, the composition of CW proteins with alkali-sensitive bonds changed significantly, that was enhanced in the cells of the double mutant: in the CW of such cells, there were detected proteins with molecular weighing up to 30 kDa, which were not detected in the cells of parent strain and in cells deficient by PPN1. However, PPN1 deficiency affect the quantitative content of non-covalently bound CW proteins.

Deficiency of cells by poly(P)ases causes increased expression of *STI1*, which encodes the coshaperon protein *hsp90* and the pH-specific indicator *PDR12*. At the same time, PPN1-deficient cells (including double mutant cells) showed increased expression of the *GPD1*, which encodes glycerol-3-P-dehydrogenase. Given that the defect in poly(P)ases did not affect the growth rates of yeast cells and the efficiency of consumption of substrates (glucose and phosphorus), the result may indicate increased synthesis of *alpha*-amyloid proteins and changes in intracellular pH that occur in the yeast cells deficient by these poly(P)ases. The PPN1 deficiency additionally causes a change in intracellular tonicity.

Under the action of stress factors, structural changes occur in the CW, ECM, and CPM, which can be a direct cause of an enhanced resistance of the yeast cells to antibiotics and affect the adhesive properties of the cells. Thus, the action of peroxide stress and RF-EMFs (40.68 MHz and 1871 MHz) increased the resistance of yeast cells to the polyene and azole antibiotics, while acid stress, on the contrary, reduced it. Hyperosmotic stress effectively increased antibiotic resistance only in PPN1-deficient cells, including double mutant cells. The key elements for the formation of microbial resistance to antibiotics were the level of glucosamine in the CW and ergosterol in the CPM, as well as the level of expression of *PHO84*, a gene that encodes a protein of the transmembrane phosphate transporter.

Study of adhesive properties of the yeast cells in the model of cobalt-chromium (Wironit, Wirobond 280, Gialloy PA) and nickel-chromium (Viron 99, Virocer plus, Gialloy CB/N) dental alloys, as well as in the model of interaction of the yeast cells with mammalian cells (epithelial and fibroblast cells) it was determined that RF-EMF (40,68 MHz), in both models, increases cell adhesion. However, in the case of adhesion to dental alloys, a possible cause of this effect may be an increase in the resistance of the yeast cells to toxic metal ions (Ni2 +, Cr3 +), which may form on the surface of alloys because of chemocorrosion. While in the case of mammalian cells the effect can be related to the changes of the properties of adhesins on the surface of yeast cells.

Thus, as a result of the study the main structural elements of CW, ECM, and CPM were established, which play a role in resistance of the yeast cells to the action of chemical stress factors (peroxide and acid stress, hypertension), antibiotics and genotoxic agents. The mechanism of biological action of non-ionizing radiation of the radio frequency range is proposed and the intracellular pathways through which the synthesis of the components of CW, ECM, and CPM under the action of factors of physical and chemical nature is modulated were established. The proposed model of the RF-EMF action can serve as a basis for the development of methods for controlled synthesis of components of the structures of CW, ECM, and CPM, and the RF-EMF of the meter-millimeter wave bands can be used to increase a resistance of microorganisms to cyto- and genotoxic factors that are commonly used in agro- and biotechnology, that can serve an environmental protection, etc.

Key words: *stress, non-ionizing radiofrequency electromagnetic fields, microorganisms, yeast, polyphosphatases, extracellular matrix, cell wall, cytoplasmic membrane.*

СПИСОК ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – *особистий внесок здобувача*)

Монографії (розділи)

1. Gromozova E.N., Voychuk S.I. Influence of radiofrequency EMF on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system // Biophotonics and Coherent Systems in Biology, L.V. Beloussov, V.L. Voeikov, V.S. Martynyuk, Printed in the USA by Springer Science Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. – 2007. – P. 167-175. (*Автором проведено дослідження з вивчення впливу на клітини дріжджів електромагнітного випромінювання ДВЧ-діапазону, здійснено аналіз літератури, узагальнення і представлення результатів дослідження*).

Статті у фахових виданнях

2. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Lytvyn P.M., Podgorsky V.S. Changes of surface properties of yeast cell wall under exposure of electromagnetic field

(40.68 MHz) and action of nystatin // The Environmentalist. – 2005. – Vol. 25. – P. 139-144. (*Автором проведено підготовку і обробку клітин дріжджів різними видами стресів і для вивчення методом атомно-силової мікроскопії, здійснено аналіз літератури, узагальнення і представлення результатів дослідження*).

3. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Влияние излучений видеодисплейных терминалов на клетки эукариотического модельного организма *Saccharomyces cerevisiae* // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Серія: біологія. – 2007. – Вип. 5, № 768. – С. 52-56. (*Автором проведено дослідження впливу факторів, генерованих відеодисплейними терміналами, на фізіологічні показники росту клітин дріжджів, виконано статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів до друку*).
4. Громозова О.М, Войчук С.І., Брюзгінова Н.В., Красов П.С., Масюк Б.Р. Розробка тест-системи для вивчення впливу різних типів електромагнітного випромінювання на біологічні об’єкти // Біологія та валеологія (Збірник наукових праць). Випуск 9. Харків 2007. – С. 25-30. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіологічні показники росту клітин дріжджів, виконано статистичну обробку даних і їх узагальнення*).
5. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л., Горчев В.Ф., Карахим С.А. Особенности строения волютиновых гранул в клетках низших полифосфат-аккумулирующих эукариот // Биотехнология. – 2010. – №4. – С. 55-61. (*Автором проведено підготовку клітин дріжджів для вивчення структури волютинових гранул методом конфокальної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів дослідження*).
6. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Влияние космо-физических факторов на реакцию метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* // Геофизические процессы и биосфера. – 2010. –

№ 2. – С. 67-76. (*Автором проведено статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).

7. Громозова Е.Н., Богатина Н.И., Брюзгинова Н.В., Качур Т.Л., Войчук С.И., Шейкина С.И., Григорьев П.Е. Проявление реакции метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* в условиях экранирования различными материалами // Питання біоіндикації та екології. – 2011. – Вип. 15, №2. – С. 232-244. (*Автором проведено підготовку клітин дріжджів для вивчення реакції метахромазії в умовах екранування, виконано статистичні аналізи*).
8. Babenko L.P., Zholobak N.M., Ahcherbakov A.V., Voychuk S.I., Lazarenko L.M., Spivak M.Ya. Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms *in vitro* // Мікробіол. журн. – 2012. – Т.74, №3. – С.54-62. (*Автором проведено підготовку клітин мікроорганізмів для вивчення методом трансмісійної електронної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів відповідного етапу дослідження*).
9. Voychuk S.I., Gromozova E.N. Microbial growth fluctuating in response to solar-terrestrial activity variations // Мікробіол. журн. – 2012. – Т. 74, № 3. – С. 63-71. (*Автором проведено дослідження ростових параметрів клітин дріжджів і відповідні статистичні аналізи для виявлення кореляційних залежностей із активністю космо-фізичних і гео-атмосферних чинників, виконано узагальнення і представлення результатів дослідження*).
10. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И., Рязанова Л.П., Кулаковская Т.В. Новые аспекты плейотропного действия генов, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Мікробіол. журн. – 2012. – Т. 74, № 5. – С.26-31. (*Автором проведено підготовку клітин дріжджів для вивчення функціональної ролі волютинових гранул, здійснено узагальнення результатів*).
11. Klochko V.V., Zelena L.B., Voychuk S.I., Ostapchuk A.M. Peculiarities of *Alteromonas macleodii* strains reflects their deep/surface habitation rather than geographical distribution // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 58. - P: 129-

135. (*Автором проведено підготовку клітин бактерій для вивчення їх полісахаридного складу методом електронної мікроскопії, виконано статистичні аналізи, узагальнення і представлення результатів дослідження*).

12. Сафронова Л.А., Войчук С.И., Сухов Б.Г., Подгорский В.С. Цитотоксическое и ДНК-повреждающее действие пребиотических субстанций // Biotechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, № 6. – С. 86-93. (*Автором проведено вивчення цито- і генотоксичної дії пребіотичних субстанцій, проведено узагальнення і представлення результатів дослідження*).
13. Дронова М.Л., Войчук С.І., Вринчану Н.О. Ультраструктура *Escherichia coli* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів // Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 26-29. (*Автором проведено дослідження ултраструктури клітин бактерій, узагальнення і представлення результатів*).
14. Войчук С.И. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как модельный организм для исследования канцерогенности неионизирующих электромагнитных полей и излучений // Мікробіол. журн. – 2014. – Т. 76, № 1. – С. 53-61. (*Автором проведено аналіз літератури, узагальнення і представлення результатів до друку*).
15. Dronova M. L., Voychuk S.I., Vrynchanu N. O. Antibacterial activity of 1-[4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl) phenoxy] -3- (*N*-benzyl-4-methylpiperidine)-2-propanol chloride // Ukrainian Biopharmaceutical J. – 2015. – Vol. 6, № 41. – P: 92-97. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин мікроорганізмів методом електронної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів дослідження*).
16. Дудікова Д.М., Войчук С.І., Вринчану Н.О. Ультраструктура *Candida albicans* при дії 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(*N*-бензил, *N*-диметиламіно)2-пропанол хлориду // Вісник морфології. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 300-303. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин дріжджів роду Кандіда методом*

електронної мікроскопії, виконано узагальнення і представлення результатів дослідження).

17. Суворова З.С., Войчук С.І., Вринчану Н.О. Ультраструктура *S. cerevisiae* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспирті // "Вісник Вінницького національного медичного університету". – 2016. – Т. 20, № 2. – С: 347-351. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин дріжджів сахароміцетів методом електронної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів дослідження*).
18. Garmasheva I., Kovalenko N., Voychuk S., Ostapchuk A., Livins'ka O., Oleschenko L. *Lactobacillus* species mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against opportunistic pathogens *in vitro* // Bioimpacts. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P: 219-223. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин бактерій методом електронної мікроскопії, виконано узагальнення і представлення результатів дослідження*).
19. Громозова О.М., Качур Т.Л., Войчук С.І., Харчук М.С. Дослідження реакції метахромазії *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Z. – 2016. – Т. 78, № 3. – С. 45-51. (*Автором проведено статистичні аналізи, узагальнення і представлення результатів дослідження*).
20. Pidgorskiy V.S., Voychuk S.I., Gromozova E.N. The role of polyphosphates in the cell wall and cytoplasmic membrane reactions to the action of stress // Microbiol. Z. – 2017. – № 1. – C. 59-65. (*Автором проведено дослідження з вивчення будови клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани клітин дріжджів, виконано узагальнення щодо ролі поліфофатаз і представлення результатів для друку*).
21. Voychuk S.I., Zelena L.B., Gromozova E.N., Pidgorskyi V.S., Dumansky V.Yu. , Bezverkhaya A.P. The possible role of polyphosphatases in yeast sensitivity to electromagnetic fields of DCS-1800 // Cytology and Genetics. – 2017. - № 4. – P: 282-290. (*Автором проведено дослідження з вивчення*

фізіолого-біохімічних особливостей клітин дріжджів, здійснено узагальнення, статистичну обробку даних і представлення результатів для друку).

22. Дудікова Д., Войчук С., Вринчану Н. Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(n-бензил, n-диметил аміно)-2-пропанол хлориду на *Pseudomonas spp*. // ScienceRise: Biological Science. – 2018. – Vol. 4, № 13. – P: 35-41. (*Автором проведено дослідження ультраструктури клітин бактерій, здійснено узагальнення і представлення результатів*).
23. Skrotskyi S., Voychuk S., Khomenko L., Vasyliuk O., Pidgorskyi P. Influence of nanoparticles on the solventogenesis of bacteria *Clostridium beijerinckii* IMV B-7806, *Clostridium acetobutylicum* IMV B-7807 // Ukrainian Food Journal. – 2019. – Vol. 8, № 1. – P: 110-118. (*Автором проведено дослідження ультраструктури клітин бактерій під дією наночасток, узагальнення і представлення результатів*).
24. Voychuk S.I., Gromozova O.M. The functional role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases under stresses action and for adaptive response development // Microbiol. Z. – 2020. – T. 82, № 1. – C. 3-12. (*Автором проведено дослідження чутливості клітин дріжджів до дії різних стресових чинників, узагальнення щодо ролі поліфосфатаз і представлення результатів до друку*).
25. Voychuk S.I., Gromozova O.M. The role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases in the stress-induced changes of the polysaccharide composition of cell wall and extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* cells // Microbiol. Z. – 2020. – T. 82, № 2. – C. 3-13. (*Автором проведено дослідження щодо будови позаклітинного матриксу і клітинної стінки, чутливості клітин дріжджів до дії різних стресових чинників, здійснено узагальнення щодо ролі поліфосфатаз і представлення результатів до друку*).
26. Voychuk S.I., Gromozova O.M. Influence of the radiofrequency electromagnetic field 40.68 MHz on adhesion of *Saccharomce serevisiae* cells deficient in PPN1 polyphopshatase to dental alloys // Microbiol. Z. – 2020. – T. 82, № 3. – C. 3-13.

(*Автором проведено дослідження щодо адгезивних властивостей клітин дріжджів під дією фізичних чинників стресу, статистичні аналізи, узагальнення щодо ролі поліфосфатаз і представлення результатів до друку*).

27. Safronova L.A., Voychuk S.I., Brovarska O.S. Influence of nanobiocomposites on the exopolysaccharide matrix of *Bacillus* strains // Доповіді НАН України. – 2020. – Т. 8. – С. 81-91. (*Автором проведено дослідження будови позаклітинного матриксу клітин бактерій в результаті дії на них нанобіокомпозитів, визначено цитотоксичність нанобіокомпозитів, запропоновано гіпотетичні структурні формули полісахаридів бактерій, здійснено узагальнення і представлення результатів*).

Статті в інших виданнях

28. Підгорський В.С., Громозова О.М., Войчук С.І., Щеголева Т.Ю., Брюзгінова Н.В., Масюк Б.Р. Тест-система на основі клітин дріжджів для експрес-аналізу дії електромагнітних випромінювань за допомогою КВЧ-діелектрометрії // Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій / За ред. Г.В. Єльскької, В.Д. Походенка. – Київ: Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України, 2006. – С. 165-172. (*Автором проведено дослідження з вивчення чутливості клітин дріжджів до електромагнітного випромінювання НзВЧ-діапазону, виконано відповідну статистичну обробку даних, оцінку і представлення результатів*).
29. Щеголева Т.Ю., Громозова Е.М., Войчук С.И., Брюзгинова Н.В., Масюк Б.Р., Красов П.С. Разработка тест-систем для изучения влияния электромагнитного излучения на биологические объекты // Радиофизика и электроника. – 2008. – Т. 13, № 3. – С. 568–571. (*Автором проведено дослідження впливу електромагніного випромінювання на фізіологічні і біохімічні показники росту клітин дріжджів, статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).
30. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Sadovskiy M.G. The model of fungal population dynamics affected by nystatin // Int J Quant Chem. – 2010. – Vol. 110, Issue 1. –

P: 242-251. (*Автором проведено дослідження з чутливості клітин дріжджів до ністатину, узагальнення і представлення результатів до друку*).

31. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И., Григорьев П.Е. Результаты длительного мониторинга био-астрономического эффекта Чижевского-Вельховера // Физика сознания и жизни, космология и астрофизика. – 2011. – № 4. – С.12-14. (*Автором проведено статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).
32. Gromozova E., Voychuk S.I., Vishnevsky V., Ragulskaya M., Grigor'ev P. Cosmic rays as bio-regulator of deep time terrestrial ecosystems // Sun and Geosphere. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P:117-120. (*Автором виконано статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).
33. Gromozova E.N, Voychuk S.I. Zelena L.B, Gretckey I.A. Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation // Safety Engineering. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P: 89-92. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів, здійснено узагальнення і представлення результатів до друку*).
34. Gromozova E.N, Voychuk S.I. Zelena L.B, Gretckey I.A. Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation // Proceedings "The first international conference on radiation and dosimetry in various fields of research", Apr. 25-27, 2012, Niš, Serbia. – P: 137-139. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів, виконано узагальнення і представлення результатів до друку*).
35. Voychuk S.I., Ostapchuk A.M., Gromozova E.N. Effects of electromagnetic field and nystatin on *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid composition // Proceedings: The Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research (RAD 2014), May 27-30, 2014, Niš, Serbia. – P: 223-226. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного*

випромінювання на склад жирних кислот клітин дріжджів, узагальнення і представлення результатів до друку)

Патент на корисну модель

36. Корисна модель. Заявка № u 2011 01839 від 17.02.2011 р. Патент на корисну модель №62414 від 25.08.2011 р. Громозова О.М., Щеголева Т.Ю., Підгорський В.С., Войчук С.И., Брюзгінова Н.В «Оцінка впливу електромагнітного випромінювання методом Біо-КВЧ-діелектрометрії» (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів*)

Тези доповідей

37. Подгорский В.С., Громозова Е.Н., Войчук С.И. Дрожжевые клетки как альтернативные объекты изучения влияния на потребителя физических факторов видеодисплейных терминалов // Тез. 2-го Міжнародного симпозіуму "Біоетика – шлях до світових стандартів", Харків, 4-7 жовтня 2005. - С. 43.
38. Громозова Е.Н., Войчук С.И. Гелиофизическая активность и устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков // Международный Симпозиум "Гелио-геофизические факторы и здоровье человека", Новосибирск, Центр клинич. и эксперим. медицины РА Мед. Наук, 15 - 16 ноября 2005. – С. 132
39. Подгорский В.С., Громозова Е.Н., Войчук С.И. Микроорганизмы как биосенсоры космофизических воздействий // Тез. 6-й Международной конференции "Космос и биосфера: Космическая погода и биологические процессы", Партенит, Крым, 26 сентября - 1 октября 2005. – С. 202.
40. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Изменение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам в присутствии электромагнитных полей / Четвертый всероссийский конгресс по медицинской микологии, г. Москва, 24 - 25 марта 2006. // «Успехи медицинской микологии», под ред. Ю.В.Сергеева. – М: Нац. Акад. Микологии, 2006. – Т. 7, глава 6. – С. 164-165.
41. Войчук С.И., Громозова Е. Н. Биологическое действие физических факторов видеодисплейных терминалов и радиочастотного

электромагнитного поля // IV Международный Конгресс "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине", 3 - 7 июля 2006, г. Санкт-Петербург. – С. 104.

42. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Podgorskiy V.S. Use of a model organism for an estimation of action of the physical factors of videodisplay terminals // Proceedings: 4th International Workshop "Biological Effects of EMFs", 16-20 October 2006, Crete, Greece. – P. 135-138.

43. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Podgorskiy V.S. EMFs generated by video display terminals and EMF by frequency 40.68 MHz have opposite effects on viability of organisms // Book of Abstracts: 28th International Congress on Occupational Health, Milan, Italy, 11-16 June 2006. – P. 255.

44. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Изменение физиолого-биохимических свойств клеток *Saccharomyces cerevisiae* при слабых гравитационных вариациях, вызванных процедурой центрифугирования / V Всероссийский Конгресс по Медицинской Микологии, Москва, Россия 24-25 марта 2007 // «Успехи медицинской микологии», под ред. Ю.В.Сергеева. – М: Нац. Акад. Микологии, 2006. – Т. 9, глава 1. – С. 6.

45. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л., Лычак М.М., Шевченко В.Н. Связь метахромазии волютиновых зерен *Saccharomyces cerevisiae* с гелиофизическими факторами // Тезисы докладов: VII Международная крымская конференция „Космос и Биосфера", - Судак, Крым, Украина 1-6 октября 2007. – С. 103-104.

46. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л Связь явления метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* с гелиофизическими факторами // Кулаевские чтения по полифосфатам, 30 июня 2008, г. Пущино-на-Оке, Россия. – С.17.

47. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Влияние центрифугирования на физиолого-биохимическое состояние клеток дрожжей // Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. – С. 272.

48. Gromozova E., Voychuk S., Sadovsky M. The process of complicated cooperative behaviour in the antibiotic-cell system // Book of Abstracts: NATO advanced research workshop “Molecular self-organization in micro-, nano, and macro dimensions: from molecules to water, to nanoparticles, DNA and Proteins” dedicated to A.S. Davydov 95th birthday. – June 8-12, 2008, Kyiv, Ukraine. – P. 162.
49. Громозова Е.Н., Войчук С.И. Дрожжевые клетки – как объекты изучения биологического действия электромагнитного излучения // Труды IV Междунар. Науч. Конф. «Электромагнитные излучения в биологии. Био-ЭМИ-2008». – Калуга, Россия, 21-23 октября 2008 г. – С. 109-113.
50. Gromozova E.N., Voychuk S.I., Kachur T.L. Research of structural features of volutine granules of *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 by the method of confocal microscopy // 12th International Congress on Yeasts, 11-15 August 2008, Kyiv, Ukraine. – P. 219
51. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Качур Т.Л. Стохастичность биологического действия электромагнитных излучений // 5-й Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 29.06.2009-03.07.2009, Россия. – С. 124.
52. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И. Клеточные неорганические полифосфаты как акцепторы осцилляций геокосмических факторов // 5-й Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 29.06.2009-03.07.2009, Россия. – С. 166.
53. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Остапчук А.Н., Клочко В.В. Изменение пула жирных кислот в клетках дрожжей под действием внешних факторов стресса // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – № 1, 2009. – С. 19-20.
54. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л. Влияние космической погоды и антропогенного электромагнитного излучения на чувствительность дрожжевых клеток к антибиотикам // VI Международный симпозиум

«Актуальные проблемы биофизической медицины», Киев 14-17 мая 2009г., Украина. – С. 33.

55. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И. Поиск факторов вызывающих реакцию метахромазии волютиновых гранул дрожжевых клеток // Тезисы докладов: VIII Международная крымская конференция «Космос и Биосфера», Судак, Крым, Украина, 28 сент. - 3 окт., 2009. – С. 70-71.
56. Войчук С.І., Громозова О.М., Підгорський В.С. Вплив антропогенного електромагніт-ного випромінювання на клітини дріжджів // XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 24-30 травня 2009 р., Ужгород, Україна. – С. 41.
57. Громозова О.М., Качур Т.Л., Войчук С.І. Космічна погода та життєдіяльність мікроорганізмів. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 24-30 травня 2009 р., Ужгород, Україна. – С. 107.
58. Громозова О.Н., Григор'єв П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.І. Сучасний погляд на біо-астрономічний ефект Чижевського-Вельховера // Международная конференция, посвященная 165-летию обсерватории КГУ и 105-летию С.К. Всесвятского, 24-28 мая 2010 г., г. Киев, Украина. – С.17.
59. Gromozova E.N., Grigoryev P.Ye., Kachur T.L., Voychuk S.I. An influence of geocosmic and meteorological factors on the reaction of metachromasy of volutin granules of *Saccharomyces cerevisiae* // 9th Int. Mycological Congress "The Biology of Fungi", 1-6 Aug. 2010, Edinburgh, UK.
60. Громозова Е.Н., Богатина Н.И., Брюзгинова Н.В., Качур Т.Л., Войчук С.И., Щейкина Н.В. Проявление реакции метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* в условиях экранирования различными материалами // XI Международная Конференция по Бионике, Биокибернетике и Прикладной Биофизике, 4-6 ноября 2010, г. Киев, Украина. – С. 33-34.
61. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Реакция метахромазии как модельная система для изучения механизмов

взаимодействия клетки с космофизическими факторами // XI Международная Конференция по Бионике, Биокибернетике и Прикладной Биофизике, 4-6 ноября 2010г, Киев, Украина. – С. 34-35.

62. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Реакция метахромазии как модельная система для изучения механизмов воздействия космических факторов на клетки // Международный междисциплинарный симпозиум «Нанотехнология и ноосферология в контексте системного кризиса цивилизации», Симферополь, Ялта, 4-10 января 2011г. – С.43-45.
63. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Жолобак Н.М. Роль полифосфатаз эндо (PPN) и экзо (PPX) в процессах адгезии клеток дрожжей к клеткам млекопитающих // Проблемы медицинской микологии. – 2011, 13(2). – С. 68-69.
64. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л. Влияние условий культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на результаты реакции метахромазии волютиновых гранул // Международная крымская конференция «Космос и биосфера», Алушта, 5-10 октября 2011г. – С.174-175.
65. Voychuk S.I., Zelena L.B., Gromozova E.N., Pidgorskyi V.S. *Saccharomyces cerevisiae* genomic instability under exposure to mobile phones radiation of DCS-1800MHz // 19th Annual Southeastern Regional Yeast Meeting, 24-26 February 2012, Emory University, Atlanta, Georgia, USA. – P.110.
66. Zelena L., Voychuk S., Oblap R., Gromozova E. Expression of flo11 gene in *Saccharomyces cerevisiae* under influence of high frequency electromagnetic radiation // Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting. July 31-August 5, 2012.Princeton, New Jersey, USA. P.146.
67. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И., Григорьев П.Е. Биоиндикация факторов космической погоды // Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», 11-16 июня 2012, г. Санкт-Петербург, Россия. С.149.

68. Войчук С.И., Зеленая Л.Б., Громозова Е.Н. Роль генов полифосфатаз *ppn1* и *ppx1* в устойчивости клеток дрожжей к действию стрессовых факторов // Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», 11-16 июня 2012, г. Санкт-Петербург, Россия. С.141.
69. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Зеленая Л.Б., Подгорский В.С. Влияние неионизирующего ЭМИ на стрессовые реакции *Saccharomyces cerevisiae*// Междисциплинарная научная конференция "Адаптационные стратегии живых систем", Новый Свет, Крым, Украина. 11–16 июня 2012. Тезисы докладов. с. 235.
70. Маковій С.В., Войчук С.І., Громозова О.М. Участь генів поліфосфатаз PPN і PPX в адаптації дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до дії стресових факторів // IX Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології», 15-19 квітня 2013 р, Львів. – С.71.
71. Маковій С.В., Войчук С.І., Громозова О.М. Вплив електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону на адгезію дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // XI Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології», 15-19 квітня 2013 р, Львів. – С.148.
72. Сафронова Л.А., Войчук С.И., Лесничая М.В., Сухов Б.Г., Подгорский В.С., Трофимов Б.А. Исследование цитотоксической и генотоксической активности галактосодержащих полисахаридов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии. — 2013. — С. 94–95.
73. Lytvyn P.M., Gromozova E.N., Voychuk S.I., Ozhogan Z.R., Yakovyn O.M., Prokopenko I.V. The dental alloys complementary bioadhesive properties testing by physical and biological methods. Abstract book. The International Summer Scholl "Nanotechnology: from fundamental research to innovations" and International research and practice conference "Nanotechnology and nanomaterials" (NANO-2013). August 25-September 1, 2013 / Ed. by Prof. Leonid Yatsenko. – Lviv: Eurosvit, 2013 – P: 391.
74. Сафронова Л.А., Войчук С.И., Пуриш Л.М., Сухов Б.Г., Подгорский В.С. Биологическая активность новых пребиотических субстанций на основе

нанобиокомпозитов с полисахаридами // XIII З'їзд Товариства Мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 1-6 жовтня 2013 р, Ялта. – С. 323.

75. Ragulskaya M., Gromozova EN., Voychuk SI., Kachur TL. Ancient cellular structures and modern humans: change of survival strategies before prolonged low solar activity period // 40th COSPAR Scientific Assembly, Moscow, Russia from 2 - 10 August 2014. – F3.3-22-14 (ADS: 2014cosp...40E2686R).
76. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Жолобак Н.М. Роль полифосфатаз в процессах адгезии дрожжей к клеткам млекопитающих // Успехи медицинской микологии, Том XII / VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии. Москва, 8-10 апреля 2014. – С. 72-73.
77. Gromozova E., Voychuk S., Gretsky I., Dybkova S., Zholobak N. Genetic effects of non-ionizing electromagnetic fields action // Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2015, June 8-12, 2015, Budva, Montenegro. - P.125.
78. Voychuk S., Gromozova E., Pidgorskiy V. Yeast cell wall polysaccharide content under action of RF EMF and chemical stresses // Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2016, May 23-27, 2016, Niš, Serbia. - P.152.
79. Бойко І.П., Войчук С.І. Визначення полісахаридного складу клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою лектинів, мічених колоїдним золотом // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ», м. Київ, 22 квітня 2016. – С. 111.
80. Литвиненко Д.М., Войчук С.І., Громозова О.М., Маринченко Л.В. Вплив СВЧ опромінення та концентрації бутанолу на синтез полярних та нейтральних ліпідів // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ», м. Київ, 22 квітня 2016. – С. 128

81. Peretiazhko I.A., Voychuk S.I. Influence of stress factors on initiation of apoptosis in strains defective on polyphosphatases PPN1 and PPX1 // 2nd International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development outlook in the 21st Century”, Kyiv: DIA, 14-15 April 2016. – P. 82-83.
82. Перетяжко І.А., Войчук С.І. Вплив *Saccharomyces cerevisiae* дефектних за генами поліфосфатаз на цитоморфологічні властивості епітеліоподібних клітин ссавців // Abstract Book “З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського”. Lviv, 2017. P:143.
83. Voychuk S.I. Induction of Adaptive Response in Yeast Cells under Influence of Extremely High Frequency Electromagnetic Field // Conference Proceedings of ICEA 2017: 19th International Conference on Electromagnetics and Applications, Rome Italy May 04-05, 2017 / In International Journal of Electronics and Communication Engineering. 2017, 4(5):112.

ЗМІСТ

АННОТАЦІЯ 1
ВСТУП
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 45
СТРЕС ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ КЛІТИНИ .....
1.1 Механізми клітинної відповіді на стресові фактори навколишнього середовища 45
1.1.1. Шляхи формування загальної відповіді на дію факторів стресу 49
1.1.2. Шляхи адаптації до несприятливої температури 50
1.1.3. Механізми оксидативного стресу 52
1.1.4. Адаптаційні пристосування до умов осмотичного шоку 53
1.1.5. Адаптаційні пристосування до кислотного стресу 55
1.1.6. Електромагнітне випромінювання як фактор стресу 57
1.1.7. Генетична нестабільність як шлях адаптації до дії стресових факторів 63
1.1.8. Поліфосфати як фактори стійкості до чинників стрес*у* 64
1.1.9. Метаболізм поліфосфатів і стійкість мікроорганізмів до стресів ... 65
1.1.10. Особливості метаболізму поліфосфатів в клітин *S. cerevisiae* 68
1.1.11. Участь високомолекулярних неорганічних поліфосфатів у метаболізмі клітин дріжджів та в його регуляції 69
1.2 . Роль поверхневих структур у стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу 71
1.2.1. Регуляція синтезу компонентів клітинної стінки за дії стресових факторів 72
1.2.2. Регуляція синтезу компонентів цитоплазматичної мембрани за дії стресових факторів 84
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 101
2.1. Штами мікроорганізмів і умови культивування 101
2.2. Культури клітин ссавців та методи їх культивування 103

2.3. Фактори стресу і їх застосування 105
2.4. Фізіологічні показники росту клітин дріжджів 109
2.5. Фізичні показники поверхні клітин 110
2.6. Біохімічні показники клітин дріжджів 110
2.7. Вивчення адгезивних властивостей клітин дріжджів до біотичних і абіотичних поверхонь 115
2.8. Блокування транскрипції (пригнічення біосинтезу білків de novo) 116
2.9. Визначення чутливості клітин дріжджів до антибіотиків 117
2.10. Оцінка генетичної взаємодії (fitness-test) 117
2.11. Аналіз і величина геномної мінливості 118
2.12. Аналіз цілісності структури ДНК 119
2.13. Виділення РНК з клітин дріжджів і синтез кДНК 119
2.14. Полімеразна-ланцюгова реакція в режимі мультиплекс 120
2.15. Полімеразна-ланцюгова реакція в режимі реального часу і напівкількісна 121
2.16. Мікроскопічні методи дослідження 121
2.17. Проточна цитофлуориметрія 122
2.18. Морфометрія і аналіз цифрових зображень 123
2.19. Статистична обробка даних 123
РОЗДІЛ 3. МОРФОЛОГО-СТРУКТУРНІ І ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЙ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ НА ДІЮ ФАКТОРІВ СТРЕСУ 126
3.1. Морфолого-структурні особливості клітин мікроорганізмів різних систематичних груп на дію факторів стресу хімічної і фізичної природи .. 126
3.2. Вплив фізичних природних факторів на фізіолого-біохімічні особливості клітин дріжджів 133
3.3. Порівняльний аналіз фізіолого-біохімічних і фенотипових характеристик штамів дріжджів дефектних за поліфосфатазами 140
3.4. Вплив стресових факторів на морфолого-структурні і оптичні характеристики клітин дріжджів 142

3.5. Стійкість клітин дріжджів до однофакторного стресу 146
3.6. Стійкість клітин дріжджів до дії комплексу факторів стресу 150
3.7. Формування адаптивної відповіді клітинами дріжджів..... 154
3.8. Шляхи генетичної взаємодії полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу 159
РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ, ПОЗАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ І МЕМБРАН КЛІТИН ДРІЖДЖІВ ЗА ДІЇ ФАКТОРІВ СТРЕСУ 172
4.1. Компонентний склад клітинної стінки і позаклітинного матриксу клітин дріжджів за дії факторів стресу 172
4.1.1. Наномеханічні властивості клітин дріжджів за дії чинників фізичного стресу 172
4.1.2. Склад цукрів клітинної стінки і позаклітинного матриксу клітин дріжджів за дії стресів 180
4.1.1. Зміни в складі білків за дії факторів стресу 199
4.2. Вплив факторів стресу на склад цитоплазматичної мембрани клітин дріжджів 212
4.2.1. Вплив факторів стресу на склад жирних кислот 212
4.2.1.1. Профілі жирних кислот клітин дріжджів 212
4.2.1.2. Індивідуальна дія факторів стресу на склад жирних кислот 215
4.2.1.3. Вплив комплексу факторів стресу на склад жирних кислот 217
4.2.2. Вплив факторів стресу на вміст стеролів в клітинах дріжджів 221
4.2.2.1. Профілі стеролів клітин дріжджів 221
4.2.2.2. Вплив факторів стресу на склад стеролів клітин дріжджів 224
4.2.3. Вплив електромагнітного випромінювання (40,68 МГц) на експресію генів біосинтезу жирних кислот 228
РОЗДІЛ 5. СТАБІЛЬНІСТЬ ГЕНОМУ І ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ-МАРКЕРІВ СТРЕСУ В КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ 235
5.1. Цілісність структури ДНК за дії факторів стресу 235

5.2. Індукція одно- і дволанцюгових розривів ДНК за дії електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону 238
5.3. Роль полі(Ф)аз у прояві явища «геномної мінливості» 243
5.4. Експресія стрес-індукуємих генів 250
5.5. Вплив електромагнітного випромінювання (40,68 МГц) на експресію *UBC6* 256
РОЗДІЛ 6. ФЕНОТИПОВІ ЕФЕКТИ ДІЇ ФАКТОРІВ СТРЕСУ НА КЛІТИНИ ДРІЖДЖІВ261
6.1. Вплив факторів стресу на чутливість клітин дріжджів до антибіотиків 261
6.2. Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на адгезивні властивості клітин дріжджів 270
6.3. Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на процес міжклітинної взаємодії..... 286
6.3.1. Адгезія клітин дріжджів до клітин ссавців..... 286
6.3.2. Вплив блокаторів адгезії на взаємодію клітин дріжджів з клітинами ссавців 288
6.3.3. Синтез білків *de novo* клітинами дріжджів при їх взаємодії з клітинами фібробластів 291
6.3.4. Структурні зміни в клітинах ссавців викликані взаємодією з клітинам дріжджів 294
6.3.5. Експресія стрес-індукованих генів в клітинах дріжджів при їх взаємодії з клітинами ссавців 300
РОЗДІЛ 7. ОБГОВОРЕННЯ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ..... 304
7.1. Молекулярна модель регуляції синтезу компонентів клітинної стінки та ЦПМ дріжджових клітин факторами фізичної природи..... 305
7.2. Обговорення 309
ВИСНОВКИ..... 324
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 327
ДОДАТКИ 383

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АВ – адаптивна відповідь

АФК – активні форми кисню

ДВЧ ЕМВ – дужевисокочастотне електромагнітне випромінювання

ДГГА – дегідрогеназна активність

ЕДТА - етилендиамінтетраоцтова кислота

ЕМВ – електромагнітне випромінювання

КС – клітинна стінка

КУО – колонієутворююча одиниця

НзВЧ ЕМВ – надзвичайно високочастотне випромінювання

ПКМ – позаклітинний матрикс

Полі(Ф) – поліфосфати

Полі(Ф)аза – поліфосфатаза

ПТП – клітини перещеплюваної тестикули поросят

РЧ-ЕМВ – радіочастотне електромагнітне випромінювання

УВЧ ЕМВ – ультрависокочастотне електромагнітне випромінювання

ЦПМ – цитоплазматична мембрана

AMD – Атиноміцин D

ELO1 – елонгаза 1 жирних кислот

ESR– відповідь на стреси зовнішнього середовища

FAS1 – синтетаза жирних кислот

FLO11 – флокулін (GPI-зв’язаний глікопротеїн клітинної стінки)

GalNAc – *N*-ацетил-*D*-галактозамін

GlcNAc – *N*-ацетил-*D*-глюкозамін

МАРК – протеїнкінази, що активуються мітогенами

NANA – *N*-ацетилнейрамінова кислота (сіалова кислота)

OLE1 – дельта(9)-десатуразу жирних кислот

PBS – фосфатно-сольовий буфер (phosphate buffer saline)

PPN1 – ендополіфосфатаза, що кодується відповідним геном *PPN1*

PPX1 – екзополіфосфатаза, що кодується відповідним геном *PPX1*

UBC6 – убіквитин-звязаний фермент, залучений до процесу руйнування дефектних білків

ВСТУП

Вивчення будови клітини – один із важливих напрямків сучасної біології. Незважаючи на давню історію цієї проблеми, нові підходи та методи дослідження продовжують змінювати нашу уяву про структуру і функціонування цієї універсальної одиниці усього живого. Окреме місце у вивченні клітини займає її здатність протистояти стресовим навантаженням. Відбувається переосмислення ролі різних клітинних структур: вакуолі [1], цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) [2], цитоскелету [3–5], мітохондрій [6] у формуванні біологічної відповіді на дію різних стресів. Однак, саме поверхневі структури (клітинна стінка (КС), ЦПМ і позаклітинний матрикс (ПКМ)) є першим бар'єром на шляху сприйняття стресового сигналу. Відомо, що КС визначає механічну стійкість клітин до деформацій і осмотичних пертурбацій [7]. Проте з'являється все більше відомостей про роль структурних компонентів КС (цукрів і білків) у формуванні стійкості клітин й до інших видів стресу (пероксидний стрес [1, 2], етанольний стрес [8], тощо). Виявляється роль новітніх внутрішньоклітинних сполук, серед яких особливе місце займають поліфосфати і ферменти їх метаболізму поліфосфатази, для яких вже показано долученість до фактично всіх життєвих процесів від експресії генів, до формування біоплівок і факторів патогенності [9]. Виявлені біохімічні реакції поліфосфорилювання і досліджена участь поліфосфатів у синтезі манану КС [10], а також у формуванні стійкості до зовнішніх стресів [11, 12].

В світлі нових знань щодо шляхів сигналінгу і формування клітинами відповіді на дію різних стресових чинників, на часі, пропонуються нові механізми дії вже добре відомих стресів таких як осмотичний шок [13], пероксидний стрес [1, 2], етанольний стрес [8], тощо. Значний науковий і технічний прогрес призводить до появи нових потенційних чинників стресу фізичної і хімічної природи. На фоні вивчення «класичних» чинників стресу (пероксидний, кислотний, термічний, осмотичний, тощо) і новітніх чинників стресу (наночастки, нанотрубки, тощо), особливу увагу приділяють

неіонізуючому електромагнітному випромінюванню (ЕМВ) антропогенного походження [14]. Стрімкий технічний розвиток сприяє все більш вагомому впливу на біоту з боку цього чинника. Загальне занепокоєння з боку громадськості і наукової спільноти спонукало ВООЗ в 1996 р. запропонувати спеціальну дослідницьку програму, за результатом якої (в 2006 р.) радіочастотне ЕМВ було віднесене до категорії небезпеки В2, як можливий канцероген, що було підтримано в 2011 р. з боку Міжнародного Агентства з Досліджень Раку (International Agency for Research on Cancer) [15]. Механізм біологічної дії цього чинника залишається невідомим, так само як і характер сумісної дії його з іншими чинниками стресу [16–18]. З метою вивчення цього питання ВООЗ запропонувала проводити відповідні дослідження на відносно простих модельних організмах включаючи мікроорганізми і культури клітин. І в цьому аспекті клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* виявляються одними з найбільш перспективних модельних еукаріотичних організмів [19–21]. Використання цих організмів дозволяє застосувати системний підхід до вирішення поставлених задач і наблизитися до розуміння процесів, які відбуваються між чинниками навколишнього середовища і живими організмами, виявляти новітні структурні і біохімічні зв’язки, вивчати новітні хімічні сполуки, тощо.

Загалом розуміння фундаментальних основ існування живих організмів в динамічному оточуючому середовищі є одним з найбільш важливих напрямків досліджень, яке вирішує фундаментальні і прикладні аспекти в сфері охорони здоров’я людини, збереження біорізноманіття, підтримки родючості ґрунтів, контролю біотехнологічних виробництв, тощо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках планових тематик відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: «Молекулярно-генетичні та біохімічні шляхи реалізації ефектів синергетичної дії факторів фізичної природи на структурні компоненти КС та ЦПМ дріжджів» (2012–2016 роки), що

виконувалась в рамках комплексної програми Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Функціональна геноміка і метабуломіка в системній біології», ДР №0112U002744), «Молочнокислі бактерії, актинобактерії, дріжджі: таксономічні дослідження, біологічні властивості та біосинтетична активність перспективних для промисловості штамів мікроорганізмів» (ДР №0109U002875, 2009-2013 рр.), «Різноманіття, фізіолого-біохімічні і генетичні властивості та біотехнологічний потенціал промислово-важливих штамів бактерій та дріжджів» (ДР №0114U000328, 2014-2018 рр.), «Фізіолого-біохімічні і молекулярно-генетичні властивості та механізми біологічної активності дріжджів, актинобактерій та молочно-кислих бактерій» (ДР №0119U002507, 2019-2013 рр.), а також в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Розробка наукових основ ефективних біотехнологій отримання рідких біопалив з органовмісних відходів із використанням наноматеріалів» (ДР №0115U004278, 2015-2019 рр.); проєкту НАН України (ДР №0118U005400, 2018-2022 рр.) «Сенсорна система на основі люмінесцентних бактерій для екологічного моніторингу радіочастотного електромагнітного випромінювання»; проєкту НАН України і Російського фонду фундаментальних досліджень (РФФД) (ДР №0115U005632, 2015 р.) «Моніторинг біотропних ефектів космічної погоди на клітинному рівні»; проєкту НАН України і РФФД (№ 04.49, 2012-2013 рр.) «Основи направленого формування нових гібридних нанобіокомпозитів на основі бета-полісахаридів з набором заданих фізичних, хімічних і біологічних властивостей – високоперспективних наноструктурованих комплексів пребіотиків і синбіотиків для біомедицини і ветеринарії»; в рамках комплексної програми наукових досліджень НАН України (№129, 2010-2012 рр.) «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології»; проєкту НАН України (№ 87-09/11-09, 2009 р.) «Методологічні підходи вивчення міжмолекулярної взаємодії модельних еукаріотичних мікроорганізмів»; проєкту НАН України (2005-2006 рр.) «Розробка мікробіологічної сенсорної

системи для аналізу впливу фізичних факторів відеодисплейних терміналів на користувачів».

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було визначити фізико-хімічні, структурні та функціональні особливості будови КС, ПКМ і ЦПМ, які відіграють роль у стійкості клітин мікроорганізмів до дії факторів стресу та розробити модель регуляції біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ факторами фізико-хімічної природи.

Відповідно до поставленої мети були сформовані наступні **завдання**:

1. Провести оцінку морфологічних і структурних змін, які відбуваються в КС, ПКМ, ЦПМ і у внутрішньоклітинному просторі про- та еукаріотичних мікроорганізмів у відповідь на дію факторів стресу.

2. Оцінити стресовий характер дії факторів фізичної природи на клітини дріжджів за здатністю індукувати процеси геномної мінливості, мутагенний потенціал і процеси апоптозу/некрозу.

3. Визначити основні структурні компоненти ЦПМ, що беруть участь у формуванні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

4. Дослідити зміни у складі КС та ПКМ в нормі та за дії стресового навантаження.

5. Вивчити роль ферментів поліфосфатного обміну, полі(Ф)аз PPN1 і PPX1, у синтезі компонентів КС, ПКМ і ЦПМ та забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

6. Встановити зв’язок між змінами у будові КС, ПКМ і ЦПМ дріжджів та процесами на клітинному рівні (адгезія, міжклітинна взаємодія, чутливість до антибіотиків).

7. Розробити модель біологічної дії факторів фізичної природи через регуляцію синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ.

Об’єкт дослідження: регуляція синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ на фоні дії чинників стресу фізико-хімічної природи.

Предмет дослідження: склад КС, ПКМ і ЦПМ за дії чинників хімічного і фізичного стресів; вплив стресів на процеси апоптозу/некрозу, геномну

мінливість і експресію генів, процеси адгезії і міжклітинної взаємодії, стійкість до антибіотиків; роль поліфосфатів і поліфосфатаз у формуванні стійкості клітин дріжджів до дії стресів і в процесах синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ.

Методи дослідження. Для виконання поставлених завдань використовували мікробіологічні методи (культивування і дослідження фізіологічних властивостей), фізіолого-біохімічні методи (визначення стехіометричних і кінетичних параметрів росту, визначення активності ферментів), фізико-хімічні методи (газова і рідинна хроматографія, горизонтальний і вертикальний гель-електрофорез, УФ-спектроскопія, мас-спектрометрія), біоінформатичні методи (аналіз транскриптомів, підбір праймерів), молекулярно-генетичні методи (РТ-ПЛР і мультиплексна-ПЛР), статистичні методи (дисперсійний аналіз (factorial-ANOVA), пост-хок аналіз, багатофакторне планування, кластерний аналіз, кореляційний аналіз, аналіз часових ритмів, непараметрична статистика), методи мікроскопії (світлова мікроскопія, люмінесцентна мікроскопія, атомно-силова мікроскопія, сканувальна електронна мікроскопія, трансмісійна електронна мікроскопія), вивчення субмікроскопічної структури (ультрамікротомія), методи вивчення клітин за оптичними характеристиками (проточна цитофлуориметрія) і фізичними властивостями поверхні (зондова атомно-силова мікроскопія), гідрофобність, заряд на поверхні і дзета-потенціал, методи аналізу цифрових зображень та інші.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше теоретично обґрунтовано і експериментально підтверджено здатність неіонізуючого ЕВМ радіочастотного діапазону (РЧ-ЕМВ) змінювати процеси синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ дріжджів і впливати на чутливість мікроорганізмів до дії фізико-хімічних чинників стресу. Показано, що стресовий характер дії РЧ-ЕМВ реалізується через формування активних форм кисню (АФК), зміну внутрішньоклітинного pH і тонічності, зміну активності ферментних систем, синтез компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, тощо. Вперше, показано здатність РЧ-

ЕМВ змінювати рівні експресії генів, що кодують білки-ферменти синтезу жирних кислот (ЖК) і стеролів, білків КС і убіквітинового комплексу. Встановлено, що ефект дії РЧ-ЕМВ залежить від діапазону випромінювання. Випромінювання сантиметрового і міліметрового діапазонів мали цито- і генотоксичний ефект, що може призводити до необоротних змін в геномі клітин дріжджів. Вперше вивчено шляхи дії РЧ-ЕМВ в комплексі з іншими чинниками стресу. Показано, що при дії комплексу стресових факторів, основна реакція клітин формується на дію найбільш сильного з них.

Встановлено, що кількісний вміст *N*-ацетилглюкозаміну, *N*-ацетилгалактозаміну і нейрамінової кислоти в КС і ПКМ дріжджів має вагоме значення для формування підвищеної осмотолерантності і механічної стійкості клітин, та обумовлює виживання за дії таких чинників стресу як пероксидний і кислотний стреси, генотоксичні чинники і антибіотичні сполуки. Вперше показано, що механічні показники клітин дріжджів (жорсткість) визначаються одночасно вмістом і білків і полісахаридів КС і ПКМ. Вперше виявлено, що вміст ергостеролу в клітинах дріжджів не має визначальної ролі для забезпечення життєздатності, натомість вагому роль за умов дії стресів відіграють попередники синтезу ергостеролу (сілан,[[(3-β-22E)-ергоста-7,22-дієн-3-іл]окси]триметил- і 5-Хі-ергост-7-єн-3-β-(триметил-сілокси)-).

Вперше показано, що поліфосфатази PPN1 і PPX1 залучені до процесів біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, адгезії клітин до абіотичних субстратів, до міжклітинної взаємодії і формуванні стійкості до антибіотиків та до формування явища адаптивної відповіді (АВ). Доведено вагому роль цих ферментів для формування повноцінної фенотипової відповіді на дію різноманітних факторів стресу, що реалізується через процеси на рівні геному, а також через процеси біосинтезу стеролів, білків і цукрів.

Уперше запропоновано гіпотетичну модель модуляції синтезу компонентів КС, ПКМ та ЦПМ дріжджових клітин РЧ-ЕМВ.

Практичне значення одержаних результатів. У ході виконання роботи сконструйовано штами *S. cerevisiae* дефектні за поліфосфатазами PPN1 і PPX1,

придатні для вивчення біологічної ролі цих ферментів. Опрацьовано нові хімічні підходи для виділення ДНК/РНК з клітин дріжджів (акт впровадження ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» від 17.03.2021 р.). Сформовано підходи для фотометричного напівкількісного визначення цукрів в складі ПКМ і КС методом мічених лектинів (акт впровадження ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» від 17.03.2021 р.). Розроблено підходи для швидкої кількісної оцінки фізіологічного стану популяцій культур клітин за фотометричними показниками при фарбуванні флуорохромним барвником акридиновим помаранчевим.

Запропоновано модель впливу РЧ-ЕМВ на процеси синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, придатна для розробки методів керованого синтезу компонентів відповідних структур. Рекомендовано використання радіочастотного ЕМВ метрового-міліметрового діапазонів як засіб для надання стійкості мікроорганізмам до цито- і генотоксичних чинників, що використовуються в агро- і біотехнологічній галузях, в галузі охорони довкілля, тощо. Запропоновано використання клітин дріжджів як сенсорних елементів для детектування біологічної дії неіонізуючого ЕМВ (патент на корисну модель №62414 від 25.08.2011).

Матеріали дослідження використано в учбових курсах за спеціальністю «мікробіологія» в Київському національному університеті ім. Т.Г. Шевченка, університеті «Україна», Київському політехнічному інституті ім. І. Сікорського, Київському інституті технології і дизайну.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою здобувача, в якій розкрито напрям дослідження, проведено літературний аналіз, сплановано і виконано експериментальні дослідження, зроблено їх опрацювання із використанням відповідних методів статистичної обробки даних, виконано інтерпретацію і теоретичне узагальнення отриманих результатів, сформульовано основні положення і висновки, підготовлено до друку наукові праці.

Планування основних напрямків роботи, концепції, обговорення результатів і структури дисертаційної роботи здійснено із науковим консультантом, доктором біологічних наук, Громозовою О.М., за що автор висловлює щиру подяку.

Автор самостійно провів вивчення фізіолого-біохімічних і цитоморфологічних особливостей мікроорганізмів в нормі та за дії фізичних і хімічних чинників, визначив стехіометричні і кінетичні параметри росту мікроорганізмів, фенотипові і транскриптомні аналізи, включаючи дизайн праймерів, оцінив мутагенний і генотоксичний потенціал досліджуваних факторів, провів аналізи методом мультиплексної-ПЛР, виконав процедури фракціонування клітин і етапи очищення КС, виділення білків, ЖК, стеролів, поліфосфатів, нуклеїнових кислот і відповідні аналізи методами горизонтального і вертикального гель-електрофорезу, провів процедури оптимізації протоколу виділення нуклеїнових кислот із клітин мікроорганізмів і кількісного визначення ПЛР-продуктів, протоколу використання мічених лектинів для напівкількісного визначення вмісту цукрових компонентів на поверхні клітин мікроорганізмів і в екзополімерному матриксі, протоколу аналізу цитоморфологічних особливостей будови клітин дріжджів і клітин ссавців за оптичними показниками, провів відповідну пробопідготовку і аналізи методами світлової, люмінесцентної і трансмісійної електронної мікроскопії, вивчив особливості клітинної організації мікроорганізмів методом проточної цитофлуориметрії, виконав статистичне планування багатофакторних досліджень і аналіз отриманих даних методами параметричної і непараметричної статистики, виконав процедури математичної обробки і статистичного аналізу цифрових зображень.

Аналіз ЖК і стеролів проведено в лабораторії біологічних полімерних сполук Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного (ІМВ) НАН України спільно з к.б.н. Остапчуком А.М. Визначення заряду клітин (дзета-потенціалу) проводили на базі ІМВ спільно з н.с. відділу генетики мікроорганізмів, к.б.н. Гордієнко А.С. Вивчення рівнів експресії *UBC6* і *FLO11*

методами кількісної ЗТ-ПЛР і ампліфікація з незмістовними короткими нуклеотидними повторами були виконані в співпраці зі с.н.с. відділу фізіології промислових мікроорганізмів ІМВ, к.б.н. Зеленою Л.Б. Культивування епітеліоподібних і фібробластних клітин проводили спільно зі співробітниками ІМВ: с.н.с. відділу проблем інтерферону і імуномодуляторів, к.б.н. Жолобак Н.М. і науковими співробітниками відділу репродукції вірусів, к.б.н. Повницею О.Ю., к.б.н. Білявською Л.О. і к.б.н. Науменко К.С. Вивчення дії нанобіокомпозитів на клітини бактерій проводили спільно з с.н.с., д.б.н. відділу трансферу технологій ІМВ Сафроновою Л.А. Вивчення дії похідних адамантану і арилаліфатичних аміноспиртів на клітини бактерій і дріжджів проводили спільно зі співробітниками лабораторії протимікробних засобів *Інституту фармакології* та *токсикології АМН України* під керівництвом д.м.н. Вринчану Н.О. Дослідження методом атомно-силової мікроскопії проводили на базі Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України спільно з к.ф.-м.н. Литвином П.М. Вивчення дії на клітини дріжджів випромінювання стандарту GSM-1800 проводили на базі ДУ «*Інститут* громадського здоров'я ім. О.М. Марзєєва НАМН України» спільно з проф., д.м.н. Думанським Ю.Д. і с.н.с. Сбіткіним С.В. Штами дріжджів, дефектні за поліфосфатазами, отримували спільно зі співробітниками лабораторії Р. Корона Інституту наук про оточуюче середовище Ягелонського Університету (м. Краків, Польща) к.б.н. Домінікою Влоч-Саломон.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи представлено на конференціях і з'їздах: Третій, Четвертий, П’ятий і Шостий Всеросійський Конгрес з Медичної Мікології (Москва, Росія, 2005-2007, 2014), Міжнародний Симпозіум "Гелио-геофизические факторы и здоровье человека" (Новосибирск, Россия, 2005), Другий Міжнародний симпозіум "Біоетика – шлях до світових стандартів" (Харків, 2005), Шоста міжнародна конференція "Космос и биосфера: Космическая погода и биологические процессы" (Партеніт, Крим, 2005), Четвертий, П’ятий і Шостий Міжнародний Конгрес "Слабые и сверсхлабые поля и излучения в биологии и медицине" (Санкт-

Петербург, Росія, 2006, 2009, 2012), 4th International Workshop "Biological Effects of EMFs" (Crete, Greece, 2006), 28th International Congress on Occupational Health (Milan, Italy, 2006), Сьома, Восьма і Дев'ята Міжнародна кримська конференція "Cosmos and Biosphere" (Sudak, Crimea, Ukraine, 2007, 2009, 2011), Кулаєвські читання по поліфосфатам (Пущино-на-Окє, Росія, 2008), Другий З'їзд мікологів Росії (Москва, Росія, 2008), NATO advanced research workshop "Molecular self-organization in micro-, nano, and macro dimensions: from molecules to water, to nanoparticles, DNA and Proteins" dedicated to A.S. Davydov 95th birthday (Kyiv, Україна, 2008), IV міжнародна наукова конференція «Электромагнитные излучения в биологии. Био-ЭМИ-2008» (Калуга, Росія, 2008), 12th International Congress on Yeasts (Kyiv, Ukraine, 2008), 5th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields (Palermo, Italia, 2008), VI Міжнародний симпозіум «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Київ, Україна, 2009), XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Ужгород, Україна, 2009), Міжнародна конференція, присвячена 165-річчю обсерваторії КНУ і 105-річчю С.К. Всесвятського (Київ, Україна, 2010), 9th International Mycological Congress "The Biology of Fungi" (Edinburgh, UK, 2010), XI Міжнародна конференція з біоетики, біокібернентики і прикладної біофізики (Київ, 2010), XI Міжнародна конференція з біоніки (Київ, Україна, 2010), Міжнародний міждисциплінарний симпозіум «Нанотехнология и ноосферология в контексте системного кризиса цивилизации» (Симферопіль, Ялта, Україна, 2011), Науково-практична конференція з медичної мікології, XIV Кашкінські читання (Санкт-Петербург, Росія, 2011), 19th Annual Southeastern Regional Yeast Meeting (Atlanta, USA, 2012**),** Міждисциплінарна наукова конференція "Адаптационные тратегии живых систем " (Новий Світ, Крим, Україна, 2012), XII конференція молодих вчених "Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів" (Київ, Україна, 2012), IX Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології» (Львів, Україна, 2013), Конференція «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Київ,

Україна, 2013), The International Summer Scholl “Nanotechnology: from fundamental research to innovations” and International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2013) (Львів-Київ, Україна, 2013), 40th COSPAR Scientific Assembly (Москва, Росія, 2014), Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2015 (Budva, Montenegro, 2015), Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2016 (Niš, Serbia, 2016), X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ» (Київ, Україна, 2016), 2nd International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development outlook in the 21st Century” (Київ, Україна, 2016), З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського” (Львів, Україна, 2017), 19th International Conference on Electromagnetics and Applications (Rome, Italy, 2017).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 83 наукових праці, з них 34 статі, у тому числі 26 у фахових виданнях, 23 у виданнях, що включені до міжнародних баз даних, 1 патент України на корисну модель, 1 монографія у співавторстві, 47 тез доповідей.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 422 сторінках друкованого тексту і складається із «Вступу», розділів «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», 4 розділів результатів власних досліджень, а також «Узагальнення результатів дослідження», «Висновки» і «Додатки». Список використаних джерел містить 572 посилання, з яких 483 іноземних авторів. Дисертаційна робота містить 21 таблицю та 90 рисунків.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

СТРЕС ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ КЛІТИНИ

1.1 Механізми клітинної відповіді на стресові фактори навколишнього середовища

Живі організми постійно знаходиться під впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища, якими можуть бути критичні значення температури і кислотності середовища, гіпертонічність та гіпотонічність, нестача поживних речовин і поряд з тим висока концентрація кінцевих продуктів метаболізму, наявність токсичних речовин рослинного, мікробного та антропогенного походження, присутність іонів важких металів і активних форм кисню, дія іонізуючого випромінювання, гіпо- і гіпергравітаційні впливи, тощо. У відповідь на вплив стресових факторів в організмі запускається комплекс неспецифічних компенсаторно-пристосувальних процесів, відомих під терміном “стрес”.

Концепція стресу була вперше сформульована Г. Сельє. За визначенням Сельє, стрес – це сукупність всіх неспецифічних змін організму, що виникають під впливом будь-якого чинника і є результатом неспецифічних захисних механізмів, що відбуваються в організмі, і збільшують опірність останнього до факторів, які спричиняють стрес. Власне концепція «стресу» від початку стосувалася лише певних аспектів існування і життєдіяльності людини, та згодом це поняття набуло більш широкого застосування і відповідно зросло коло об’єктів на яких досліджують дане явище [22, 23].

Використання сучасних методів молекулярної біології і генетики дозволяє отримати широку інформацію щодо механізмів адаптації мікроорганізмів до стресу, які реалізуються через низку репараційних і регуляторних систем, таких як, наприклад, системи репарації ДНК [24], регуляцію експресії генів і синтезу білків [25, 26], в тому числі білків теплового шоку [27, 28], зміну активності ферментів антиоксидантного захисту [29], тощо.

На відміну від ряду вищих організмів, мікроорганізми обмежені у виборі свого мікрооточення, однак мають специфічні захисні реакції для пристосування до змін у навколишньому середовищі. Це забезпечує не лише виживання самих мікроорганізмів, але й певну конкурентоспроможність по відношенню до інших організмів, а також підвищує шанси на збереження цілісності біоценозів в цілому. Мікроорганізми характеризуються високою адаптаційною здатністю і можуть виживати в широкому діапазоні стресових умов. Це робить мікроорганізми важливим і зручним об'єктом для досліджень біологічної дії різноманітних стресових факторів [30–33].

Серед модельних мікроорганізмів найкраще вивчені бактерії *Escherichia coli,* дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і *Candida albicans*, а також гриби *Neurospora crassa* [32, 33]. Однією з найбільших переваг, яку надає використання клітин дріжджів *S. cerevisiae* – це можливість вивчати загальнобіологічні процеси притаманні еукаріотичним організмам в цілому, адже більшість фізіолого-біохімічних і молекулярно-генетичних процесів, які протікають в клітинах цього мікроорганізму, притаманні також й клітинам більш розвинених істот включаючи ссавців [19–21]. Сучасні методичні підходи дозволяють створювати і моделювати за допомогою дріжджів умови, непритаманні їм в природі, для досягнення прогресу у сфері медицини, наприклад, з метою вивчення особливостей розвитку пухлинних процесів і вивчення дії протипухлинних препаратів [21], або з метою розуміння певних аспектів еволюційної генетики чи для створення нових біотехнологічних процесів, тощо [34, 35].

Обов'язковою ознакою стресового стану є його оберненість, можливість повернення до нормального функціонування при відповідних змінах факторів навколишнього середовища [36, 37]. Якщо клітина не здатна подолати наслідки дії стресу, запускаються процеси апоптозу і некрозу. В інших випадках, внутрішньоклітинні системи налаштовуються для нівелювання внутрішньоклітинних ушкоджень викликаних дією факторів стресу, що загалом призводить до адаптації живого організму до умов навколишнього середовища.

Г. Сельє розділив весь адаптаційний процес на три стадії: реакція тривоги, стадія адаптації і стадія виснаження [22, 23]. На початковій стадії у всіх вивчених стресових умовах виявлені подібні істотні зміни ультраструктурної організації клітин: збільшення розміру мітохондрій, зростання кількості та розмірів пероксисом, накопичення полі(Ф) гранул, а також специфічні зміни в будові ЦПМ: поява інвагінацій (етанольний стрес) або глобулярних структур (оксидативний і тепловий стреси). Спостерігається активація гідролаз, зниження синтетичних процесів (але одночасно активується синтез РНК), відбувається зміна вторинної, третинної і четвертинної структури білків, підвищується проникність ЦПМ і вихід з клітин різних речовин, деполяризація мембран, зрушення pH цитоплазми в бік більш низьких значень, порушення окислювального фосфорилювання, утворюються вільні радикали, відбувається синтез стресових білків на фоні зменшення загальної кількості білку, тощо. Слід зазначити, що інтенсивність прояву таких реакції залежить від дози і типу стресового фактору, а також від виду організму [38–41].

Адаптаційні реакції можуть бути умовно поділені на два типи. Перший тип – це фізіологічна адаптація, коли відбувається реалізація вже існуючих властивостей організму без змін спадкового матеріалу. Другий тип пов'язаний із стійкими перетворення генетичної інформації. В основі першого типу реакцій лежить модифікаційна мінливість, пов’язана з регуляцією клітинного метаболізму при змінах зовнішнього середовища під контролем геному. Така адаптація до несприятливих факторів навколишнього середовища відбувається за рахунок зміни експресії окремих генів. В другому випадку адаптація відбувається за рахунок випадкових мутацій [30, 42].

Адаптивні властивості клітини «прописані» в геномі і експресія окремих генів дозволяє варіювати властивості клітини для кращого пристосування до умов стресу. Більшість генів мають понад одну функцію і «гени-стресу» кодують структурні білки чи ферменти, які виконують певні внутрішньоклітинні функції навіть за оптимальних умов існування. Тим не менше стрес-індукована зміна експресії може і була виміряна на

транскрипційному рівні. Було виявлено, що раптова зміна умов навколишнього середовища вимагає швидкого (для клітин дріжджів сахароміцетів це від 1 хв. до 30 хв.) налаштування системи експресії генів [43]. В клітин *S. cerevisiae* геномна відповідь на дію стресових факторів реалізується завдяки набору із близько 900 генів, які забезпечують загальну реакцію у відповідь на більшість чинників стресу [44]. Комплекс таких реакцій відомий як «відповідь на стрес з оточуючого середовища» (ESR, від англ. «*Environmental Stress Response*»). В ESR виділяють два великі кластери генів, перший з яких містить гени, що контролюють ріст клітин, синтез РНК і нуклеотидів, процеси секреції та цілу низку інших різноманітних метаболічних процесів. Другий кластер генів містить головним чином ті гени, які відповідають за синтез рибосомальних білків [45–47].

Разом з тим, існують також і стрес-специфічні транскрипційні фактори, активність яких залежить від типу стресового чинника [43, 46]. Такі специфічні чинники активуються одночасно з ESR-генами і направлені не на формування загальної відповіді клітин на стрес, а на ліквідацію специфічних ушкоджень викликаних дією того чи іншого чинника стресу. Кожна клітина має кілька сигнальних шляхів, специфічних для чинників різної природи. Проте механізм сигналінгу (передачі сигналів від поверхні клітин до факторів транскрипції генів) вивчено не досконало і достеменно не відомо, яким саме чином клітини передають сигнал на такі значні (в рамках співвідношення розмірів молекула : клітина) відстані. Для пояснення висуваються різноманітні гіпотези і припущення від вільнорадикальних шляхів передачі сигналу [1, 48], які можуть нести небезпеку для клітин зважаючи на агресивність таких молекул, до сигналів електромагнітної природи [49], які хоча й вважають безпечними, проте наразі не встановлено, яким чином такі сигнали розпізнаються внутрішньоклітинними структурами.

1.1.1. Шляхи формування загальної відповіді на дію факторів стресу

За дії стресів в клітинах відбувається переналаштування вже запущених біохімічних процесів і синтез специфічних факторів стійкості. Такі сигнальні шляхи, як Ras (назва походить від англ. "*rat sarcoma*", адже гени *RAS1* і *RAS2* є гомологами відповідних *RAS*-протоонкогенів, виявлених в ссавців [50]), шлях циклічного АМФ (cAMP) і шлях протеінкінази А (PKA), окрім участі у формуванні загальної відповіді на стреси, є активними учасниками процесів регуляції росту клітин. Вони на стільки тісно пов'язані між собою функціональними зв'язками, що досить часто їх поєднують у єдиний RAS/cAMP/PKA-шлях [51–53].

В свою чергу, PKA-шлях тісно пов'язаний з TORC1-шляхом (віл англ. «*Target Of Rapamycin Complex 1*») і протеїнкіназою Sch9, і разом вони забезпечують pH-гомеостаз клітини [54]. В свою чергу TORC1-шлях активується у відповідь на всі види стресових чинників, адже є основним регулятором росту та обміну речовин в усіх еукаріотичних клітинах [55].

Також встановлено зв'язок між PKA-шляхом і фосфатним метаболізмом [54], який може відбуватися за рахунок фосфорилювання Pho84 (трансмембранний білок, що виконує транспорт фосфату), яке супроводжується убіквітинуванням і деградацією білку у вакуолях [56].

При формуванні загальної відповіді на стрес, особливе місце займають протеінкінази, які активуються мітогенами (MAPK, від англ. «*Mitogen-Activated Protein Kinase*»). Ця родина білків є однією з найбільш вивчених [57], адже дані кінази є активними учасниками онкологічних процесів в ссавців [57–59]. Відомо п'ять MAPK модулів в клітин дріжджів, серед яких і HOG-шлях (від англ. «*High Osmolarity Glycerol*»), який на початку відкриття вважали специфічним до гіперосмотичного стресу [60], [61] і лише згодом було визначено, що він долучений до формування відповіді на оксидативний стрес, слабкий кислотний стрес, тепловий стрес, та інші [62, 63]. HOG-шлях пов'язаний з іншими MAPK-шляхами і разом вони контролюють процеси морфогенезу [64].

Встановлена ціла низка регуляторних факторів, роль яких виявлена при різних видах стресів. Найбільш добре відомими транскрипційними факторами на дію кислотного, оксидативного і термічного стресів є Msn2p і Msn4p, які регулюють активність багатьох ESR-генів [45]. Проте, Msn1p, Hot1p і Pdr3p також розглядають як можливі регуляторні фактори на дію цих видів стресу. Окрім них, Yap1p, Skn7p, Hsf1p і Pdr3p, також можуть бути регуляторними факторами за дії оксидативного стресу, а Stp1 і Ino2/4p – за дії кислотного стресу. При цьому War1p називають ключовим фактором для формування відповіді на дію органічних кислот і зміну зовнішнього pH в цілому, в той час як не менш важливу роль у формуванні максимальної толерантності до оцтової кислоти відіграють Rim101p (репресор транскрипції) і Haa1p (активатор транскрипції). Haap1p взагалі називають базовим регулятором формування транскрипційної відповіді на дію з боку слабкого кислотного стресу [65].

Все це вказує на існування тісних зв’язків між різними метаболічними і транскриптомними шляхами, які долучені до формування клітиною відповіді на дію стресів. Це дозволяє зрозуміти, чому вплив одних стресів може сприяти збільшенню стійкості клітин до дії інших стресів (явище «адаптивної відповіді»). Проте, окрім регуляторних факторів формування загальної відповіді на стрес, клітини мають також і специфічні фактори і шляхи формування відповіді на окремі види стресів.

1.1.2. Шляхи адаптації до несприятливої температури

Температура – один з найбільш важливих факторів, який впливає на життєві процеси в клітинах живих організмів. Різкі коливання температури навколишнього середовища в бік зниження або підвищення можуть бути звичайним явищем в житті мікроорганізмів і супроводжуються відповідними змінами у швидкості росту, диханні, синтезі метаболітів, і т.п. Сукупність метаболічних, фізіологічних та адаптаційних змін при дії неоптимальної температури відома під терміном “тепловий шок”. Неоптимальними, при цьому, вважаються температури, які призводять до структурних і

функціональних порушень в клітинах і вимагають, зазвичай, тимчасової зупинки росту і змін в налаштуваннях біосинтетичних процесів для відновлення функціональної активності.

Одним з найбільш вивчених механізмів захисту клітин від дії теплового шоку є синтез так званих «білків теплового шоку». У дріжджів *S. cerevisiae* є дві системи таких білків Msn2/4p та Hsf1p, які виконують регуляторну та фізіологічну роль при тепловому шоці. Клітини дріжджів формують відповідь на тепловий шок не лише через зміну транскрипційного профілю окремих генів, але й через зміну стабільності мРНК, яка в свою чергу пливає на експресію більшості генів.

Важливу роль у формуванні стійкості до підвищеної температури відводять накопиченню захисних та адаптогенних сполук, таких як пролін, розчинні вуглеводи, поліаміни, тощо. Пролін і розчинні вуглеводи можуть взаємодіяти з білками чим підвищують їх стабільність, розчинність і захищають від денатурації [66-69]. Поліаміни, в свою чергу, підтримують структуру нуклеїнових кислот, стабілізують мембрани, гальмують РНКазну і протеазну активність, а також захоплюють вільні радикали [70].

Ферментні системи в цілому є високочутливими до варіацій температури і активність більшості з них зростає із підвищенням температури, як, наприклад, активність кислих фосфатаз збільшується на 70-80% в клітинах *Aspergillus nidulans* при підвищенні температури до 37°C-43°C [71]. Такий самий ефект був відмічений при зневодненні клітин при температурі 37°C, яке супроводжувалося підвищенням активності фосфатази в результаті синтезу білку *de novo*.

Клітини, в яких спостерігався тепловий шок, набували більшої стійкості також й до пероксиду гідрогену, супероксиданіону і гідропероксиду [72, 73], а також до гіперосмотичного шоку [60]. Можливою причиною такого ефекту може бути збільшення експресії ESR-генів, таких як *CTT1*, який є спільним в адаптивній відповіді на різноманітні стресові фактори [72, 73].

1.1.3. Механізми оксидативного стресу

Механізми оксидативного стресу привертають увагу дослідників через його важливу роль в етіології як «нормального» старіння, так і серйозних патологій, що представляють собою актуальну проблему для охорони здоров'я [74, 75]. Незважаючи на це, механізми адаптації до оксидативного стресу мікроорганізмів і особливо з аеробним типом обміну вивчені недостатньо.

Відомо, що кисень має високу реакційну здатність і активні форми кисню (АФК) утворюючись у клітині в нормі, та за дії низки факторів, таких як УФ- чи іонізуюче випромінювання або ж за дії іонів металів, тощо, можуть викликати пошкодження ДНК, ліпідів і білків [76–78]. Стійкість до оксидативного стресу залежить від фази розвитку клітини, що пов’язують із властивостями метаболізму, будовою КС, ЦПМ і організацією внутрішньоклітинних структур, які можуть суттєво відрізнятися на різних етапах клітинного циклу. Клітини дріжджів найбільш стійкі до оксидативного стресу, та й в цілому до багатьох видів стресу, у стаціонарній фазі росту [79], в якій має місце уповільнення проліферативної активності у зв’язку з лімітом поживних речовин, накопиченням вторинних метаболітів, обмеженням за простором, тощо.

На сьогодні запропоновано кілька шляхів генерації і деградації активних форм кисню (АФК) в клітинах живих організмів. Завдяки використанню хімічних чинників здатних запускати в клітинах захисні реакції проти окиснення (таких як гідропероксид кумолу, діамід, пероксид гідрогену, лінолева кислота, супероксид аніон, менадіон, юглон, тощо) було встановлено, що реалізація такої адаптивної відповіді відбувається завдяки участі низки регуляторних білків Yap1p і Yap2p, Msn2p і Msn4p, Gcn4p і Skn7p [80, 81]. Ці білки впливають на активність ферментів із антиоксидантними властивостями. Так, наприклад, Yap1p регулює активність супероксиддисмутази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і глутатіонредуктази. Ці та інші антиоксидантні ферменти (каталази, глутатіонпероксидази) здатні видаляти кисневі радикали та продукти їх дії і зменшувати кількість окиснених продуктів [80].

При вивченні молекулярно-генетичних механізмів захисту клітини від дії окисників було встановлено, що видалення генів тіоредоксину *TRX1* і *TRX2* підвищує чутливість до пероксиду гідрогену. Подібну функцію виконують і дві глутатіон-залежні дисульфідні оксидоредуктази *GRX1* і *GRX2*. Ферменти тіоредоксинредуктаза і глутатіонредуктаза, які відповідають за синтез захисних білків, потребують в якості відновника $НАДФН_2$, що може бути поясненням збільшення активності одночасно й ферментів пентозо-фосфатного шляху (транскетолази і рибулозо-5-фосфатепімерази) який забезпечує накопичення внутрішньоклітинного $НАДФН_2$ в умовах оксидативного стресу [80, 82, 83].

До механізмів захисту належить також синтез антиоксидантних метаболітів, наприклад похідних поліамінів сперміну та спермідину, а також аскорбінової кислоти (добре відомого антиоксиданту в тварин і рослин), аналог якої синтезується й клітинами дріжджів *S. cerevisiae* [84], хоча за певних умов клітини дріжджів можуть синтезувати й повноцінну аскорбінову кислоту [85].

1.1.4. Адаптаційні пристосування до умов осмотичного шоку

Клітини живих організмів постійно пристосовуються до гіпер- та гіпотонічних умов існування, що пов’язано із зміною доступності води, варіюванням концентрації зовнішніх і внутрішньоклітинних сполук, тощо. Шляхи внутрішньоклітинного сигналінгу і формування відповіді на гіпер- і гіпоосмотичний шок різні і в клітин дріжджів – це HOG-шлях (від англ. «*High-Osmolarity Glycerol*») і PKC-шлях (від англ. «*Protein Kinase C*»), відповідно. Це пов’язано із характером фізико-хімічних змін, які відбуваються в клітинах за дії гіпер- і гіпотонічних умов і, як приклад, в гіпотонічних умовах відбувається фосфорилювання MAP-кінази PKC1-шляху, що тісно пов’язано із обміном поліфосфатів [86], в той час як подібний процес не відбувається за гіпертонічних умов. PKC1-шлях також відомий як «шлях підтримки цілісності клітини» (CIP, від англ. «*Cell Integrity Pathway*»), оскільки він критично важливий за умов, які загрожують стабільності КС [87]. Очевидно, що такі умови створюються не лише за гіпотонічності [86] але й при тепловому шоці

[88] й інших видах стресів, що призводитиме до активації РКС1-шляху. Проте, зміна осмолярності викликає активацію РКС1-шляху вже за кілька секунд, тоді як за гіпертермічного стресу активація відбувається лише через 10-30 хв, що вказує на опосередкований вплив температури на активність цього шляху [87] і може відбуватися через зміну пружних властивостей і підвищення текучості ЦПМ [88]. Доказів щодо ролі в цьому процесі текучості мембрани на часі немає, однак є свідчення того, що за дії температурного шоку в клітинах відбувається накопичення трегалози, яка є осмолітом, і тим самим викликає внутрішньоклітинний осмотичний стрес, який може призводити до розтягування ЦПМ і відповідної активації РКС1-шляху [87].

За дії гіперосмотичного шоку в клітинах відбувається активний синтез гліцерину, шляхом посилення експресії *GPD1*, який кодує відповідний фермент гліцерин-3-фосфатдегідрогеназу [89–94]. При цьому регулювання кількості гліцерину при рості дріжджів в гіперосмотичному середовищі відбувається за рахунок каскаду кіназних реакцій, які в свою чергу активуються продуктом двох інших генів *SLN1* і *SHO1* [89, 95]. Тобто система, яка регулює синтез гліцерину за умов дії гіперосмотичного стресу є складною і багатокомпонентною.

За умов гіперосмотичного шоку відбувається також посилення експресії генів *GRE*-родини (*GRE1-3*). При цьому рівень експресії визначається концентрацією осмолітів: низька концентрація викликає більш швидке накопичення продуктів, в той час як висока концентрація зумовлює повільну індукцію. Ці ж гени позитивно регулюють HOG-шлях і їх експресія посилюється за дії й інших видів стресу (теплового та оксидативного), а також після завершення стаціонарної фази росту. *GRE1* і *GRE3* індукують транскрипцію факторів Msn2p і Msn4p, з якими пов’язана адаптація дріжджів до температури. Аналіз амінокислотного складу Gre1p показав його функціональний зв'язок з LEA-білками рослин, а Gre2p виявився аналогом дигідрофлавонол-4-редуктази, в той час як Gre3p – аналог редуктази ксилози у рослин; усі ці білки є важливими для захисту рослинної клітини в умовах

оксидативного стресу. Все це в черговий раз вказує на тісний зв'язок між різними метаболічними ланками і сигнальними шляхами при формуванні відповіді на різні типи стресів.

Варто звернути увагу також на те, що гіпер- та гіпоосмотичний шок супроводжується тимчасовим підвищенням іонів кальцію у цитозолі за рахунок активації стретч-каналів у внутрішньоклітинних депо [96, 97]. В свою чергу активація кальцієвих каналів, стимулювання HOG-шляху і CWI-шляху (від англ. «*Cell Wall Integrity*») має місце й за дії іншого типу стресу – **кислотного стресу** [98]. Тобто механізми стійкості до кислотного стресу тісно перетинаються із стійкістю до осмотичного шоку.

1.1.5. Адаптаційні пристосування до кислотного стресу

Метаболічна активність мікроорганізмів викликає зміни кислотності оточуючого середовища, а тому вони мають певні адаптаційні пристосування для існування у відносно широкому діапазоні значень pH від 2,5 до 6,0 і вище. Еукаріотичні мікроорганізми мають органели спеціалізовані для протидії кислотному стресу і більше того деякі з органічних кислот (такі як оцтова і молочна) можуть бути використані як поживні субстрати і стресовий характер визначає їх концентрація у середовищі [99]. Внутрішньоклітинне pH цитоплазми і органел контролюється за допомогою H^+-АТФаз, таких як Pma1p (цитоплазматична P2-type АТФаза) і V-ATPase (вакуолярна АТФаза) [100, 101]. Такий контроль є критичним для збалансованої роботи багатьох внутрішньоклітинних і трансмембранних білків, серед яких транспортні білки-переносники фосфатів, глюкози, і такі ферменти як фосфофруктокіназа, які є надчутливими до варіацій pH [102, 103]. Загалом, за дії слабких кислот, внутрішньоклітинне pH і, одночасно з цим, рівень АТФ знижуються, що вказує на зниження активності АТФ-залежного симпорту протонів, який є основною формою транспорту поживних сполук за відсутності глюкози [103, 104]. Це спричиняє уповільнення загального рівня метаболізму і синтезу білків, однак стимулює утворення насичених ліпідів і ергостеролу, вочевидь, для зменшення

текучості ЦПМ [105]. Слабкі кислоти, такі як карбонилціанід-*p*-трифторметоксифенілгідразон (FCCP) і 2,4-динітрофенол (DNP), діють як протонофори (переносять протони через біологічні мембрани), в той час як інші кислоти, такі як фтористоводнева кислота, мають високу афінність до металів з чим, власне, й пов'язують їх токсичну дію [105].

Транскриптомний аналіз профілів експресії генів в клітинах дріжджів за дії слабких кислот демонструють активацію генів, які відповідають за функції вакуолей і везикулярний транспорт, однак, у випадку фтористоводневої кислоти до них додаються гени асоційовані із функціями апарату Гольджі [105], а в присутності молочної кислоти (4%) відбувається порушення гомеостазу амінокислот і фрагментація вакуолей [106]. За дії молочної кислоти збільшувалися рівні експресії *PDR12* (мембран-асоційованої АТФ-сполучної касети (ABC) транспорту), в той час, як дія соляної кислоти пригнічувала рівень експресії цього гену [99]. Тобто різні кислоти проявляють дещо відмінну дію, залежно від реактивності хімічних груп, які входять до їх складу. За дії ж наднизьких значень pH (для клітин грибів і дріжджів – це до 2,5) може відбувається порушення електрохімічного потенціалу і функцій плазматичної мембрани, в результаті чого ЦПМ втрачає контроль над потоком молекул, що викликає летальний ефект [105].

Слід зазначити, що кислотний стрес провокує утворення активних форм кисню (АФК), які викликають активацію процесів протидії оксидативному стресу. Винятком, на часі, можна вважати лише стрес з боку лимонної кислоти, для якого не було виявлено такого вторинного ефекту, втім за іншими показниками цей вид стресу відповідав загальним характеристикам кислотного стресу: стимулював експресію генів загальної відповіді на стрес і генів біосинтезу гліцеролу, пригнічував активність процесів метаболізму глюкози і біосинтезу амінокислот, активність кальцієвих каналів і вакуолярної H^+-АТФази [107].

Вакуолярна H^+-АТФаза працює на підтримку внутрішньоклітинного pH, однак останнім часом з'являються дані, які вказують на її можливу долученість

до процесів знешкодження й АФК [105]. Дефектність вакуолярної H^+-АТФази клітин дріжджів за двома субодиницями (загалом вона складається з 12 субодиниць) відображається на будові КС і це не лише впливає на стійкість клітин до стресу КС, але й зменшує вірулентність клітин *Candida albicans* [108]. Слід зауважити, що всі описані системи і регуляторні шляхи прямо, або ж опосередковано долучені до синтезу компонентів КС [98, 109, 110], яка є першочерговим бар'єром на шляху стресового чинника.

На противагу кислотному стресу, ***залуження*** середовища є нетиповим для більшості грибів і тим більше для клітин дріжджів, і тому навіть найменші зміни pH в бік лужних значень, викликають значні зміни в експресії цілої низки генів. Як результат, відбувається активація таких регуляторних шляхів, як Rim101/PacC і кальцинеурину (Ca^{2+}-активуємої фосфатази), CWI-шляху і кіназ Snf1p і PKA, а також шляхів формування відповідні на оксидативний стрес [111]. Пов'язують це із порушенням процесів споживання поживних субстратів, і, відповідним, порушенням механізмів підтримки фосфатного, залізо/мідь і глюкозного гомеостазу.

В цілому ж очевидно, що кислотний і лужний стреси супроводжуються формуванням внутрішньоклітинної відповіді і на оксидативний стрес в тому числі. Чи пов'язано це з безпосереднім потраплянням АФК ззовні в середину клітин, чи є наслідком порушеннями цілісності внутрішньоклітинних систем, або ж результатом інактивації чи блокування окремих ферментів – на часі не відомо. Різноманіття ж процесів пов'язаних між собою причинно-наслідковими зв'язками підтверджує поліфункціональність більшості клітинних систем і, відповідно, універсальність окремих, а можливо й більшості, механізмів захисту притаманних живим організмам [47, 112, 113].

1.1.6. Електромагнітне випромінювання як фактор стресу

Одним з найбільш дискусійних факторів фізичної природи, яким приписують стресовий характер є неіонізуюче електромагнітне випромінювання (ЕМВ). Здатність іонізуючих ЕМВ (УФ, гамма-

випромінювання, тощо) викликати негативні реакції на субклітинному рівні давно відомий факт. Однак, останнім часом з'являється все більше інформації про здатність неіонізуючих ЕМВ (мікрохвильового і радіочастотного діапазонів) також впливати на біологічні системи. На тлі зростаючого навантаження з боку техногенного ЕМВ (стільниковий зв'язок, Wi-Fi-мережі, системи бездротового високошвидкісного інтернету (4G-5G), тощо) постає питання про здатність цих факторів впливати на життєдіяльність організмів на фізіолого-біохімічному і молекулярному рівнях.

Незважаючи на досить низьку енергію кванту, яку мають електромагнітні хвилі радіочастотного (РЧ) діапазону, фізичні параметри антропогенного ЕМВ значно перевищують природне електромагнітне поле і, відповідно, виходять за межі оптимуму життєдіяльності живих організмів. Встановлено, що навіть низькочастотне ЕМВ (300 Гц і менше) впливає на процеси реплікації ДНК, синтез РНК і білків, процеси проліферації, потік і зв'язування катіонів, передачу сигналів через мембрану [114, 115]. Неіонізуюче ЕМВ має мутагенний потенціал [116-118] і генотоксичну дію [119–125]. В цілому на клітинному рівні ЕМВ здатні запускати процеси, які призводять до утворення АФК і вільних радикалів, змінюють активність біохімічних реакцій, впливають на експресію генів, роботу трансмембранних каналів і перенос електронів, тощо [76, 83, 122, 124, 126–130]. РЧ-ЕМВ впливає на рівень життєздатності живих організмів і пригнічувати ріст окремих клінічно важливих мікроорганізмів, таких як сальмонели, стафілококи, псевдомонади, тощо, однак при цьому може відбуватися стимулювання росту інших мікробів [131]. За умови ж хронічного опромінення ґрунтів відбувається їх часткова стерилізація [132]. В опромінених клітинах змінюються морфологічні ознаки та біохімічні властивості, які можуть навіть передаватися спадково.

Кореляція між рівнем РЧ-ЕМВ і окремими показниками життєвої активності була виявлена для живих організмів різного систематичного положення, включаючи людину [14, 133, 134]. Перші переконливі дані щодо небезпеки з боку РЧ-ЕМВ були отримані ще наприкінці 70-х років минулого

століття, коли було показано, що РЧ-ЕМВ може бути фактором, який викликає лейкемію у дітей [135]. Після цього були отримані докази про можливу участь ЕМВ у виникненні й інших форм раку (рак грудей, лімфому, гліобластому, меланому, рак мозку, рак простати, рак шлунково-кишкового тракту, рак печінки, тощо), психоемоційних розладів і проблем розумової діяльності (латеральний аміотрофний склероз (*lateral amiotrophic sclerosis*), хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона), проблем з репродуктивними функціями, тощо [127, 135, 136]. В результаті загальної занепокоєності суспільства і стрімкого росту числа людей з підвищеною чутливістю до РЧ-ЕМВ, цим питанням офіційно зайнялася Всесвітня Організація Охорони Здоров'я (ВООЗ). В 1995 р. ВООЗ було введено поняття про «глобальне електромагнітне забруднення навколишнього середовища» і проблема була включена до переліку пріоритетних для людства. З 1996 р. триває Міжнародний електромагнітний проект (WHO International EMF Project, https://www.who.int/peh-emf/project/en/) [137, 138] і з 1998 р. ВООЗ залучила в сферу своїх інтересів проблему впливу ЕМП на навколишнє середовище і елементи екосистем [139] і сформувала Міжнародну Комісію з захисту від неіонізуючого випромінювання (ICNIRP), діяльність якої спрямована, насамперед, на забезпечення електромагнітної безпеки людини. Як результат, в 2006 р. ВООЗ і в 2011 р. Міжнародне Агентство з Досліджень Раку (International Agency for Research on Cancer), яке також підпорядковується ВООЗ, віднесли радіочастотне ЕМП до категорії небезпеки В2, як можливий канцероген [15].

На сьогодні не існує єдиної теорії, яка могла б пояснити хоча б більшість відмічених біологічних ефектів, які виникають за дії РЧ-ЕМВ і особливо випромінювання з наднизькою частотою і надслабкою інтенсивністю [17, 18, 117, 133, 140–149]. Зважаючи на наднизький рівень енергії багатьох хвиль, гостро стоїть питання щодо можливості нетермальної дії РЧ-ЕМВ [16–18]. Дуже багато ефектів викликаних дією РЧ-ЕМВ не можуть бути пояснені з позицій термічної або мікротермічної дії і тому їх відносять до нетермальних, інформаційних, тощо [128, 129, 150–155].

Фізичні властивості випромінювання (частота, потужність, поляризованість, тощо) і фізіологічний стан організму, який опромінюється, одночасно відіграють вирішальну роль у ефективності дії ЕМВ і характері ефектів [133, 140, 148, 155-158]. Немає прямої залежності між фізичними властивостями ЕМВ і силою біологічної реакції, а тому у спектрі ЕМ-хвиль виділяють так звані «частотні вікна», «вікна інтенсивності», тощо [159], що вказує на існування біологічно активних частот і фізичних параметрів для кожної окремої частоти ЕМВ, поза якими біологічна дія може не проявлятися або ж мати навіть протилежний характер [158].

В окремих роботах продемонстровано важливість не стільки частотних характеристик випромінювання, скільки форми хвилі [77, 160]. Порівняння біологічних ефектів РЧ-ЕМВ і наднизькочастотного ЕМВ на генетичному рівні показало, що ефекти цих типів випромінювання багато в чому схожі, незважаючи на величезну різницю в енергії, яку несуть ці хвилі [116]. Щоб пояснити відмічений ефект, дослідники припускають, що ДНК має властивості фрактальної антени, з якою електромагнітні хвилі взаємодіють за деяким загальним механізмом не залежно від частоти випромінювання.

Зважаючи на необхідність встановлення механізму впливу РЧ-ЕМВ на живі організми ВООЗ закликала світову спільноту проводити дослідження на відносно простих, добре вивчених модельних організмах, в тому числі мікроорганізмах. Дослідження проведені із залученням різних мікроорганізмів показали здатність РЧ-ЕМВ впливати на показники життєздатності [161–166], величну ферментативних реакцій [158, 167–170], стан ЦПМ [171, 172], процеси біоплівкоутворення [173–176], тощо. Ефекти дії випромінювання залежать від штамових особливостей, фізіологічного стану мікроорганізмів і складу живильного середовища [177–179]. Як результат з’явилося припущення, що мікроорганізми можуть навіть використовувати низькочастотні ЕМВ як джерело енергії [180], а також, як спосіб міжклітинної комунікації [173].

Неіонізуючі ЕМВ можуть збільшувати стійкість клітин мікроорганізмів до дії стресових факторів фізико-хімічної природи і збільшувати їх

життєздатність в присутності несприятливих значень pH і температури, за присутності антибіотиків, тощо [15, 114, 201]. Враховуючи глобальний вплив неіонізуючого ЕМВ на довкілля, актуальним є вивчення його поодинокої і сукупної дії з іншими стресовими факторами [131]. Встановлено, що неіонізуюче ЕМВ може взаємодіяти з іншими факторами, такими як іонізуюче і рентгенівське випромінювання, різними хімічними агентами (цісплатін, блеоміцин, метілметансульфонат, менадіон, а також пероксид гідрогену), що призводить до ефектів синергетичної дії кількох чинників на клітину. Неіонізуючі ЕМВ здатні модулювати дію інших факторів і більше того, біологічна дія слабкого ЕМВ часто є більш очевидною в присутності іншого стресового чинника [134]. Наприклад, МП частотою 50 Гц спільно з УФ-опроміненням більш ефективно впливає на ріст і життєздатність клітин дріжджів ніж кожен з цих факторів окремо [182]. Проте на думку окремих дослідників МП частотою 50 Гц може бути «со-індуктором» пошкоджень ДНК, а не самостійним генотоксичним агентом [183]. Ефекти на рівні геному можуть визначатися впливом вільних радикалів, утворення яких постулюється у багатьох роботах, як основний результат дії неіонізуючих ЕМВ на клітинному рівні [184–187]. Це особливо важливо в світлі нових даних про можливий внесок ЕМВ в етіологію нейродегенеративних розладів (*neurodegenerative disorders*) [188].

На прикладі клітин дріжджів *S. cerevisiae*, показано зміну активності окисно-відновних ферментів дегідрогеназ пентозофосфатного циклу (глюкозо-6-фосфатдегідрогенази) і циклу трикарбонових кислот (*α*-кетоглутаратдегидрогенази, сукцинатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази) при дії радіочастотного ЕМВ (40,68 МГц) [181]. Магнітне поле частотою 50 Гц [177, 182, 189], а також радіочастотне випромінювання частотою 40,68 МГц [179], 905 МГц [178], 200-350 ГГц [190] здатні впливати на процеси росту і ділення клітин дріжджів. В той же час випромінювання частотою 41,682 ГГц – 41,710 ГГц (0,5 мкВт/см^2 і 50 мкВт/см^2) не виявляло впливу на поділ клітин дріжджів [191]. Більш спрямовані дослідження впливу МП на ключові

регуляторні елементи, подібні тим, що задіяні в процесах канцерогенезу у тварин [192, 193] показали, що МП частотою 50 Гц (30 мТл, 48 годин) знижує ефективність ексцизійної репарації в клітинах *S. cerevisiae* за рахунок пригнічення процесів, які зупиняють клітинний цикл в G1-фазі (G_1-arrest), що в свою чергу посилює генну конверсію, індуковану УФ-випромінюванням.

Всього кілька транскриптомних досліджень було проведено на моделі *S. cerevisiae* [194], в яких оцінювали ефекти РЧ-ЕМВ частотою 50 Гц (0,4 мТл) і 1800 МГц (SAR 4,7 Вт/кг). РЧ-ЕМВ частотою 50 Гц не впливало на рівні експресії генів, в той чася як інший тип ЕМВ (1800 МГц) викликав зміни експресії генів *SMC3* (відповідає за структурну цілість хромосом), *AQY2* (m) (білок аквапорин) і *HAL9* (відповідає за галотолерантність), а також *YAK1* (кіназа-1) і одного функціонально не ідентифікованого гену (відкрита рамка зчитування YJL171C). Таким чином, автори приходять до висновку, що здатність ЕМВ впливати на рівень експресії генів, перш за все, залежить від частоти випромінювання. Однак, очевидно, що інші характеристики випромінювання, такі як потужність, щільність потоку енергії, рівень специфічної адсорбції і т.ін., також важливі.

Результати отримані на різних видах мікроорганізмів спонукають застосовувати РЧ-ЕМВ у різних галузях біотехнологічного виробництва, з одного боку, для направленої активації мікробних процесів або ж біосинтезу цільових продуктів [166, 195–200] з іншого ж боку, для пригнічення мікробної активності з метою покращення якості кінцевих продуктів і збільшення тривалості їх зберігання [201–207]. З подібною ж, стерилізуючою, метою РЧ-ЕМВ знаходять своє застосування в медичній практиці [174, 208, 209], сільському господарстві [132, 166, 175, 198, 210] і побуті [211, 212], адже виказують здатні вибірково пригнічувати життєздатність патогенних мікроорганізмів. Перспективи використання радіочастотного та мікрохвильового випромінювання нетермальної інтенсивності для потреб біотехнологічного виробництва знаходяться на початковому етапі вивчення [195, 196, 199, 213–215], в той час як РЧ-ЕМВ вже досить успішно

пропонуються і використовуються у медичній практиці для лікування цілого ряду захворювань та розладів організму [115, 147, 153, 216].

1.1.7. Генетична нестабільність як шлях адаптації до дії стресових факторів

Одночасно із зміною рівнів експресії ESR-генів, або генів специфічної відповіді на окремі види стресу, адаптивні властивості організму за несприятливих умов можуть збільшуватися також і за рахунок «генетичної нестабільності» [217]: випадкових змін стабільності каріотипу, до яких належать дестабілізація хромосом, обмін сестринськими хроматидами, анеуплоїдія, мутації, ампліфікація генів, клональна гетерогенність [218–222]. В цілому це явище може мати важливе позитивне значення в житті клітини. Так бактерії можуть генерувати мутації і таким чином набувати стійкості до антибіотиків [42, 223, 224]. Зокрема для *Streptomyces coelicolor* та *S. ambofaciens* характерна множинна зміна ознак резистентності до антибіотиків, асоційована з нестабільністю генотипу природної хлорамфенікол-стійкості [225]. Подібну «запрограмовану» нестабільність можна прослідити й у дріжджів *S. cerevisiae* на прикладі *FLO*-генів, які відповідають за аглютинацію і адгезію клітин до біологічних і небіологічних поверхонь. *FLO*-гени характеризуються високим рівнем поліморфізму, що в свою чергу сприяє швидкій адаптації дріжджів до нових умов оточуючого середовища [226]. Порушення контролю і регуляції процесів геномної мінливості може призвести до патології, що виражається в накопиченні мутацій або старінні. Тому генетична нестабільність є важливим атрибутом клітинного старіння у багатьох видів [222, 227]. Вона призводить до зміни регуляції генної експресії і, таким чином, до вікового порушення в клітинній фізіології, зупинці клітинного росту і в кінцевому підсумку до загибелі клітини, або її бласттрансформації. Нестабільність геному може бути пов’язана з дволанцюговими розривами в ДНК, вкороченням теломер, активацією мобільних генетичних елементів і зниженням ефективності функціонування процесів репарації.

Прояв генетичної нестабільності залежить від плоїдності і в клітин дріжджів *S. cerevisiae* хромосомні перебудови проявляються лише у диплоїдів, що може бути пов’язано із процесом репарації ДНК, яка здійснюється в диплоїдних клітинах і не виявляється в гаплоїдних клітин [228, 229]. В клітин дріжджів *C. albicans* геномну нестабільність, пов’язану із окремими хромосомними делеціями, було відмічено на стадії експоненційного росту в диплоїдних, тетраплоїдних та анеуплоїдних штамів [230].

1.1.8. Поліфосфати як фактори стійкості до чинників стресу

Клітини мають, або ж синтезують *de novo* у відповідь на дію чинників стресу специфічні молекули, які мають антиоксидантні або ж осморегулюючі властивості. До таких сполук за останні роки були віднесені й клітинні поліфосфати (полі(Ф)), які називають «молекулярними викопними», тобто речовинами, які еволюційно є одними з найдавніших сполук. Припускають, що вони виконували функцію запасання фосфору та енергії для мікроорганізмів на початку зародження життя на Землі, проте з часом основні біоенергетичні функції лягли на АТФ, а полі(Ф) стали регуляторними біополімерами, які беруть участь у корекції клітинного метаболізму на генетичному і ензиматичному рівнях [9, 231, 232]. Подібно до АТФ, полі(Ф) містять макроергічні зв’язки (багаті енергією) і здатні до делокалізації енергії і виділення великої її кількості при гідролізі цих зв'язків [233, 234]. А завдяки тому, що органічні полі(Ф) присутні у вигляді солей різних металів (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} тощо), то їх розглядають також як резерви цих іонів, і в зв'язку з цим висунуто припущення, що в природі вони можуть відігравати ще й роль іонообмінників, регулюючи рівень тих чи інших катіонів в клітинах [10].

Регулююча роль полі(Ф) полягає у здатності перемикати генетичні програми, наприклад, при переході до стаціонарної фази росту і при виживанні у стресових умовах [10–12]. Серед можливих механізмів, за рахунок яких внутрішньоклітинні полі(Ф) виконують свої регуляторні функції, постулюють неензиматичний механізм. Цей процес було відкрито нещодавно

стосовно посттрансляційної модифікації білків і назвали поліфосфорилюванням [10]. Ця модифікація полягає у ковалентному приєднанні неорганічного полі(Ф) до лізинових залишків протеїнів, що за природою дуже схоже до добре відомих модифікацій, таких як фосфорилювання та пірофосфорилювання [235]. Тобто полі(Ф) можуть безпосереднього приєднуватися до амінокислот, що спричинює зміну конфігурації білків та відповідно впливає на їх функції [236]. Можливо з цим пов'язана роль полі(Ф) у складі транспортних мембранних каналів в комплексі з полі-*β*-гідроксібутиратом та іонами Ca^{2+} [237], чим самим регулюють надходження Ca^{2+} у мітохондріях, долучені до формування кісткової тканини, коагуляції крові, функціонуванні мозку, тощо [238–241]. Окрім того полі(Ф) можуть взаємодіяти із сигнальними молекулами змінюючи їхню активність і тим самим непрямим чином впливати на перебіг відповідних сигнальних шляхів [235].

1.1.9. Метаболізм поліфосфатів і стійкість мікроорганізмів до стресів

Ферменти синтезу (полі(Ф)кінази) і деградації (екзо- і ендополіфосфатази) полі(Ф) каталізують синтез і відщеплення фосфатних залишків до/від полі(Ф)-ланцюгів, відповідно. Ці ферменти присутні у прокаріотів та в еукаріотів і тісно пов'язані з енергетичним обміном. Дефектність за одним чи кількома генами, що кодують полі(Ф)ази призводить до втрати клітинами таких властивостей, як рухливість, вірулентність тощо [9, 44]. Конфігурація полі(Ф)-залежних ферментів у прокаріотів та еукаріотів суттєво відрізняється і екзополі(Ф)ази прокаріотів та еукаріотів належать до різних родин білків; сильний взаємозв'язок між полі(Ф) та ферментами, що відповідають за обмін нуклеотидних сполук прослідковується у прокаріотів, в той чай як у еукаріотів цей зв'язок є слабшим [242]. Окрім того деякі ферменти були знайдені лише в прокаріотів, а інші – лише в еукаріотів [242].

Гени полі(Ф)кінази *PPK1* та полі(Ф)ази *PPX1* можуть бути тісно пов'язані між собою і в клітин *E. coli* вони об'єднані в оперон і знаходяться під контролем

спільного промотора, який активується у відповіді на осмотичний і оксидативний стрес, проте в клітин *P. aeruginosa* такої узгодженості не має [235].

Багато полі(Ф)-залежних ферментів (полі(Ф)кіназа, екзополі(Ф)аза, полі(Ф)глюкокіназа та НАД-кіназа) є багатофункціональними та можуть каталізувати реакції і з полі(Ф), і з нуклеозидтрифосфатами [243]. Вірогідно існує зв'язок між численними функціями полі(Ф) та здатністю ферментів їх обміну каталізувати перетворення інших субстратів [244]. Ця здатність є характерною для багатьох полі(Ф)-залежних ферментів. Так, наприклад, полі(Ф)-глюкофосфотрансфераза використовує і полі(Ф), і АТФ як донор фосфатів [243]. А екзополіфосфатаза ґррА розщеплює P_i з полі(Ф) та бактеріальних вторинних посередників, таких як гуанозін-три- і дифосфатів [245]. Деякі бактеріальні екзополі(Ф)ази проявляють значну нуклеозидтрифосфотазну активність [246]. Ферменти, що належать до групи полі(Ф)кінази 2, каталізують нуклеозидне монофосфатне фосфорилювання [247].

Деякі полі(Ф)-залежні ферменти і особливо екзополі(Ф)ази є специфічними і локалізовані лише у певних клітинних компартментах [10]. Подібна специфічність до локалізації є характерною рисою еукаріотичних АТФаз. Тобто однакові біохімічні реакції відбуваються у різних клітинних компартментах за рахунок специфічних ензимів, що варіюють за своїми властивостями, кодуючими генами та функціями.

Ферменти полі(Ф)-метаболізму проявляють особливу активність в стресових умовах де для більшості клітин мікроорганізмів відмічене накопичення внутрішньоклітинних полі(Ф) [238, 248, 249]. Зокрема показано, що полі(Ф)кіназа PPK1, відіграє ключову роль не лише при переході *E. coli* від фази активного росту до стаціонарної фази, але й є необхідною для виживання клітин бактерії в стаціонарній фазі і при різних стресах: термічному, пероксидному і осмотичному [44, 65, 232, 247]. При адаптації клітин *E. coli* до

оксисечовини відбувається дворазове збільшення активності піро(Ф)ази, а при голодуванні важливу роль для виживання відіграє активність PPK1.

В цілому літературні дані показують, що дефектність по *PPK1* корелює із стійкістю клітин до факторів навколишнього середовища у різних мікроорганізмів. Мутанти *N. gonorrhoeae* та *N. Meningitidis* росли гірше, ставали менш життєздатними і більш чутливими до імунної сироватки [44]. А *PPK1*-делеційний штам *Vibrio cholerae* за фенотиповими ознаками був подібний до аналогічного мутанту *E. coli* і проявляв підвищену чутливість до температури [11]. Мутант *Pseudomonas aeruginosa* по гену *PPK1* хоча й не виявляв порушень у рості та здатності до адаптації, проте мав знижену рухливість і був менш адгезивним [249].

Клітини дріжджів *Candida humicola* в процесі росту накопичують у десять разів більше полі(Ф) при pH 5,5, ніж при pH 7,5. Процес залежить від активності полі(Ф)кінази і вважається доказом того, що адаптація мікробних клітин в процесі росту і розвитку до екологічних стресів тісно пов’язана з полі(Ф) обміном [250].

Слід також зазначити, що одним з механізмів пристосування бактерій до несприятливих умов є так звана «stringent»-відповідь, коли в клітинах накопичуються гуанозинпентафосфат і гуанозинтетрафосфат. Вони координують різні процеси відповідно до змін складу середовища росту і накопичуються при амінокислотному голодуванні і нестачі енергії. Доказом кореляції між полі(Ф)-обміном та адаптацією до стресових факторів є і той факт, що трансформанти *E. coli*, які несуть плазміди, що забезпечують надекспресію дріжджової екзополі(Ф)ази і мають мінімальні кількості полі(Ф) проявляють знижену стійкість до пероксиду гідрогену і теплового шоку, а також є менш стійкими до мітоміцину і дії УФ-випромінювання [250, 251].

Відомо, що мутант *E. coli,* у якого відсутня цитоплазматична супероксиддисмутаза (SOD) характеризується нездатністю виживати в стаціонарній фазі росту і високою чутливістю до пероксиду гідрогену і схожий за цими властивостями на мутанта по *PPK1* [231, 252]. Однак за умови

накопичення в клітинах полі(Ф) відбувалося одночасно й збільшення стійкості SOD-мутантів до пероксиду гідрогену [232]. Полі(Ф) можуть захищати клітини від оксидативного стресу за рахунок вивільнення металічних катіонів [253].

1.1.10. Особливості метаболізму поліфосфатів в клітин *S. cerevisiae*

Для клітин дріжджів *S. cerevisiae* відомі лише декілька ферментів метаболізму полі(Ф), гени яких були ідентифіковані. Це полі(Ф)синтетаза (полі(Ф)-полімераза) vtC4 [254], полі(Ф)ази PPX1 та PPN1 [255], диаденозин- та дифосфоінозитолфосфогідролаза DDP1 [249]. На вакуолярній мембрані та на клітинній периферії, найбільш вірогідно, на мембрані ендоплазматичного ретикулуму та оболонці ядра локалізований VTC-комплекс, яка існує у вигляді двох різних субкомплексів. Фосфогідролаза DDP1 проявляє ендополі(Ф)азну активність та належить до родин гідролаз Nudix [249]. Аналогічні три білка цієї родини, DIPP1, DIPP2 та DIPP3, в клітинах людини здатні до деградації полі(Ф). Дріжджова екзополі(Ф)аза PPX1 та білок людини *h*-prune мають 91% подібність у геномній послідовності, і *h*-prune проявляє екзополі(Ф)азну активність. Окрім того була показана подібність (40%) між полі(Ф)азою дріжджів PPN1 та кислою сфігномієліназоподібною фосфодиестеразою людини. Така подібність між послідовностями ферментів обміну полі(Ф) дріжджів та ссавців вважається не випадковою та еволюційно значимою [244].

У *S. cerevisiae* екзополі(Ф)аза (КС3.6.1.11), що відщеплює P_i з кінця полімерного ланцюга, кодується двома негомологічними генами, *PPX1* та *PPN1*. Полі(Ф)ази PPX1 та PPN1 відрізняються за субстратною специфічністю, клітинною локалізацією та умовами для експресії. PPN1 у клітині локалізується у вакуолях, ядрі та мітохондриальній мембрані, в той час як PPX1 локалізується у клітинній стінці, цитоплазмі та мітохондриальному матриксі. Слід відмітити, що PPN1 локалізується переважно у вакуолі, але в той же час відповідає за екзополі(Ф)азну активність у ядрі та мітохондриальних мембранах [256, 257]. Інактивація генів *PPX1* та *PPN1* призводить до збільшення загального вмісту

полі(Ф) у клітинах дріжджів на стаціонарній стадії росту, хоча мутації й мають неоднаковий вплив на вміст окремих фракції полі(Ф) [256, 258].

Дефектність за обома полі(Ф)азами не є летальною, хоча такий мутант дуже швидко втрачає життєздатність в стаціонарній фазі [259]. Це свідчить про те, що роль цих ферментів (як мінімум за оптимальних умовах існування) може бути частково компенсованою роботою інших ферментів. Наприклад, невідома ендополі(Ф)аза, що не кодується геном *PPN1*, була виявлена в клітинах подвійного мутанта *Δppx1::Δppn1* [248]. Окрім того слід нагадати, що білок Ddp1p також має ендополі(Ф)азну активність. Тому очевидно, що в клітинах дріжджів є ще невстановлена система, яка дозволяє компенсувати інактивацію генів *PPX1* і *PPN1* і продовжувати використовувати полі(Ф), як резерв фосфору [113].

1.1.11. Участь високомолекулярних неорганічних поліфосфатів у метаболізмі клітин дріжджів та в його регуляції

Неорганічні полі(Ф) – це поліфункціональні сполуки, які надзвичайно лабільно реагують на умови навколишнього середовища [233]. У дріжджів, в порівнянні з бактеріями, реакція полі(Ф) на умови навколишнього середовища вивчена переважно щодо аспектів впливу надлишку та нестачі фосфату, а також впливу джерела вуглецю на накопичення і довжину ланцюга даних полімерів [246, 256]. Тим не менше, припускають, що полі(Ф) приймають участь у різних регуляторних процесах дріжджів та інших нижчих еукаріот. І з одного боку можна спостерігати значну плейотропну дію мутацій за певними генами полі(Ф)-обміну, наприклад, за геном *PPN1,* з іншого боку, на метаболізм полі(Ф) впливають й інші гени, що не кодують безпосередньо ферменти метаболізму полі(Ф). Так, наприклад, в клітинах з порушеннями у дихальному ланцюзі, зменшується кількість полі(Ф) при рості в аеробних умовах на глюкозі та галактозі [252]. Тобто, сучасні генетичні методи дозволили отримати ряд нових даних про метаболізм та функції полі(Ф) у дріжджах. В той же час, деякі

з цих мутацій володіють вираженим плейотропним ефектом, що ще раз підтверджує думку про множинність функцій полі(Ф).

Одним із таких можливих шляхів залучення полі(Ф) у формуванні відповіді на дію стресових умов та регуляцію процесів розвитку може бути їх взаємодія з певними сигнальними молекулами, так званими вторинними посередниками [235]. У еукаріот такі вторинні сигнальні сполуки, як фосфоінозитиди та диаденозинтетра-, пента- та гексафосфати могли б бути вірогідними кандидатами на таку взаємодію, подібно до того, що має місце в клітинах бактерій між (p)ppGpp та полі(Ф). Диаденозинтетрафосфати накопичуються у дріжджах у стресових умовах, викликаних надлишком іонів кадмію у середовищі чи тепловим шоком. Відомо, що полі(Ф)аза PPX1 ефективно гідролізує аденозин-5-тетрафосфат та гуанозин-5’-тетрафосфат, а диаденозин-5’-5’’’-P1,P4-тетрафосфат-фосфорилаза може проявляти також і полі(Ф)кіназну активність у поєднанні з іншими ферментами. Усі ці дані є основою для майбутніх досліджень регуляторної ролі полі(Ф) в клітинах дріжджів [242].

Обидві полі(Ф)ази (PPN1 і PPX1) беруть участь в регуляції JAK/STAT («Janus kinase / signal transducers and activators of transcription») сигнального шляху, завдання якого полягає в передачі інформації від хімічних сигналів ззовні клітини до промоторів генів на ДНК, що тягне за собою активацію процесу транскрипції. PPN1 виконує основну функцію в цьому процесі, адже забезпечує пригнічення SOCS1 (від англ. «*Suppressor Of Cytokine Signaling-1*»), яка є важливою складовою JAK/STAT сигнального шляху [260]. У клітинах ссавців, функціональна роль фосфатази PPN1 вкрай важлива, адже цей фермент здійснює процеси дефосфорилювання безпосередньо в ядрі, без чого такі важливі фактори, як, наприклад, білок-трансдуктор і активатор транскрипції STAT1, не можуть вийти з ядра в цитоплазму і виконати свої регуляторні функції [260]. Дефектність по одній або обом фосфатази тягне за собою збій в роботі сигнального шляху і неможливість клітини сформувати відповідь на зовнішній подразник.

Не зважаючи на відмінності в локалізації ферментів полі(Ф)аз в клітинах ссавців і дріжджів, що безперечно накладає видоспецифічні особливості на їх функціонування, дріжджі *S. cerevisiae* слугують основною моделлю для вивчення структурних особливостей будови цих ферментів, а також їх фізіологічної і біохімічної ролі. Полі(Ф)ази PPN1 і PPX1 не відносяться до летальної групи ферментів (життя без яких унеможливлюється) і все ж очевидна залученість цих ферментів до більшості внутрішньоклітинних процесів. Нажаль знання щодо функцій, які виконують ці ферменти в клітинах еукаріотичних організмів, більшістю апроксимують, виходячи з результатів отриманих для клітин прокаріотів. Тим не менше дослідники відзначають що роль полі(Ф) і ферментів їх метаболізму, до певної міри зберігатися і є універсальною для представників різних царств живих організмів.

1.2. Роль поверхневих структур у стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу

Ще не так давно, такі фактори, як пероксид гідрогену, оцтова кислота, й ряд інших фізико-хімічних факторів, розглядалися виключно в негативному світлі щодо впливу на перебіг життєвоважливих функцій в клітинах різних живих організмів. Відповідно й внутрішньоклітинні механізми, які здатні перетворювати ці сполуки на менш агресивні, вважали механізмами внутрішньоклітинного захисту. Однак в останні роки було показано, що клітини живих організмів різного рівня організації, не стільки «борються», скільки використовують ці хімічні сполуки, наприклад, як сигнальні молекули в процесах біоплівкоутворення, кворумсенсінгу, або ж як фактори формування позаклітинних механізмів пасивного захисту від інших мікроорганізмів, тощо. Було встановлено, що ліпідні мембрани є досить гарним бар’єром для цілого ряду хімічних чинників серед яких і пероксид гідрогену [2], і, що клітини можливо мають навіть специфічні мембранні структури (подібні до аквапоринів), які відповідають за активний транспорт цих сполук в обидві сторони. Виявилося, що клітини підтримують необхідну концентрацію

пероксиду гідрогену і здебільшого «не переймаються» надвисоким його вмістом у оточуючому середовищі. Звісно ж контроль за рівнем пероксиду гідрогену в клітинах відбувається за рахунок добре відомих ферментних систем (каталазних, пероксидазних, тощо) які були знайдені в усіх органелах. Проте, останніми роками з'явилися дані, що вакуолі також містять певні системи захисту і контролю, які задіюються при надвисоких концентраціях стресових чинників. Однак те, яким чином вакуолярні структури виконують свої захисні функції, залишається на рівні здогадок, адже в вакуолях, принаймні клітин дріжджів, не знайдено каталаз, пероксидаз, ні інших подібних ферментів [1].

В світлі нових відкриттів, роль КС змінюється від структури пасивного захисту, до структури з елементами активного захисту. На часі вважається добре вивченим елементний склад КС, встановлені хімічні зв'язки між окремими її складовими (білок-білкові, білок-цукрові, міжцукрові зв'язки), встановлені гени, які відповідають за синтез окремих її компонентів і метаболічні шляхи синтезу окремих складових. Одночасно з цим, ціла низка процесів залишається невивченою, або ж невстановленою. Так, наприклад, не відомо, за рахунок яких ферментних систем, чи структурних елементів КС відбується формування зв'язків між її окремими компонентами. Яким чином відбувається передача сигналів з-зовні в середину клітини. Чому компоненти КС виявляються важливими в стійкості до таких відомих факторів стресу як етанол. Чому відбуваються зміни фізичних властивостей КС, її структурні пертурбації у відповідь на дію з боку радіочастотного ЕМВ. І безліч інших питань. Науковий світ лише наближається до розуміння регуляторних процесів, які координують синтез компонентів КС в нормі і за умов стресу.

1.2.1. Регуляція синтезу компонентів клітинної стінки за дії стресових факторів

1.2.1.1. Будова клітинної стінки дріжджів

Компонентний склад КС дріжджів вважають досить добре вивченим і на сьогодні спостерігається значний прогрес у розумінні молекулярно-генетичних

процесів її біосинтезу за нормальних умов і за умов стресу [261, 262]. В цілому, КС представлена двома шарами, внутрішній шар має низьку електронну щільність і складається в основному з полімерів глюкану і хітину (представленому полімерами *N*-ацетилглюкозаміну), а зовнішній шар є електронно щільним і представлений здебільшого манопротеїнами [261, 262]. Відносна кількість та локалізація окремих компонентів КС змінюється залежно від фази клітинного циклу чи стадії розвитку, умов оточуючого середовища, джерела вуглецю, тощо [261]. Зміни у складі та структурі КС впливають на її бар'єрні функції і за умов активного росту КС є більш проникними порівняно із КС клітин у стаціонарній стадії росту [263].

Основними компонентами КС є полісахариди і манопротеїни. Серед полісахаридів виділяють три основні фракції відповідно до розчинності в лузі та кислоті [261], що визначається відносною кількістю β1,3- та β1,6-зв'язків між глюканами та мананами, а також наявним зв’язком з хітином. Власне сам хітин є полімером β1,4-зв'язаного *N*-ацетилглюкозаміну (GlcNAc). Хітин становить лише 1–2% від сухої маси стінки і локалізований здебільшого на місцях брунькування. Цей полімер зустрічається у трьох різних та полідисперсних формах: у вигляді вільного хітину, у вигляді хітину зв'язаного з β1,3-глюканом (присутній переважно в зоні рубця) і хітин пов'язаний з β1,6-глюканом, який в свою чергу пов'язаний з мананом і β1,3-глюканом [264]. Загальноприйнято, що полісахариди забезпечують механічну силу (*mechanical strength*) КС і особливу роль в цьому відводять β1,3-глюкану [265]. Однак при стресових навантаженнях, або ж за генетичної неспроможності повноцінного синтезу КС, відмічали збільшення вмісту хітину на КС до 20% від загальної її ваги, що в цілому відповідало збільшенню життєздатності таких клітин [265, 266]. Проте, інші дослідники вважають, що хітин не може бути важливим елементом для забезпечення механічної сили КС і його роль полягає зовсім у іншому [267].

Окрім того тривалий час вважали, що КС дріжджів є досить жорсткою структурою, однак ця думка не так давно була спростована і показано високу еластичність цієї структури, яка повторює інвагінації цитоплазми в разі

зморщування клітин дріжджів при гіпертонічному шоці, що, до речі, супроводжувалося одночасними змінами будови цитоскелету [13, 265]. Високу еластичність КС, так само як і її механічну силу, приписують β1,3-глюкану [265]. Тим не менше, очевидним є те, що форма клітин не визначається фізичними властивостями КС, а є результатом збалансованої структурно-функціональної взаємодії принаймні із структурами цитоскелету [5].

β1,6-глюкан забезпечує приєднання GPI-білків КС до β1,3-глюканової сітки, а також може слугувати акцептором для хітину, принаймні у випадку стресу КС [265]. β1,6-глюкан може утворюватися в двох формах – розчиненій і нерозчиненій – однак, в які з цих форм він синтезується в клітинах дріжджів на часі невідомо [265]. Також не відомо де саме відбувається синтез цього полімеру, адже у внутрішньоклітинному вмісті не знайдено β1,6-глюкану, в той час як його багато в КС і везикулах плазматичної мембрани [265]. В свою чергу, кількісний вміст цього полімеру в КС виявляє високі кореляційні залежності із вмістом резидентних білків в ендоплазматичному ретикулумі, структурах апарату Гольджі і на поверхні клітин, що вказує на існування взаємних зв’язків, які ще належить виявити [265].

Полісахаридні ланцюги КС зв’язані між собою поперечними зв’язками і тим самим створюється так звана «полісахаридна сітка». Визначено, що GPI-білки КС зв’язуються через β1,6-глюкан з β1,3-глюканом і хітином, однак точна природа GPI-Glc зв’язку не відома, як не відомі й ферменти, що виконують цей процес [268]. Однак більшість полісахаридів синтезуються на зовнішню сторону ЦПМ, тобто у периплазматичний простір, в якому як відомо немає вільних джерел енергії, які б могли бути використані для створення нових зв’язків. Для вирішення цієї термодинамічної дилеми було припущено, що вільна енергія може надходити з існуючих зв'язків у полісахаридних ланцюгах і що нові поперечні зв'язки виникають шляхом трансглікозилювання (руйнування) існуючих зв’язків із послідуючим створенням нових [264]. Проте, КС містить також у своєму складі фракцію високоенергетичних полі(Ф) і, на нашу особисту думку, саме вони можуть виступати сполучними елементами

між цукровими залишками різних структурних компонентів КС. Таке припущення, робить зрозумілою функціональну роль полі(Ф)ази PPX1, активність якої зафіксована в ЦПМ і КС [269], де вона може виступати ферментом розщеплення полі(Ф)-ланцюгів на більш короткі для подальшого формування містків між цукровими залишками. В будь-якому випадку питання залишається відкритим і потребує проведення спеціальних досліджень.

Білки, які входять до складу КС (за різними даними їх різна кількість) і формують її зовнішній шар, в основному представлені манопротеїнами, які на 90% складаються із полісахаридних хвостів. Білкова частина розвернута назовні і є менш проникною для макромолекул порівняно із фібрилярною внутрішньою частиною, що, ймовірно, визначається наявністю великої кількості довгих і сильно розгалужених вуглеводних бічних ланцюгів зв'язаних з залишками аспарагіну і завдяки присутності дисульфідних зв'язків [265]. Негативний заряд поверхні, вважають, визначається чисельними фосфодіефірними зв'язками в *N*- і *O*-зв'язаних бічних полісахаридних ланцюгах [265].

Відомі дві основні групи білків КС ковалентно зв'язаних із полісахаридними ланцюгами: GPI-білки, які мають в своїй структурі глікозилфосфатидилінозитольний (GPI) якір, яким приєднані до ЦПМ, і родина *Pir*-білків (від англ. «*Proteins with Internal Repeats*», тобто «білки з внутрішніми повторами») [265, 270], які не мають безпосереднього контакту з мембраною, а локалізовані в товщі полісахаридної сітки. Є ще одна невелика група білків, які не мають ковалентних зв'язків з полісахаридними ланцюгами і, так само як і *Pir*-білки, вважаються розміщеними в товщі полісахаридної сітки [270].

Ідентифіковано понад 70 GPI-білків [270], які зв'язані з β1,3-глюканом через β1,6-глюкан (детально із особливостями синтезу цих білків можна ознайомитися в спеціальному огляді літератури [271]). До цих білків належать білки-агглютиніни серед яких Aga1/2/α1, Sag1, представники сімейства білків-флокулінів (Flo1/5/9/10/11), білки-стабілізуючі КС (Cwp1/2), білки анаеробіозу (*Tir*-білки), білки, що виконують функції захвату стеролів (*Dan*-білки) і заліза

(*Fit*-білки), білки, які залучені до синтезу гіфи, морфогенезу і біосинтезу КС, формування спори, статевого процесу, транспорту хітину до β1,6-глюкану, тощо (повний перелік білків КС доступний [270]).

Pir-білки представлені п'ятьма близькими за структурою поліпептидами (Pir1-5) [265], чотири з яких ідентифіковані в клітинах *S. cerevisiae* [270]. Вони напряму зв'язані з β1,3-глюканом через лужно-чутливі зв'язки і мають *N*-термінально розміщені сигнальні пептиди. Припускають, що вони виконують стабілізуючу роль у клітинній стінці, адже за їх делеції клітини збільшуються в розмірах («набрякають»), ростуть повільніше і виявляють підвищену чутливість до барвників конго червоний і калькофлор білий [265, 270].

Білки, які не мають ковалентних зв'язків («*non-covalently linked cell wall proteins*») представлені близько 15 білками. Серед них група Scw1-Scw9 білків, які взаємодіють з β1,3-глюканом через водневі зв'язки, в основному *O*-гликозильовані і містять *N*-термінальні сигнальні послідовності. Scw6 і Scw9, відповідно, виконують функції екзо- і ендоглюканаз. Екзоглюконазну функцію виконує також й білок Exg1p, а ендоглюконазну – Eng1p. Білки Cts1/2 проявляють хітиназну активність, а Bg12p – едно- і трансглікозидазну активність, тощо (повний перелік білків КС доступний [270]).

Досить часто в КС виявляють представників сімейства *Hsp*-білків (білків теплового шоку) і гліколітичні білки (Tdh1-3), однак чи можна вважати таке їх розташування невипадковим, залишається під питанням [265].

1.2.1.2. Регуляція синтезу компонентів клітинної стінки дріжджів за дії факторів стресу

Основним механізмом, який забезпечує регуляцію синтезу компонентів КС у відповідь на зміни в оточуючому середовищі є сигнальний шлях цілісності КС (CWI-сигнальний шлях, від англ. «*Cell Wall Integrity*») [5]. Головне завдання, яке приписують цьому сигнальному шляху, полягає у формуванні і передачі сигналів ззовні клітини (щодо змін у оточуючому середовищі) до внутрішньоклітинних регуляторних центрів. Сигнали формуються на рівні

плазматичної мембрани завдяки п’яти специфічним трансмембранним білкам-сенсорам (Wsc1-3, Mid2, і Mtl1) [5]. Позаклітинні домени цих білків мають довгі «хвости» з манози (тобто *O*-манозильовані), які характеризують здебільшого лінійною структурою із відгалуженнями у вигляді *Man*-P (маноза, приєднана до основного ланцюга через фосфатний зв’язок) [272]. Слід зазначити, що *O*-манозильовані глікани є характерними і для тварин (хоча структурно вони й відрізняються від дріжджових аналогів) [273]. Сенсорні білки передають сигнал на Rho1, один із сигнальних білків *Ras*-родини, який передає його далі в кількох напрямках: на *β*1,3-глюкан синтазу локалізовану в ЦПМ , на Bni1 (білок-формін, який приймає участь у формуванні бруньки), Sec3 (один з білків екзоцисту – білковий комплекс, який приймає участь у транспорті везикул від апарату Гольджі до ЦПМ), безпосередньо на транскрипційний фактор Skn7 і на каскад кіназних реакцій Pkc1-MAP, мішенню яких є ще два транскрипційні фактори (Rlm1 і SBF-комплекс (Swi4-Swi6)) [5].

Шлях CWI-сигналінгу активується у відповідь на дію з боку різних стресів. Гіпоосмотичний шок викликає швидку, але короткочасну активацію цього шляху: активність Mpk1 збільшується вже за 15 секунд і повертається до базового рівня через 30 хв [5]. Подальша зміна осмотичності додатково активує Mpk1, що вказує на динамічну, активну реакцію клітини на зміну осмотичного потенціалу. Одночасно з цим відбувається активація синтезу одного з осмосенсорів (Sln1), розташованого на поверхні клітин, що в свою чергу призводить до активації фактору транскрипції Skn7 на підтримку біогенезу КС. На додаток за гіпотонічного шоку відбувається активація Cch1/Mid1 (кальцієвого каналу), що призводить до активації фактору транскрипції Crz1. На противагу цьому, у відповідь на гіперосмотичний шок відбувається активація MAP-кінази Hog1, що, припускають, відбувається в насідок інактивації Sln1 [5]. Участь трьох сигнальних шляхів у формуванні реакції КС на осмотичний шок, свідчить про надзвичайну важливість цього фактору для виживання клітини [5].

За дії температурного шоку індукція CWI-шляху відбувається не одразу, а приблизно через 20 хв із піком на 30 хв [88]. Це вказує на її опосередкованість, яка може буть пов’язаною із накопиченням в цитоплазмі трегалози [274], вміст якої може сягати 0,5 М, з метою захисту білків від термічної денатурації [275–277]. Таке різке зростання внутрішньоклітинної осмолярності збільшує внутрішньоклітинний тиск (тургор), що, в свою чергу, розпізнається сигнальними молекулами, як осмотичний стрес і відбувається запуск CWI-сигналінгу [5].

Незважаючи на опосередковану активацію CWI-шляху за дії температури, рецептори, розташовані на поверхні клітини, є важливими для теплової активації кінази Mpk1 [278–280]. Активація цієї кінази може відбуватися за рахунок пригнічення активності білкових фосфатаз (Sdp1, Msg5, Ptp2 та Ptp3). Однак, зважаючи на те, що фосфатаза Pkc1, напроти, активується *in vivo* за дії теплового шоку [281], а елімінація фосфатаз MAP-кінази не зупиняє активації Mpk1 за дії теплового шоку [112], цілком ймовірно, що є два шляхи, які спрямовують реакцію клітин на зміни напруги КС – через сенсори на поверхні клітин для передачі активуючого сигналу на Mpk1, а другий шлях – через пригнічення активності фосфатаз MAP-кінази [5]. Саме цей другий шлях, вочевидь , є специфічним для активації Mpk1 за дії теплового шоку [112].

Перекисне окиснення ліпідів, індуковане гідропероксидом лінолевої кислоти, також активує Mpk1 (6) і запускає CWI-сигналінг, хоча за рахунок якого механізму це відбувається, на часі не відомо і варто зазначити, що шлях активації CWI-сигналінгу при окислювальному стресі є, загалом, найменш вивченим [5]. Одним з припущень, що власне окиснення плазматичної мембрани породжує сигнал стресу КС [5]. З іншого ж боку показано, що оксидативний стрес, викликаний пероксидом гідрогену, призводить до фосфорилювання Ask10 (регулятора аквагліцеропорину (Fps1p), який виконує транспорт гліцеролу через ЦПМ), хоча й не через Mpk1, а через іншу мітоген-активуєму протеїнкіназу Mkk1/2 [282]. Окрім цього, Ask10 є активатором транскрипційного фактору Skn7, який задіяний у формуванні

відповіді на оксидативний стрес [283–286], а також цей білок приймає участь у руйнуванні цикліну С-типу Srb10, який, в сою чергу, є важливим для репресії активності принаймні кількох генів необхідних для формування відповіді на стрес. Зважаючи на такий тісний зв'язок Ask10 із Mkk1/2 і Skn7 він може виявитися сполучною ланкою між сигналізацією CWI, Skn7 та оксидативним стресом [5].

Кислотність середовища, хоча й є стресовим фактором для більшості живих організмів, однак дріжджі мають адаптаційні пристосування для виживання в досить широкому діапазоні pH. Зміни, які виникають в КС дріжджів при зниженні позаклітинного pH в межах фізіологічної стійкості клітин дріжджів, призводять до зменшення її проникності, що супроводжується збільшенням частки білків з лужно-чутливими зв'язками і зростанням пулу *β*1,3-глюкану, а це в свою чергу співпадає із посиленою експресією ряду GPI-білків (*CWP1, HOR7*, і *SPI1)* [287]. Проте за результатами іншого дослідження було відмічене посилення експресії інших двох GPI-білків *FIT2* і *FIT3* [288], які приймають участь у захваті іонів заліза [289]. Збільшення стійкості до *β*1,3-глюканази за низьких значень pH пов'язали із активністю кінази Hog1 [287], що вказує на ймовірну залученість Hog1 MAP-кіназного шляху до регуляції синтезу КС [265]. Спеціальні дослідження щодо впливу на клітини дріжджів оцтової і молочної кислот вказують на особливості архітектури КС, як фактору стійкості до цих хімічних сполук і кислотного стресу в цілому: зниження вмісту GPI-білків Sed1p і ендоглюканази Egt2p, секреторних білків Dse2p, Sun4p і Scw11p структурно подібних до глюканази, ендохітинази Cts1p і продукту гену YNL300W (глікозилфосфатіділінозитол-залежного білку КС), а також білків гістон-ацетрилтрансферазного комплексу (кодованих генами YID21, EAF3, EAF5, EAF6 і YAF9) локалізованого в ядрі, - усе це разом призводить до збільшення стійкості до молочної кислоти [99]. Слід зазначити, що хоча зменшення вмісту Sed1p (одного з манопротеїнів КС) відповідає більшій стійкості клітин до молочної кислоти, рівень експресії гену *SED1* зростав за дії цього фактору стресу [99]. Такий дисонанс вказує на недоліки у нашому

розумінні картини формування стійкості до дії того чи іншого стресу і вказує на необхідність комплексного підходу до вирішення подібних завдань.

Різні хімічні чинники, які здатні спричинити стрес КС, такі як антагоніст хітину калькофльор білий, барвник Конго червоний, який зв'язується з β1,3-глюканом, літичний фермент зимоліаза, і кофеїн – усі вони активують CWI-шлях [5]. Так само й мутації, які зачіпають біосинтез КС (наприклад, дефектність за *FKS1*), активують CWI-шлях [5]. Хоча, механізм, за якими кофеїн й інші подібні сполуки викликають стрес КС, незрозумілий, здається, що будь-яке втручання, яке порушує цілісність КС, є достатнім для запуску CWI-сигналінгу [5].

Окрім сторонніх чинників, досить часто власні метаболіти є токсичними для клітин, які їх утворюють, і у випадку клітин дріжджів таким метаболітом є етанол. З'ясувалося, що стійкість клітин дріжджів до етанолу визначається складом КС, однак не зрозуміло за рахунок чого це досягається, адже немає відомостей щодо можливого зв'язування етанолу з компонентами КС, такими як глюкан, хітин чи манопротеїни. Однак, зважаючи на те, що етанол все ж таки може зв'язуватися з молекулами білків, утворюючи водневі зв'язки і гідрофобні взаємодії з залишками амінокислот, що в цілому призводить до порушення білкової структури, то цілком ймовірно, що саме білки КС, і особливо глікозильовані манопротеїни, можуть бути мішенню для етанолу і викликати стрес КС. На підтримку цього припущення можуть виступати дані щодо впливу етанолу на рівні експресії генів, які кодують глікопротеїни (такі як *PIR3* і *SED1*) і манопротеїни (*SPI1*, *TIP1* і *TIR1*-3) КС, а також зміна активності регуляторних генів, які відповідають за синтез білків КС *ANP1* (α1,6-манозилтрансферазний комплекс) і *HOC1*, *MNN10*, *MNN11* і *OCH1*, які кодують субодиниці манозилтрансферазного комплексу апарату Гольджі. Однак, зважаючи на те, що було відмічене зростання рівнів експресії *CRH1* (хітинтрнсглікозилази) і *FKS2* (β1,3-глюкансинтази) припускають, що хітин і глюкан, можуть бути також мішенями етанолу [8]. Однак таке тлумачення вказує лише на можливі

мішені етанолу в КС і не дає відповіді щодо механізму, яким структурні елементи КС можуть збільшувати стійкість клітин дріжджів до етанолу.

Властивості КС вважаються тісно пов’язаними із станом цитоскелету, доказом чого є результати досліджень, в яких було показано, що препарати, які викликають деполяризацію актинового цитоскелету, такі як рапаміцин або латрункулін В, викликають пригнічення функцій протеінкіназ Tor1/2 і індукують активацію Mpk1 [3, 4]. Однак ефекти дії цих речовин значно зменшувалися або ж повністю пригнічувалися при відповідній осмопідтримці клітин [3, 4]. А тому очевидно, що CWI-шлях реагує на зміну тонічності в першу чергу, а не на дефекти у будові цитоскелету, тощо.

Зважаючи на те, що зовнішня осмопідтримка клітин, зупиняє активацію CWI-сигналінгу, вочевидь за рахунок зменшення впливу з боку внутрішньоклітинного тургору на ЦПМ , однією з універсальних причин стимулювання CWI-шляху різними чинниками вважають зміни натягу («stretch») плазматичної мембрани [5]. На користь такої точки зору виступають результати дослідження ефективності хлорпромазину, сполуки яка викликає розтягнення мембрани за рахунок асиметричного вбудовування у мембрану, і яка виявилася потужним активатором Mpk1 [88]. Іншим підтвердженням на користь цього припущення вважають наявність генетичного зв'язку між CWI-шляхом і фосфатазами Ppz1 та Ppz2 [290, 291], які відіграють роль у регуляції гомеостазу K+, внутрішньоклітинна концентрація якого вважається основним фактором, який визначає внутрішньоклітинний тургор [292]. В клітинах дефектних за *PPZ1/2* відбувається накопичення K+, що може впливати на натяг плазматичної мембрани і тим самим бути причиною конститутивної активації CWI-шляху [292]. Те саме, припускають, стосується і накопичення трегалози при гіпертермічному шоці, яка, крім захисту білків від термічної денатурації, також збільшує внутрішньоклітинну осмолярність [276]. Однак, незрозумілим залишається те, яким чином сенсори, локалізовані на поверхні КС, можуть виявляти розтягнення мембрани, адже припускають, що саме вони запускають каскад CWI-реакцій [5].

Іншим не зрозумілим за природою і механізмами, які лежать в їх основі, є процес зміни локалізації сигнальних білків CWI-шляху (які в нормі розташовані в зоні поляризованого росту) і актинового цитоскелету за дії таких факторів стресу, як тепловий шок або дія літичного ферменту зимоліази [293, 294]. Припускають, що це елемент механізму гомеостазу, який направлений на відновлення пошкодження КС [293]. І за цією моделлю генералізований стрес КС спричинює тимчасову делокалізацію актинового цитоскелету, що вимагає негайного перерозподілу білків КС для тимчасового усунення ушкоджень викликаних дією стресу [5].

В цілому ж за умови стресу КС запускаються шляхи формування загальної відповіді на стрес (ESR), відбувається активація CWI-шляху і Ca2+-сигналінгу [5]. CWI-шлях, як і більшість метаболічних і сигнальних шляхів описує білок-білкові взаємодії. По своїй суті, передача сигналу – це каскад фосфорилюючих/дефосфорилюючих реакцій, які пригнічують/активують окремі регуляторні білки. Важливу роль в забезпеченні CWI-сигналінгу відіграють фосфоінозитиди (деревати фосфатидилінозитолу – мінорного фосфоліпіду, розташованого на внутрішньому шарі ЦПМ) і власне, в клітинах дріжджів сахароміцетів – це фосфоінозитид PI4,5P_2 [5]. Утворення PI4,5P_2 відбувається за рахунок кінази Mss4 (фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназа), яка, таким чином, долучена до процесів морфогенезу, формування актинового цитоскелету, трансмембранного транспорту через цитоплазматичну і вакуолярну мембрани, до формування відповіді на температурний шок, тощо [295]. Дія факторів стресу, таких як тепловий шок сприяє утворенню PI4,5P_2, який впливає на активність низки білків, серед яких, ключовий для CWI-сигналінгу, Rho1p, а також білки й білкові комплекси залучені до синтезу актинового цитоскелету (Cap1/2 і GimC-комплекс) [295].

В представлених моделях CWI-сигналінгу відсутні зв’язки з іншими структурними елементами КС (полісахаридами). Є вказівки на те, що активність Pkc1p може бути пов’язана із активністю хітинсинтази 3 (Chs3p), яка є фосфопротеїном, а Pkc1p виконує її фосфорилювання *in vivo*. Однак рівень

фосфорилювання Chs3 не корелює з її вмістом у ЦПМ у випадку стресу, куди вона переходить з хітосом [296], і цей факт не дозволяє стверджувати, що Pkc1p виконує регулюючу функцію по відношенню до Chs3p [5].

З іншого боку, стрес КС індукує експресію *GFA1* [5], яка кодує глутамін-фруктоза-6-фосфат амідотрансферазу, що каталізує синтез глюкозаміну-6-Р і глутамату на шляху синтезу хітину. У промоторній частині *GFA1* має два сайти зв'язування для Rlm1 (транскрипційний фактор), який активується у відповідь на стрес КС і припускають, що таким чином може забезпечуватися зв'язок між CWI-сигналінгом і процесами біосинтезу хітину [5].

Гени *FKS1* і *GSC2*/*FKS2*, які кодують альтернативні субодиниці *β*1,3-глюкансинтазного комплексу, дещо по-різному реагують на стрес КС. Активність *FKS1*, яка за нормальних умов існування є досить високою, відповідно, пригнічується за дії стресу, в той час як активність *GSC2*/*FKS2*, навпаки, збільшується в разі дії стресу, а також у стаціонарній фазі і при ліміті за джерелом вуглецю [265]. Однак, функціональне значення таких змін в цілому залишається дискусійним [265].

Таким чином, на сьогодні зроблено очевидний прогрес у вивченні динамічних змін будови КС у відповідь на дію стресових чинників, але багато ще залишається невідомим і лише на початковому етапі вивчення. Визначені (експериментально, або ж за структурою, за допомогою біоінформатичних підходів) функції більшості білків КС, визначені їх хімічна природа і можливі місця локалізації. Дещо гірше вивчена роль полісахаридів, функції яких очевидно ще будуть переглядатися зважаючи на нові відкриття у цій сфері. Існують значні прогалини в розумінні динамічних змін стосовно структури і функцій КС і її окремих компонентів в умовах дії різних стресів. Очевидним є те, що існує дві групи факторів: ті, які здатні безпосередньо впливати на фізико-хімічні властивості КС і такі, які не мають безпосереднього впливу на ці показники, проте можуть опосередковано індукуватити CWI-шлях. Дія і перших і других, ймовірно полягає у зміні внутрішньоклітинного тургору, який в свою чергу призводить до змін натягу ЦПМ. Разом це викликає зміни у будові

цитоскелету і вимагає змін щодо локалізації білків КС, серед яких й сигнальні білки CWI-шляху. Цілком ймовірно, що саме зміна локалізації сигнальних білків може бути сигналом, який запускає каскад процесів CWI-шляху.

1.2.2. Регуляція синтезу компонентів цитоплазматичної мембрани за дії стресових факторів

Процеси, які протікають в КС і ЦПМ клітин дріжджів тісно пов'язані між собою. Це стосується не лише синтезу компонентів КС завдяки ферментним системам розташованим на ЦПМ . Але й того, що чинники, які впливають на фізико-хімічні властивості КС, передають сигнали через структури локалізовані на ЦПМ . А тому стан ЦПМ є вкрай важливим для коректної передачі сигналів і формування «коректної» відповіді на дію факторів стресу.

1.2.2.1. Особливості будови цитоплазматичної мембрани клітин дріжджів

Хімічний склад ЦПМ вивчений досить добре і основними її елементами є ліпіди (фосфоліпіди, стероли, сфінголіпіди, тощо) і білки. Ліпіди ЦПМ не лише створюють хімічний чи механічний прошарок між зовнішнім і внутрішнім вмістом клітини, але приймають активну участь у процесах транспорту поживних сполук і клітинних метаболітів, а також транспорту білків через мембрану [297], залучені до синтезу позаклітинних компонентів КС, таких як GPI-білки [298] або ж бактеріальні ліпополісахариди [299], визначають просторову стабілізацію і активність мембран-асоційованих білків [96], фізичний стан мембрани (її проникність, жорсткість, текучість) [300, 301], тощо. Не так давно було показано, сигнальну роль ліпідів (сфінголіпідів) і їх долученість до різних метаболічних шляхів [302].

Припускають, що мембрани мають доменну структуру, тобто складаються з різних білок-ліпідних комплексів, які відносно рівномірно розподілені в межах мембран і ніколи не перекриваються [303]. Для клітин дріжджів виділяють щонайменше п'ять основних доменів – це домен аргінін перміази Can1, домен H+-АТФази Pma1, домен TORC2-кінази, домен

переносників стеролу Ltc3/4 і домен механосенсорів КС Wsc1. Окрім основних є й додаткові домени, такі як домен кларитин-залежного ендоцитозу і домен pH-чутливого комплексу PAL/Rim, тощо [303]. Найочевидніше, що саме ліпіди створюють фізичний бар'єр навколо білків, що виключає можливість небажаної білок-білкової взаємодії.

Білки ЦПМ становлять близько 30% від загальної кількості білків в клітинах дріжджів, однак точної цифри на сьогодні не відомо, адже за різними даними мембран-асоційованих білків може бути від трохи більше сотні, до майже півтисячі [304] Білки виконують різноманітні транспортні функції (сюди входить транспорт іонів і протонів, поживних сполук, структурних елементів, тощо), вважаються рецепторами позаклітинних сигналів і тим самим приймають участь у формуванні чи передачі сигналів у різноманітних сигнальних шляхах, задіяні до синтезу компонентів КС, диференціації структури ліпідних шарів, до процесів морфогенезу і брунькування, статевого процесу, тощо [304–306]. Синтез білків, складових ЦПМ, тісно пов'язаний із синтезом ліпідів, адже останні визначають активність мембранних білків, їх локалізацію, стабільність, доступ до олігомерних комплексів, транспорт через мембрану, сигналінг, тощо [307, 308]. В той же час білки визначають асиметричність розподілу ліпідів в мембранах, утворення ліпідних рафтів (від англ. «rafts»), тощо [309, 310]. Зважаючи на таку двосторонню взаємодію між білками і ліпідами, не дивно, що вони мають спільні або ж подібні транспортні системи доставки до ЦПМ через структури ендоплазматичного ретикулуму, і, відповідно, спільні регуляторні механізми [311].

Етапи біосинтезу компонентів ЦПМ вважаються досить добре вивченими і детально описані в спеціальних оглядах літератури [6, 312–314]. На часі вивчаються сигнальні і регуляторні шляхи, такі як, наприклад, TOR-шлях [315], або ж роль клітинних фосфатаз [316, 317], тощо, які виконують контроль над синтезом окремих компонентів ЦПМ за дії різних стресових чинників [318, 319]. Завдяки цим дослідженням було встановлено, що білки ЦПМ – не єдині структурні елементи, які відіграють різноманітні функціональні ролі

(перенесення іонів і транспорт поживних речовин, передачу сигналів, у процесах проліферації і морфогенезу, тощо). Ліпіди, також приймають участь у вирішенні широкого кола клітинних функцій, виконуючи роль не лише основних структурних елементів клітинних мембран, але й як запасне джерело енергії, а також виконують функції первинних і вторинних месенджерів на сигнальних шляхах, і той факт, що майже 5% генів в еукаріотів кодує білки, які беруть участь у метаболізмі ліпідів, додатково підкреслює їх важливу фізіологічну роль [320]. Дефектність за біосинтезом ліпідів призводить до збільшення чутливості клітин дріжджів до стресових факторів, таких як температура, порушення росту і процесів морфогенезу, тощо [320]. Загалом ліпіди – це органічні сполуки, які розчиняються в неполярних органічних розчинниках і нерозчинні у воді. Відповідно структурі та функціям ліпіди поділяють на вісім класів – жирні кислоти, гліцероліпіди, гліцерофосфоліпіди, стероли та похідні стеролів, сфінголіпіди, пренольні ліпіди, гліколіпіди та полікетиди [313]. Синтез ліпідів виконують структури ендоплазматичного ретикулуму (ЕР), апарату Гольджі, а також мітохондрії. Відповідно, клітина має спеціальні транспортні системи для транслокації ліпідів з місця їх синтезу до зовнішньої ЦПМ і до мембран, які оточують органели, тощо. Зважаючи на значну конститутивність процесів синтезу ліпідів і білків, більшість знань в цій сфері отримано завдяки дослідженням проведеним на клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, як модельному еукаріотичному мікроорганізмі [313].

Основну ліпідну масу ЦПМ представляють жирні кислоти (ЖК), яким довгий час приписували лише структурну роль щодо формування ліпідних шарів, в який вбудовані різні за функціями білки. ЖК можуть бути включені у фосфоліпіди та сфінголіпіди і бути джерелом енергії у вигляді триацилгліцеридів і стеридів [321]. Вони, також, можуть функціонувати як регулятори транскрипції та сигнальні молекули і брати участь у посттрансляційній модифікації білків [313]. Склад ЖК змінюється залежно від умов росту, однак, варіювання відбувається відносно кількісного розподілу між основними ЖК, якими є пальмітолеїнова (C16:1), пальмітинова (C16:0),

олеїнова (C18:1) і стеаринова (C18:0) кислоти. Серед мінорних представників виявляють міристинову (C14:0) і церотинову (C26:0) кислоти, які відіграють важливу функцію у модифікації білків і як компоненти сфінголіпідів та GPI-якорів відповідно [6]. Синтез ЖК *de novo* розпочинається у цитозолі з каталізу ацетил-CoA за участі ацетил-CoA-карбокислази (Acc1p) до малоніл-CoA із подальшою трансформацією його до C12-C16 жирних кислот в комплексі з ацил-CoA за допомогою білкового комплексу синтази жирних кислот (FAS) [314], який складається з 6 Fas1p і 6 Fas2p субодиниць [322, 323]. Подальша трансформація триває у мітохондріях за участі синтази жирних кислот другого типу (FAS II), роль якої, на часі, є не зрозумілою в плані синтезу ЖК (адже дефектність за FAS II не впливає на синтез ЖК в клітинах дріжджів) але має певну роль для виконання функцій самими мітохондріями [6]. Елонгація (подовження ланцюгу за допомогою елонгази *Elo1p*) і десатурація (створення ненасичених груп, за допомогою Δ9-десатурази *Ole1p*) жирних кислот відбуваються у ендоплазматичному ретикулумі [313, 314, 324]. Окрім *Elo1p*, є ще два білки з подібною структурою (*Elo2p* і *Elo3p*), однак, вони, вочевидь, залучені лише до синтезу сфінголіпідів [313].

Вивчення шляхів регуляції синтезу жирних кислот, як не дивно, але знаходиться лише на початковому етапі. Найбільше відомостей щодо активності *FAS1* і *FAS2*, які показали залежність від цілої низки систем регуляції транскрипції: обидва гени ідентифіковані в кластері Ino2/Ino4-регулюємих генів – гени, експресія яких регулюється інозитолом і холіном [325]; активність *FAS1* і *FAS2* регулюється Gcr1, фактором транскрипції, який контролює експресію генів, задіяних у гліколізі; знаходяться під контролем білку Reb1p, який посилює активність РНК-полімерази I; а також активується кіназою Snf1p, яка, поряд із CWI-шляхом (шлях стресу КС) і кіназою PKA, приймає участь у формуванні відповідні на оксидативний стрес [6, 111]. Активність *FAS1* і *FAS2* пригнічується в присутності довголанцюгових ЖК за нез’ясованим механізмом [6].

Відомості, щодо генетичного контролю над активністю елонгаз *ELO1-3 TSC13* і Ybr159w, а також десатурази *OLE1*, обмежені результатами загальних транскриптомних аналізів і вказують лише на залежність активності цих ферментів від особливостей росту клітин і доступності поживних речовин [6]. Активність *OLE1*, вочевидь , перебуває під контролем Hap1p (цинк-залежного фактору транскрипції) за аеробних умов існування, що вочевидь пов'язано із потребою у кисні для виконання процесу десатурації [326]. Окрім того, активність *OLE1* контролюється з боку таких білків ендоплазматичного ретикулуму, як Mga2p і його паралогу Spt23p, однак в даному випадку сигналом для активації транскрипції *OLE1* слугує убіквітування (протеоліз) цих білків, що є досить нетривіальним механізмом регуляції, який, на сьогодні, не відомий для інших живих організмів окрім дріжджів [326].

Синтез **сфінголіпідів** тісно пов'язаний регуляторними механізмами із синтезом стеролів, що, можливо, пов'язано із локалізацією обох метаболічних систем у ендоплазматичному ретикулумі [327], або ж із фізіологічною необхідністю формуванням спільних мікродоменів в ЦПМ , які є високоспецифічними до певних білків, таких як Pma1p (H+-АТФаза P2-типу) [310], або ж із функціональною роллю ергостеролу, накопичення якого зменшує негативний вплив на життєві процеси, що відбувається при дисбалансі синтезу сфінголіпідів (чи має місце зворотній зв'язок на часі невідомо) [328]. Основним сфінголіпідом в клітин дріжджів є церамід, який являє собою комплекс сфінгозину з жирною кислотою (здебільшого C26:0). Церамід, поєднуючись з інозитол фосфатом, запускає синтез діацилгліцеролу [310]. Обидві молекули (церамід і діацилгліцерол) вважають сигнальними на шляхах регуляції росту і перебігу клітинного циклу, синтезу КС і поляризації клітин, ендоцитозу і динаміки актинового цитоскелету, функцій мітохондрій і процесів апоптозу, реакцій на тепловий шок, тощо [310, 329–335]. Неспроможність клітин дріжджів синтезувати церамід чи діацилгліцерол, призводить до загибелі клітин [327]. Дисбаланс синтезу сфінголіпідів в бік накопичення одних з них і зниження пулу інших, підвищує чутливість клітин до кислотного стресу [328],

в той час як надмірне накопичення сфінголіпідів має осмопротекторний ефект [336], а загальне зниження їх вмісту активує HOG-шлях [337], який є основним клітинним механізмом протидії гіперосмотичному стресу. На нашу думку, це може відбуватися за рахунок зміни фізичного стану ЦПМ (її натяжіння) і, відповідно, вказує на ще одну роль сфінголіпідів щодо забезпечення механічної пружності ЦПМ. Синтез сфінголіпідів знаходиться під контролем білкового комплексу TORC2 (від англ. «*Target Of Rapamycin Complex 2*») через фосфоінозитид-PI4,5P(2)-сполучні білки Slm1 і Slm2, які в свою чергу приймають активну участь у формуванні клітинами дріжджів відповіді на тепловий шок [310]. Хоча сфінголіпіди були відкриті більше століття назад, їх надзвичайно важлива роль і значення у житті клітин встановили лише в останні роки.

Стероли відіграють не менш важливу роль у функціонуванні клітинних мембран і розвитку клітини, ніж сфінголіпіди. Делеція генів, які контролюють синтез стеролів (окрім генів *ERG2-ERG6,* які контролюють найвищу ланку трансформації зимостеролу в ергостерол), має летальний ефект. Проте активність *ERG2-ERG6* є також принциповою, адже впливає на чутливість клітин дріжджів до дії факторів стресу [309]. Ергостерол є кінцевим продуктом синтезу стеролів в клітинах дріжджів і найбільша його концентрація зосереджена в ЦПМ де він виконує так звані «бар'єрні» функції [313, 338]. Однак окрім бар'єрної функції, ергостерол залучений до процесів ендоцитозу, стабілізації і регуляції активності мембран-асоційованих білків, визначає фізичні властивості мембрани (її механічні властивості, натяжіння, кривизну), тощо [309]. Разом зі сфінголіпідами стероли формують рафти, мембранні структури високоспецифічні до окремих білків [309, 310]. Синтез стеролів виконується понад 30-ма ферментами і регулюється як на генетичному рівні, так і на рівні метаболітів [309, 313]. Вільні стероли, які можуть утворюватися в результаті такого синтезу, можуть бути цитотоксичними, а тому баланс та регулювання активності синтезу стеролів є дуже важливими [309, 313]. «Зайві» стероли можуть зберігатися в клітинах у вигляді ефірів у спеціальних везикулах

або ж бути виведеними з клітини у формі ацетатів стеролу. Процес ацетилювання і виведення стеролів з клітини сприяє й усуненню пошкоджених ліпідів [313]. Порушення механізмів транспорту стеролів від структур ендоплазматичного ретикулуму до мембрани, одночасно порушує транспорт й фосфоліпідів, що призводить до кількісних змін складових мембрани [338]. Це вказує на існування тісного зв'язку між транспортом цих сполук в клітинах дріжджів.

Контроль над метаболізмом, розподілом і транспортуванням стеролів виконує група ORP-білків (сімейство оксистерол-сполучних білків «O*xysterol-Binding Proteins*»), які також приймають участь у процесах ендоцитозу, формування полярності клітин, тощо [339, 340]. Точний механізм такої регуляції залишається невстановленим, однак ORP-білки є характерними для всіх еукаріотичних клітин і в клітин дріжджів відомі сім таких білків: Osh1-7 [340–342]. Припускають, що поліморфізм цих білків може бути однією з причин розвитку ішемічного інсульту (інфаркту мозку) в людей, що викликає неабиякий інтерес до цієї групи білків [343]. Делеція *OSH1-7* є летальною для клітин дріжджів і хоча б один з цих білків (будь-який) має бути присутнім для забезпечення життєвих процесів в клітинах [341]. Окрім контролю над рівнем стеролу, ORP-білки є сенсорами й фосфоінозитолу, а також задіяні до контролю над синтезом сфінголіпідів, ймовірно через TORC1-шлях, що робить ці білки в цілому регуляторами синтезу ліпідів [342, 344]. Слід зауважити, що фосфоінозитол і фосфатидилінозитол є ліпідними лігандами, і їх біосинтез вважають чи не ключовим у питаннях транспортування ліпідів до мембрани, передачі сигналу через плазматичну мембрану, тощо [345].

Поряд з ORP-білками, в клітинах дріжджів присутні й інші фактори транскрипції, активність яких регулює синтез стеролів – це Upc2p і його паралог Ecm22p, які, окрім безпосереднього впливу на активність генів синтезу ергостеролу, посилюють експресію й ABC-переносників («*ABC transporters*») Aus1p і Pdr11p, які захоплюють стероли з середовища за умови гіпоксії [309]. Окрім того за умов гіпоксії в клітинах дріжджів активується й інший фактор

транскрипції і регулятор гомеостазу стеролів SREBP (від англ. «*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*») Sre1 [319, 346]. Інші ж білки, такі як Atf2p і Say1p, виконують процеси ацетилювання і деацетилювання стеролів і, відповідно, забезпечують детоксикацію і контроль над пулом вільних стеролів. Альтернативний процес «знешкодження» потенціально токсичних вільних стеролів, процес естерифікації, виконують білки Are1p і Are2p (ацил-CoA:стерол-ацилтрансферази), а зворотну реакцію виконують гідролази Yeh1p, Yeh2p і Tgl1p [309]. Усі ці білки розташовані на мембранах ендоплазматичного ретикулуму і активність їх дещо може різнитися залежно від умов існування, так Are1p виконує свої функції в основному за умов гіпоксії, а Are2p більш активний в аеробних умовах.

Очевидно, що клітини дріжджів мають декілька альтернативних шляхів регуляції синтезу і транспорту стеролів, активність яких залежить від умов існування клітин. Таке різноманіття регуляторних процесів може бути обумовленим вимогами адаптаційного процесу, направленими на збереження контролю над синтезом стеролів за будь-яких умов, а це, в свою чергу, в вказує на важливість цих компонентів для життя клітини.

Фосфоліпіди є іншою важливою групою мембранних ліпідів, синтез і деградацію яких виконують фосфоліпази і ліпідні фосфатази [313, 347]. Основним похідним для синтезу фосфоліпідів є фосфатидна кислота, яка, разом з діацилгліцеролом, долучена до синтезу значної долі ліпідів в цілому і є інтермедіатором для синтезу триацилгліцеридів (основних запасних ліпідів, які, як припускають, є джерелом запасної енергії) [93, 348]. Фосфоліпіди мають асиметричний розподіл по внутрішньому і зовнішньому шарам ЦПМ: амінофосфогліцериди, такі як фосфатидилсерин (PtdSer) і фосфатідилетаноламін (PtdEtn), переважно локалізовані у внутрішньому шарі, в той час як фосфогліцериди, такі як фосфатидилхолін (PtdCho) не мають таких обмежень і присутні в обох шарах ЦПМ [320]. Диференційний підхід до розташування фосфоліпідів досягається, вочевидь, активністю ABC-транспортних систем [320] і є вкрай важливим для забезпечення процесів росту

пов’язаних із поляризацією клітин, а також для процесів брунькування, морфогенезу, тощо [305, 349]. Інформації щодо внутрішньоклітинних механізмів контролю над синтезом цих сполук вкрай мало, однак очевидно, що контроль може відбуватися на рівні модуляції ферментативної активності і на рівні експресії відповідних генів. Кандидатами на роль таких регуляторів називають Ino2p, Ino4p і Opi1p [313, 347, 350], які регулюють активність багатьох ферментів CDP-DG-шляху (шлях синтезу фосфоліпідів через цитидиндифосфат і діацилгліцерол) і шляху Кеннеді (шлях біосинтезу фосфоліпідів II), а також є активними учасниками процесів клітинної відповіді на стреси [325]. Регуляція ферментативної активності може відбуватися шляхом фосфорилювання серинових і треонінових залишків білками-кіназами, такими як кіанази A і C, казеїнкіназа II, циклін-залежна кіназа й іншими [313].

Таким чином, незважаючи на значний прогрес у вивченні будови ЦПМ і шляхів синтезу її окремих компонентів, ціла низка питань, щодо їх біологічної ролі, регуляції метаболізму, розподілу в клітинах, тощо, залишаються без відповіді [6, 326, 337]. Тим не менше, порушення біосинтезу ліпідів спричиняє явище, відоме як «ліпотоксичність» (феномен клітинної загибелі в наслідок дисбалансу ліпідів), що, у випадку високорозвинених організмів, призводить до ожиріння і, ймовірно, є причиною щонайменше таких захворювань як діабет та атеросклероз [321]. Не лише вільні жирні кислоти потенційно є токсичними для клітин і клітини виробляють специфічні підходи до нівелювання ефектів цих сполук [6]. Але насичені та ненасичені ЖК, також виявляють проапоптотичні властивості для більшості типів клітин, хоча ефекти їх дії досягаються різними шляхами: цитотоксичність насичених жирних кислот, таких як пальмітинова, ймовірно, зумовлена підвищеним рівнем кераміду та/або активними формами кисню, натомість накопичення олеату, ненасиченої жирної кислоти, сприяє апоптозу через активацію серин/треонінових білкових фосфатаз [321]. Очевидним недоліком у даній сфері досліджень вважать той факт, тощо більшість процесів вивчені за оптимальних умов існування мікроорганізмів із використанням глюкози як джерела вуглецю, що породжує низку питань, що

об’єктивності і регуляції вже встановлених процесів за неоптимальних умов (за умов дії стресів, тощо). Нажаль знання в цьому напрямку вкрай обмежені.

1.2.2.2. Регуляція синтезу компонентів цитоплазматичної мембрани дріжджів за дії факторів стресу

В процесі росту клітин дріжджів відбувається закислення оточуючого середовища, що в свою чергу викликає кислотний стрес. Цей тип стресу пригнічує метаболічну активність і синтез білків, а також посилює синтез насичених ліпідів і ергостеролу для зниження текучості ЦПМ, відбуваються зміни в організації ЦПМ і пов’язаного з нею цитоскелету [105].

За деякими трактовками [98], CWI-шлях (цілісності КС) є основним механізмом формування стійкості толерантності клітин до кислотного стресу, який запускає шлях протеїнкінази С (PKC-шлях) переважно через мембранний сенсор Wsc1p. В свою чергу, пошкодження КС імітує ефекти гіперосмотичного шоку і, відповідно, активує шлях синтезу гліцерину (HOG-шлях). Активація HOG-шляху, підсилює сигнал PKC-шляху і призводить до посилення експресії *SLT2*, яка активує роботу Ca(2+)-каналів. Разом усе це запускає експресію генів, які беруть участь у регуляції клітинного циклу та регенерації КС. Однак, на нашу думку, це досить таки однобокий погляд на процес формування клітинами стійкості до кислотного стресу, який фактично виключає роль плазматичної мембрани. Тим не менше існують чисельні докази того, що одними із захисних механізмів протидії органічним кислотам, таким як оцтова, мурашина і левулінова кислоти, є накопичення ергостеролу і збільшення рівню ненасичених жирних кислот (за рахунок посилення експресії *OLE1* (Δ9-десатурази жирних кислот) і відповідного збільшення пулу олеїнової кислоти) в ЦПМ [351]. Ці ж ефекти мали протилежне біологічне значення при дії коричної кислоти, яка відноситься до ліпофільних кислот [351]. Однак дія ліпофільних слабких кислот, до яких належать також сорбат та бензоат (які використовуються як консерванти у харчовій промисловості), дещо відрізняється від дії інших слабких кислот, а тому й фактори стійкості для них

дещо відмінні [352]. Ліпофільні кислоти здатні пошкоджувати ЦПМ , порушують окисне фосфорилювання, транспорт поживних речовин та ініціюють ендогенне утворення вільних радикалів [352]. За дії сорбінової кислоти, бензоату і деяких інших ліпофільних субстратів відбувається посилення експресії *PDR12,* який кодує АТФ-сполучний (ABC) транспортний білок (для порівняння, експресія цього гену за pH 7.0 значно знижена) [353]. Надекспрсія *PDR12* викликає стійкість до кислот з довгим довжиною ланцюгів, таких як сорбінова кислота, пропіонова і левулінова кислоти, в той час як делеція *PDR12* сприяла стійкості до більш коротколанцюгових кислот, таких як оцтова і мурашина кислоти [354]. Це вказує не лише на двояку роль *PDR12* у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до кислотного стресу, але й на залученість еукаріотичних ABC-транспортних систем, які забезпечують мультирезистентність до антибіотиків [353], також і до протидії кислотному стресу, що може відбуватися за рахунок енергетично-залежного процесу виведення водорозчинних карбоксилатних аніонів з клітини [355, 356]. Однак, в клітинах живих організмів, в тому числі і дріжджів, дуже багато різних ABC-транспортних систем, і для клітин дріжджів виявлений тісний зв’язок деяких з них з метаболізмом ліпідів [320]. Наприклад, такі АТФ-сполучні і транспортні білки, як Aus1p і Pdr11p, виконують захват екзогенних стеролів і монтування їх в структуру ЦПМ, а Pdr5p виконує транспорт фосфоліпідів. Інший АТФ-сполучний транспортний білок, Ste6p, виконує транспорт *α*-фактору (це білок статевого дозрівання в клітин дріжджів [357]). Ці ж транспортні системи визначають й структурні особливості організації ЦПМ, наприклад її поляризованість і відмінності у компонентному складі зовнішнього і внутрішнього шарів, а також залучені до руху ліпідів в межах окремих шарів і зміні їх положення між шарами [320]. Тобто участь ABC-транспортних систем у формуванні стійкості клітин до кислотного стресу лише в черговий раз доводить поліфукнціональність цієї групи трансмембранних білків, роль яких була показана в цілому для адаптації до стресів, детоксикації вакуолей і регуляції функцій мітохондрій [320]. Слід зазначити, що пригнічення

метаболічної активності, яке відзначають за дії кислотного стресу, пов’язують із роботою АТФ-залежних транспортних каналів, які, як припускають, споживають основну масу внутрішньоклітинного АТФ для виведення зайвих аніонів і протонів з клітини [358], однак результати досліджень, до яких апелюють автори цього припущення, вказують не те, що вичерпання енергії не може бути єдиною причиною тимчасової зупинки росту і що клітини, швидше за все, направлено зменшують споживання АТФ за дії сильних стресів в очікуванні кращих умов і, що механізм і справжні причини такого ефекту кислотного стресу ще належить встановити [359].

В цілому ж знання шляхів формування клітинами дріжджів відповіді на дію кислотного стресу на рівні ЦПМ і, відповідно, розуміння механізмів формуванні клітинами стійкості до цього виду стресу, має безліч прогалин, які на часі не мають експериментального підтвердження і представлені лише у вигляді теоретичних припущень.

Іншим не менш важливим і добре вивченим видом стресу є оксидативний стрес. Цьому виду стресу приділено особливо багато уваги зважаючи на значну роль, яку відіграють активні форми кисню в цілому у процесах канцерогенезу [78], апоптозу [360], тощо. Дріжджі *S. cerevisiae* виявилися надзвичайно зручною моделлю для вивчення молекулярно-генетичних аспектів процесу канцерогенезу [361–363], а тому велика частина знань, щодо механізмів дії пероксиду гідрогену на клітини живих організмів виходить саме із результатів досліджень проведених на клітинах дріжджів.

Протягом тривалого часу пероксид гідрогену і активні форми кисню вважали чинниками стресу, здатними руйнувати білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти, тощо. Проте не так давно було встановлено сигнальну роль пероксиду гідрогену, подібну до ролі іонів кальцію, адже ця сполука має безпосередній вплив на редокс статус таких систем як НАД(Ф)Н, аскорбат, глутатіон і тіоредоксин переводячи їх у відповідні окиснені форми і надаючи реактивності білковим SH-групам, що дозволяє регулювати процеси розвитку, проліферації, передачі сигналів, тощо [364]. В свою чергу, редокс статус клітини є одним з

найбільш важливих факторів для забезпечення її життєдіяльності на ряду з pH і іонним складом.

Не так давно було показано, що ЦПМ не є вільнопроникною для молекул пероксиду гідрогену, натомість, очевидно, контролює цей потік за рахунок змін у своєму складі ліпідної складової, або ж за рахунок роботи специфічних транспортних систем, на манер аквапоринів [48, 365]. З іншого ж боку, припускають, що дифузія пероксиду гідрогену через мембрану може відбуватися через пори, які утворюються внаслідок взаємодії конфігураційно змінених окиснених ліпідів [366], що, з одного боку, усуває необхідність присутності у мембрані специфічних транспортних білків, але, з другого боку, не пояснює, яким чином відбувається контроль над потоком, адже потік має збільшуватися пропорційно збільшенню концентрації пероксиду гідрогену. Натомість відмічена здатність клітин дріжджів адаптуватися до пероксиду гідрогену і витримувати надвисокі його концентрації, що не може бути поясненим з позицій пероксидного окиснення ліпідів [2]. Тим не менше, особливості ліпідної складової (а саме вміст ергостеролу) ЦПМ вважають однією з головних причин високої стійкості клітин дріжджів стаціонарної фази до пероксиду гідрогену, порівняно з клітинами на етапі експоненційного росту (етап активного поділу) [365]. З іншого ж боку механічний натяг ЦПМ, викликаний змінами внутрішньоклітинного тургору, корелює з її проникністю для пероксиду гідрогену [367]. Не виключено, що обидва явища пов’язані між собою і натяг ЦПМ визначає вміст ергостеролу, і навпаки.

Точний механізм формування клітинами стійкості до пероксиду гідрогену і активних форм кисню невідомий, однак припускають, що регуляція відбувається за рахунок пригнічення активності RAS-cAMP-PKA шляху, який в нормі блокує експресію генів стресу, а також за рахунок підвищення експресії генів, які кодують антиоксидантні системи клітини [365]. Однак RAS-cAMP шлях контролює багато внутрішньоклітинних процесів пов’язаних із споживанням субстратів і проліферацією клітин [50, 51, 368, 369], а тому

залучений до формування клітиною відповіді на більшість видів стресів і не може вважатися специфічним для оксидативного стресу.

ЦПМ клітин дріжджів є надчутливою до дії осмотичного шоку, як екзогенного, так і ендогенного. Гіпер- і гіпоосмотичний шок порушують процес осморегуляції, що запускає, відповідно, HOG-сигнальний шлях синтезу гліцеролу, який виступає свого роду внутрішьоклітинним осморегулятором, і CWI-сигнальний шлях, який контролює цілісність КС [64, 370], однак це жодним чином не виключає зморщування чи набухання клітин за гіпер- і гіпоосмотичних умов, відповідно [94], що відображається на фізичному стані ЦПМ [371]. З понад 100 мембран-асоційованих білків, виявлених в клітин дріжджів, м'який сольовий стрес (до 1 M NaCl) спричиняє збільшення кількості принаймні 12 з них: білки, які реагують на зміну концентрації солей (Ist2p, Pdr15p, Hxt1p і -5p і два білки Sur7-сім'ї, Fmp45p і YNL194C), білки фосфатного метаболізму Phm7p і ряд білків з невизначеними функціями. Одночасно з цим близько 20 білків досить швидко (вже за 10 хвилин експозиції) виявлялися в значно нижчих концентраціях: це такі білки як H(+)-АТФаза P-типу (Pma1), ABC-транспортери (сімейство PDR-білків (плейотропної стійкості до антибіотиків)), переносники глюкози та амінокислот, білки, що беруть участь у біогенезі КС (включаючи хітинсинтетазу Chs3), тощо. В цілому такі динамічні зміни пов'язують із адаптаційними пристосуваннями клітин, направленими на збереження життєздатності до моменту запуску відповідних транскрипційних процесів, а також показують, що не всі білки однаково реагують на зміну фізичного стану мембрани у зв'язку із зміною тонічності [372]. При сильному гіпертонічному стресі (2 M NaCl) відбувається деполяризація мембрани і її проникність значно знижується (обидва показники, вочевидь, тісно пов'язані між собою), що також вважають адаптаційним механізмом формування загальної відповіді на гіперосмотичний стрес [371]. Припускають, що деполяризація мембрани може відбуватися в результаті вищезгаданого зниження активності мембран-асоційованих протонних насосів, таких як Pma1, а також завдяки різкому збільшенню вмісту ендогенного кальцію, що в свою

чергу спричиняє зміни щодо вмісту ліпідів, тощо [371]. Однак, різке збільшення ендогенного кальцію відмічають, як захисний механізм при гіпотонічному шоці [96] і при кислотному шоці [98], а тому цей шлях може виявитися одним із загальних у формуванні відповіді клітин на стреси в цілому. Більш важливим, на нашу думку, є те, що активність кальцієвих каналів залежить від складу оточуючої фракції ліпідів (фосфоліпідів і стеролів) [96], адже це може бути свідченням того, що саме зміни властивостей ліпідної складової є спусковим механізмом, медіатором і регулятором процесів формування стійкості до осмотичного стресу. На користь цього припущення виступають дані, щодо важливої ролі ергостеролу у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до гіперосмотичного шоку [373]. Окрім того, такий фізичний показник, як текучість ЦПМ, який визначається складом ліпідів, вважають основною сполучною ланкою між ефективністю дії осмотичного шоку і впливом температури [300, 301].

Таким чином, стан ЦПМ, її компонентний склад, ступінь окисненості, величина заряду на поверхні, тощо – усе це впливає на активність і конформаційну цілісність мембрани в цілому і, одночасно з тим, на стан її окремих складових. Майже впевнено можна сказати, що одним з ключових факторів стійкості клітин дріжджів до кислотного, оксидативного, а також лужного [2, 319] стресів є рівень ергостеролу в мембранах. Шлях регуляції гомеостазу ергостеролу (SREBP-шлях) вважають, також, основним регулятором генної експресії за анаеробних умов [374], що є додатковим свідченням на користь надважливої ролі, яку відіграє ергостерол, і відповідно, шлях його біосинтезу в житті клітини.

Здається очевидним, що SREBP-шлях не може бути єдиним механізмом, який забезпечує стійкість до чинників стресу плазматичної мембрани [2], і в цьому ключі виявлено роль низки мембран-асоційованих білків, таких як АТФ-залежні транспортні білки. Однак, досі невирішене питання, чи можна вважати адаптацію до чинника стресу прямою функцією таких білків, чи натомість зміна їх активності є опосередкованим наслідком пертурбацій на рівні мембрани.

В цілому ж різні сигнальні шляхи тісно переплітаються між собою і за дії кислотного чи температурного стресу активуються шляхи формування відповіді на осмотичний шок і оксидативний стрес, за дії оксидативного стресу, запускаються шляхи формування відповіді на температурний шок, і т.д., що ускладнює виявлення специфічних шляхів, мішеней, і сигнальних молекул, які виконують внутрішньоклітинну передачу сигналу для активації експресії відповідних генів і формування захисту.

Таким чином, в огляді літератури представлено аналіз наукової літератури щодо сучасного стану знань з питань взаємодії живих організмів з фізико-хімічними чинниками стресу. Висвітлено екологічну і медико-біологічну роль відносно нового виду стресу, який з кожним роком набуває все більшої ваги, – антропогенного неіонізуючого електромагнітного випромінювання. Показано сучасний стан знань щодо ролі і механізмів біосинтезу КС і ЦПМ при взаємодії живих організмів з чинниками стресу.

Показано, що незважаючи на тісний зв’язок між біологічною дією різних видів стресів, на сьогодні не прийнято розглядати дію різних чинників в рамках єдиної теорії стресу, натомість, дослідники намагаються віднайти специфічні для окремих стресів шляхи. Однак молекулярно-генетичний і метаболічний потенціал усіх клітин є лімітованим за цілою низкою показників, що накладає поліфункціональність на існуючі молекули, молекулярні комплекси і клітинні структури.

Все більш очевидним є те що окрім генів і білків активну участь у сигнальних шляхах приймають також ліпіди. Різноманіття форм ліпідів вражає своїми масштабами і на сьогодні вже відомо кілька сотень різних ліпідів. Це викликає відповідні запитання щодо біологічної ролі і важливості кожного з них. Окрім того, тонка організація ЦПМ, диференціальний підхід до будови її зовнішнього і внутрішнього шарів, тісний зв’язок із апаратом Гольджі і ендоплазматичним ретикулумом, структурами цитоскелету і елементами поверхневих клітинних структур (КС і ПКМ), здатність регулювати активність

білків і виступати джерелом енергії, тощо – все це вказує на існування досить складних для розуміння відносин між структурою і функціями цих органел, які очевидним чином діють в гармонії один з одним для забезпечення процесу життя.

На сьогодні ще вкрай мало відомостей про роль полісахаридів і роль КС в цілому, яку тривалий час вважали структурою жорсткою із функцією бар'єру для високомолекулярних сполук, що запобігає механічним деформаціям і осмотичним пертурбаціям. Проте дослідження останніх років показали, що КС є гнучкою структурою і за рахунок невідомих механізмів забезпечує стійкість клітин дріжджів до широкого спектру стресів.

Показано особливу роль полі(Ф), які тривалий час вважалися виключно запасними сполуками, проте, на сьогодні вже визнана їх поліфункціональність і показана долученість до формування стійкості клітин до стресових чинників в тому числі.

Дослідження молекулярно-генетичних і біохімічних шляхів реалізації дії стресових факторів на рівні структури і біосинтезу компонентів КС та ЦПМ є актуальним для вирішення фундаментальних питань щодо механізмів взаємодії живої матерії з фізичними чинниками, а також питань прикладного характеру з позицій збереження біорізноманіття і охорони здоров'я. Такі фундаментальні знання слугуватимуть підставою для розроблення стратегій при створенні новітніх біотехнологій і для екологічно орієнтованого, нормованого і регульованого в правовому руслі використання антропогенних чинників фізичної природи.

Низка висвітлених в огляді літератури проблемних питань стала основою для формулювання мети і складання відповідних завдань і плану роботи, результати якої представлені в цій дисертації.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2.
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Штами мікроорганізмів і умови культивування

В роботі використано клітини бактерій *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ B-5139, *Clostridium beijerinckii* УКМ B-7806 і *C. acetobutylicum* УКМ B-7807, *Photobacterium phosphoreum* УКМ B-7071, а також дріжджі видів *Candida albicans* клінічний штам і *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України (м. Київ, Україна). Бактерії і дріжджі вирощували на поживних середовищах до досягнення логарифмічної фази росту після чого готували робочі суспензії в концентрації 10^6 і 10^8 кл/мл залежно від умов дослідження.

Штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* дефектні за поліфосфатазами

В роботі використано клітини дріжджів *S. cerevisiae* дефектні за генами, що кодують ферменти метаболізму поліфосфатів (поліфосфатази PPN1 і PPX1). Штами дріжджів отримали з двох незалежних колекцій: з Інституту біохімії і фізіології мікроорганізмів ім. К. Скрябіна РАН, м. Пущіно, Російська Федерація – чотири штами, умовно позначені як CRY (клітини дикого типу: *MAT*a *ade2 his3 leu2 trp1 ura3*) [375], CRN (клітини дефектні за *PPN1*: *MAT*a *ade2 his3 ura3 ppn1Δ*::*CgTRP1*) [259], CRX (клітини дефектні за *PPX1*: *MAT*a *ade2 his3 trp1 ura3 ppx1Δ*::*LEU2*) [375] і CNX (подвійний мутант: *MAT*a *ade2 his3 ura3 ppn1Δ*::*CgTRP1 ppx1Δ*::*LEU2*) [259]. Інший набір штамів був отриманий з Інституту наук про оточуюче середовище при Ягелонському Університеті, м. Краків, Польща: десять штамів з умовними позначеннями від C1 до C10, де штами C1-C3 були дикого типу, штами C4 і C5 мали дефектність за *PPN1*, штами C6 і C7, відповідну дефектність за *PPX1*, штами C8-C10 були із

подвійною делецією обох поліфосфатаз *PPN1* і *PPX1*. Повний перелік штамів наведений в (Додаток 6А).

Гаплоїдні штами клітин дріжджів дикого типу (С1-С3) були отримані з Yeast Knock-out колекції дріжджів [376]. Дефектні за полі(Ф)азами штами дріжджів, в тому числі клітини із подвійною мутацією, були створені безпосередньо для вирішення завдань в рамках даної експериментальної роботи разом з колегами з Ягелонського Університету (м. Краків, Польща). Створені делеційні мутанти містять генетичний маркер стійкості до одного з антибіотиків (генетицину чи нурсотрицину), поміщений у видалену ділянку відкритої рамки зчитування касети KanMX4 позначеною однією або двома послідовностями довжиною 20 mer (штрих-код). Ця касета надавала дефектним клітинам стійкість до генетицину. Заміну касети на іншу (NatMX4), яка надає стійкість до нурсеотрицину (nourseothricin), проводили шляхом гомологічної трансформації. Обидва маркери є нейтральними порівняно з неміченими клітинами дикого типу [377, 378]. Для отримання клітин з подвійною делецією було виділено геномну ДНК з клітин одного з делеційних штамів (PPX1: KanMX4 *альфа*) після чого видалені антибіотичні касети клонували з фланкуючими ділянками специфічного гену (*PPX1*) та проводили гомологічну трансформацію клітин, які містили іншу делецію (PPN1: NatMX4). Таким чином отримані трансформовані клітини з подвійною мутацією були стійкими одночасно до генетицину і нурсеотрицину.

Штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для дослідження індукованого мутагенезу

В роботі використовували набір з чотирьох генетично модифікованих тестових штамів клітин дріжджів *S. cerevisiae* створених для вивчення мутагенного потенціалу досліджуваного фактору [379] і люб’язно наданих д.б.н., проф., завідуючим лабораторією генетики еукаріотів В.Г. Корольовим з Інституту ядерної фізики РАН (м. Санкт-Петербург, Росія). Штам ПГ-60 (МАТа/*α ade1-ade2*) для вивчення індукції мітотичної рекомбінації. Штами ПГ-61 (МАТ*α rad2*) і ПГ-80 (МАТ*α rad54*) для вивчення індукції прямих мутацій.

Штам Т2 (МАТа/*α ade2-192ade2-G45rad2 rad2*) для вивчення індукції мітотичного кросинговеру. Штами ПГ-60, ПГ-61 і Т2 чутливі до УФ-випромінювання, штам ПГ-80 чутливий до *гамма*-випромінювання. Індукцію відповідних генетичних процесів в клітинах дріжджів в наслідок дії досліджуваного чинника оцінювали за зміною кольору колоній з білого на червоний (Додаток 6Б) [228]. Позитивним контролем слугувала обробка суспензій клітин тестових штамів (10^8 кл/мл) УФ-випромінюванням 254 нм. Тривалість УФ-опромінювання для Т2 і ПГ-60 становила 20 сек, для ПГ-61 і ПГ-80 – 120 сек.

Культивування клітин дріжджів

Культивування дріжджів проводили на щільному поживному середовищі YEPD (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 2% глюкоза, 2,5% агар) в термостаті при температурі 28°С протягом 24 годин. Для отримання великих кількостей біомаси, дріжджі культивували на рідкому (без агару) поживному середовищі YEPD на качалках при 200 оберт./хв і 28 °С, до досягнення логарифмічної фази росту. Клітини відмивали від залишків поживного середовища у фосфатно-сольовому буфері (PBS, pH 7,2) шляхом центрифугування 10 хв при 300×g (1000 обертів/хв) і ресуспендували в стерильній дистильованій воді. Відмиті суспензії клітин пропускали через стерильні ватні фільтри товщиною 2,5 см для вилучення агломератів і отримання суспензій клітин з однорідними за морфологією ознаками. Однорідність отриманих суспензій контролювали візуально шляхом мікроскопіювання у видимому світлі при збільшенні х400. Для роботи готували стокові суспензії клітин із концентрацією 10^8 кл/мл.

2.2. Культури клітин ссавців та методи їх культивування

В роботі були використані культури клітин ссавців епітеліеподібного типу і фібробластні:

Фібробластні клітини:

- L-929 – перещеплювальна культура клітин фібробластів мишей.

- ВНК – культура клітин нирки хом’ячка. Морфологія фібробласти.

Епітеліеподібні клітини:

- ПТП – (*англ.* EPT) - перещеплювальна культура клітин тестикули свиней. Морфологія епітеліоподібна.
- MDBK – культура клітин нирки бика. Морфологія епітеліоподібна.
- А549 – культура клітин легеневої карциноми людини. Морфологія епітеліоподібна.

Клітин вирощували в CO_2-інкубаторі в пластикових культуральних флаконах (матраци) при температурі 37°С із використанням поживного середовища №199, до складу якого входить сольовий розчин Хенкса, амінокислоти, вітаміни, компоненти нуклеїнових кислот, холестерин, глутатіон, твін-80 (Виробник Биомед, Росія). Для приготування суспензійної і моношарової форми культур клітин, нарощені на поверхні пластикових культуральних флаконів клітини знімали за допомогою шпателю, відмивали фосфатним буфером (PBS) з pH7,2 від залишків поживного середовища шляхом триразового центрифугування при 300g (1000 обертів/хв) впродовж 2 хв і доводили концентрацію до 10^5 кл/мл. Якість дисоціації клітин в суспензії оцінювали візуально при мікроскопіюванні в світлому полі і за необхідності клітини фільтрували через стерильні целюлозні мембранні фільтри для видалення агломератів. Клітини використовували у вигляді суспензій або ж у вигляді моношару на поверхні покривних скелець, або ж в лунках 96-ти лункових планшетів (з полістеролу). Скельця, в свою чергу, поміщали на дно пластикових чашок Петрі і, так само як і планшети, культивували у CO_2-інкубаторі при температурі 37°С протягом 24 годин або ж до формування рівномірного моношару клітин на поверхні. Підготовані таким чином скельця і планшети з моношаром клітин використовували для подальших процедур.

В окремих випадках клітини ссавців фіксували розчином глутарового альдегіду (2,5% розчин в PBS з pH 7,2) і витримували 15 хв. Після чого середовище з глутаровим альдегідом видаляли і до моношару вносили 200 мкл

розчину глутарового альдегіду і витримували 60 хв при кімнатній температурі. По завершенню експозиції, моношар клітин тричі відмивали від залишків глутарового альдегіду за допомогою PBS, кожен раз витримуючи клітини в буфері протягом 15 хв. Підготовані таким чином плашки з фіксованими клітинами ссавців використовували для подальших досліджень.

2.3. Фактори стресу і їх застосування

β-Галактовмісні полісахариди (арабіногалактан, нанобіоконьюгати флавоноїдів і арабіногалактану, галактоманнау, карагінану, а також гідролізовані форми галактоманану і карагінану) люб'язно надані співробітниками иркутского Інституту хімії ім. А.Е. Фаворського СО РАН (м. Іркутська, Росія). В дослідженні використовували водні розчини в концентрації від 5×10^{-3} % до 1%. Клітини бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* обробляли сполуками і вивчали особливості ультраструктури клітин методом просвітлювальної електронної мікроскопії і вміст цукрів в екзополімерному матриксі методом мічених лектинів.

Похідні арилаліфатичних аміноспиртів 1-[4-(1,1,3,3-тетраметил-бутил) фенокси]-3-(*N*-бензил-4-метилпіпериди-ній)-2-пропанолу хлориду (шифр КВМ-204) і адамантану((1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(*N*-бензил, *N*-диметил-аміно)-2-пропанолу хлорид) (шифр КВМ-194). Антимікробну дію КВМ-204 досліджували у діапазоні концентрацій 0,1-50 мкг/мл на прикладі клітин бактерій *E. coli* і *P. aeruginosa,* і клітин дріжджів *C. albicans* і *S. cerevisiae*.

Дію пероксиду гідрогену (в діапазоні від 0,1-120 мМ), оцтової кислоти (20-120 мМ), сорбітолу (0,25-1М) і доксорубіцину (5-100 мкг/мл) вивчали на прикладі клітин дріжджів *S. cerevisiae*. Робоча концентрація клітин дріжджів становила 10^8 кл/мл. Експозиція у водних суспензіях клітин дріжджів тривала 60 хв при 28°С, а у випадку дії в поживному середовищі тривалість експозиції була збільшена до 24 годин. По завершенню експозиції клітини дріжджів відмивали від чинника стресу дистильованою водою і ресуспендували в PBS

(pH=7,2) до вихідної концентрації. Отримані суспензії використовували для подальших аналізів.

Магніточастки заліза (Fe_3O_4) були люб'язно надані для дослідження д.хім.н О.А. Пуд з Інституту біоорганічної хімії НАН України (м. Київ, Україна). Наночастки срібла (Ag_2O), золота (Au_2O), гадолінію/ванадію ($GdVO_4$) і церію (CeO і CeO_2) були люб'язно надані для дослідження к.б.н. Н.М. Жолобак з Інституту мікробіології і віруссології НАН України. Наночастки використовували в концентраціях 0,1-10 мкМ. Наночастки додавали до клітин клостридій і через рівні проміжки часу відбирали аліквоти для вивчення методом просвітлювальної електронної мікроскопії.

Джерелом неіонізуючого електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону (РЧ-ЕМВ) слугували генератори, які мають широке використання в лікувальній фізіотерапевтичній практиці: апарат для ДВЧ-терапії "УВЧ-62" (№ 3201, СРСР); апарат для СМВ-терапії «Луч-11» (№543, РФ), апарат для резонансної терапії "MRTA-02" (№ 00533, «Радмір», Україна).

- УВЧ-62 – генератор ДВЧ-хвиль (дуже високої частоти) метрового діапазону, частотою 40,68 МГц, потужністю випромінювання 15 Вт та 30 Вт, електричною напругою 27,5 В/м, магнітною напругою 22 А/м. Цей генератор затверджений ДГСТ до використання у медичній практиці (для проведення ДВЧ-терапії);
- Луч-11 – генератор УВЧ-хвиль (ультра високі частоти) сантиметрового діапазону, з частотою випромінювання 2450 МГц, потужністю 15 Вт;
- MRTA-02 – генератор НзВЧ-хвиль (надзвичайно високі частоти) міліметрового діапазону, з частотою випромінювання 57-62,5 ГГц і потужністю випромінювання 10^{-4} Вт.

Для моделювання РЧ-ЕМВ стандарту цифрових систем зв'язку DCS-1800 була використана лабораторна опромінююча система (ОС-1800), встановлена в безлунній радіочастотної камері Інституту громадського здоров'я ім. А.Н. Марзєєва Національної Академії медичних наук України (Київ,

Україна). Схема ОС-1800 і основні її елементи представлені в Додатку 12. Джерелом випромінювання служив діючий канал системи стільникового зв'язку стандарту GSM-1800 (DCS-1800) №841 (частотою 1871 МГц) люб'язно наданий ПрАТ «Київстар» (м. Київ, Україна). Рівні щільності потоку енергії (ЩПЕ) електромагнітного випромінювання становили 0,1, 2,5 і 10 Вт/м^2. Експозиція тривала по 7 годин/добу, від 2 днів до 6 тижнів (5 днів/тиждень).

Процедуру опромінення клітин дріжджів РЧ-ЕМВ (окрім стандарту GSM-1800) проводили у стандартизованих умовах. Використовували водні суспензії клітин дріжджів (10^8 кл/мл), по 1 мл в мікропробірках з поліпропілену, при 25±0,5 ºС. Експозиція 30-60 хв.

У випадку вивчення дії РЧ-ЕМВ стандарту GSM-1800 клітини дріжджів опромінювали безпосередньо на поверхні агаризованого поживного середовища YEPD в пробірках з полістиролу. Температура в приміщенні була в межах 22 ± 1ºС. Пересів клітин на свіже поживне середовище проводили кожні 2 доби.

Дію температури вивчали для порівняння із дією РЧ-ЕМВ, побічним ефектом дії якого може бути нагрів дослідного зразку. Клітини дріжджів витримували на час дослідження при температурі від 28ºС до 46ºС.

УФ-випромінювання з довжиною хвилі 254±10 нм використовували в окремих дослідженнях як генотоксичний чинник і для порівняння із ефектами дії РЧ-ЕМВ.

Визначення коефіцієнту питомого поглинання електромагнітного поля клітинами дріжджів

Значення коефіцієнтів питомого поглинання (SAR, від англ. «*Specific Absorption Rate*») отримували виходячи з показників електричного поля відповідно до формули SAR = $\sigma E^2/2p$ (Вт/кг), де σ - величина провідності (*S*/м), E - електричне поле (В/м) і p щільність органічного матеріалу, який підлягає опромінюванню (кг/м^3). Провідність дріжджових клітин при опроміненні ЕМВ частотою 1800 МГц визначали за допомогою приладу для визначення імпедансу RF impedance/material analyzer E4991A (Agilent, CA, USA). Всі вимірювання

виконували при температурі 22,5 ± 0,05°С. На кожному етапі використовували стерильну дистильовану воду. Величина pH дріжджових суспензій знаходилася в діапазоні 6,33-6,57. Значення провідності були 0,20, 0,25 і 1,17 S/м для штамів *S. cerevisiae* Y-517, CRY і CNX, відповідно. Щільність клітин дріжджів становила 1030 ± 10 кг/м^3. Таким чином, значення SAR для штамів Y-517 і CRY були близькими і знаходилися в діапазоні: 7,5-9,2 × 10-3 Вт/кг, 0,19-0,23 Вт/кг, і 0,75-0,92 Вт/кг при величинах ППЕ 0,1, 2,5 і 10 Вт/м^2, відповідно. Значення SAR для штаму CNX були 4,3×10^{-2} Вт/кг, 1,07 Вт/кг і 4,29 Вт/кг при відповідних значеннях ЩПЕ.

Комплексна дія факторів стресу

Пероксид гідрогену, оцтову кислоту, доксорубіцин, ністатин, сорбітол і РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону поєднували у різних співвідношеннях відповідно до схем розроблених методами планування багатофакторних експериментів за Боксом-Бенкеном і методом центрального композиту. Кількість центральних точок (реплік, тобто зразків з ідентичним співвідношенням досліджуваних факторів) варіювала від 3 до 6. До кожної схеми протоколу додавали контрольні вимірювання на клітинах дріжджів, які не піддавали дії факторів стресу. Опромінювання клітин дріжджів проводили до моменту внесення інших факторів стресу.

Комплексну дію двох факторів вивчали методом повних факторних експериментів. Кожен варіант досліду готували мінімум в трьох повторах. За такою схемою оцінювали вплив РЧ-ЕМВ на величину геномної мінливості за дії інших чинників стресу, чутливість клітин дріжджів до дії УФ-випромінювання, чутливість клітин дріжджів до антибіотиків поліенового і азолового ряду.

Комплексну дію трьох факторів (РЧ-ЕМВ, ністатин і температура) оцінювали за методом Бокса-Бенкена. Температуру використовували як додатковий контроль для порівняння з ефектами дії ЕМВ і виявлення потенційних нетермічних ефектів дії цього чинника. Вплив факторів стресу оцінювали за змінами в складі жирних кислот і стеролів. Експозиція РЧ-ЕМВ

становила 15, 30 і 45 хв, концентрація ністатину 5, 10 і 15 мкг/мл, температура 28°С, 37°С і 46°С.

Комплексну дію чотирьох факторів вивчали на прикладі пероксиду гідрогену, оцтової кислоти, сорбітолу і РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону за планом Бокса-Бенкена. Вплив факторів стресу оцінювали за вмістом цукрів в екзополімерному матриксі і в КС клітин дріжджів, за синтезом стеролів, а також за показником чутливості клітин дріжджів до антибіотиків поліенового і азолового ряду. Схема дослідження включала 25 варіантів поєднання досліджуваних факторів різної концентрації, 6 центральних точок і два додаткові зразки для вивчення дії випромінювання з експозицією 30 хв і 70 хв без дії інших факторів.

Комплексну дію п’яти факторів вивчали на прикладі пероксиду гідрогену, оцтової кислоти, сорбітолу, доксорубіцину і РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону за планом Бокса-Бенкена для п’яти факторів. Вплив факторів оцінювали за зміною оптичних показників клітин дріжджів і відповідні цитоморфологічні зміни клітин дріжджів, які визначали методом просвітлювальної електронної мікроскопії на ультратонких зрізах з клітин.

2.4. Фізіологічні показники росту клітин дріжджів

Для вивчення фізіологічних показників росту аліквоти стокових суспензій клітин дріжджів вносили в скляні колби об'ємом 50 мл, що містили 20 мл поживного середовища YEPD. Робоча, вихідна, концентрація клітин в середовищі становила 10^6 кл/мл. Колби поміщали на качалки і культивували при 250 обертах/хв, при 28 ^oC, протягом 24 годин. Приріст біомаси визначали в г/л абсолютно сухої ваги. Визначали питому швидкість росту, час генерації, врожай, економічний і метаболічний коефіцієнти, а також ефективність споживання фосфору.

Вміст глюкози визначали за допомогою набору реактивів "Глюкоза-Ф" виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», м. Дніпро, Україна, дотримуючись інструкції виробника.

Вміст фосфору в зразках визначали за допомогою набору реагентів для визначення фосфору Фосфор VIS (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», м. Дніпро, Україна) згідно інструкції від виробника.

2.5. Фізичні показники поверхні клітин

Нанотвердість клітинної стінки клітин дріжджів

Клітини дріжджів наносили моношаром на скляну підложку (стерильні, знежирені предметні скельця для мікроскопії) і обдавали потоком теплого (30 °С) повітря протягом 15 хв для забезпечення візуально повного випаровування позаклітинної рідини. Підготовані таким чином клітини одразу ж використовували у дослідженні наномеханічних властивостей: в центральній ділянці клітини здійснювали серію з 10 уколів зондом АСМ в одну точку із покроковим збільшенням максимального навантаження від 1,5 до 15 мкН і реєстрували відповідні глибини проникнення зонда в клітину.

Величину нанотвердості (H) поверхні клітин дріжджів визначали як співвідношення максимального навантаження (F) з боку АСМ-зонду на площу контакту зонду з поверхнею (S): $H = F/S$. Площу контакту (S) розраховували зважаючи на товщину зонду в приповерхневій зоні контакту з поверхню на момент його проникнення вглиб клітини за формулою $S = \pi\left(\tan\left(\alpha\right)(r+h)\right)^2$, де α – половинний кут конуса, r – радіус вістря зонду, h – глибина проникнення зонду в поверхню при максимальному навантаженні.

Величина заряду на поверхні клітин дріжджів (дзета-потенціал)

Заряд на поверхні клітин дріжджів визначали методом мікроелектрофорезу за швидкістю і напрямком руху клітини дріжджів в електричному полі [181].

2.6. Біохімічні показники клітин дріжджів

Дегідрогеназна активність

Активність ферментів дегідрогеназного комплексу визначали за методикою [380] адаптованою для 96-ти лункових планшетів. Для аналізу

використовували дріжджову суспензію концентрацією 10^8 кл/мл. Реакційна суміш для визначення ферментативної активності складалася із 1/15 М фосфатного буферу (pH 7,0), 0,1 М сульфату магнію і 0,1 М глюкози, яка слугувала субстратом для визначення загальної дегідрогеназної активності. Реакцію запускали додаванням 0,5% розчину 2,3,5-трифенілтетразолію хлорид (ТТХ) і витримували при 37 °С протягом 120 хв. По завершенню експозиції до зразків додавали 50 мкл розчину диметилсульфоксиду для перетворення нерозчинної форми формазану у розчинену. Величину активності ферментів дегідрогеназ визначали колориметричним шляхом при 540±10 нм за утворенням формазану і виражали в одиницях оптичної щільності (од.OD_{540}).

Каталазна активність

Активність ферментів каталаз визначали в лізатах опромінених і неопромінених клітин дріжджів за асиміляцією пероксиду гідрогену при 240 нм [381]. Для цього по 300 мкл водної суспензії клітин дріжджів в мікропробірках типу Еппендорф з поліпропілену опромінювали ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 15 Вт, 15 хв і 30 хв). По завершенню експозиції клітини осаджували при 2000 об/хв, 2 хв і ресуспендували в лізуючому буфері 0,1 мМ РРВ (10,7 мг/л K_2HPO_4, 5,24 мг/л KH_2PO_4, pH 6,95). Після додавання кварцового піску зразки гомогенізували на вортексі 5 хв за максимальної швидкості струшування. Гомогенат центрифугували при 14,5 тис. об/хв, 5 хв. Надосад переносили в свіжі мікропробірки типу Еппендорф для визначення каталазної активності. Реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл надосадової рідини до 3 мл суміші, яка складалася з 40 мкМ H_2O_2 в 0,1 мМ РРВ. Рівень каталазної активності визначали за величиною екстинкції реакційної суміші при 240 нм через 60 секунд за формулою $\Delta E = E_{\text{init}} - E_{60\text{sec}}$ і виражали в одиницях на мг білку за одиницю часу (*од/мг/хв*).

Визначення жирних кислот

Метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК) екстрагували методом кислотного метанолізу [382]. Використовували 10^8 кл, які обробляли 1 М метанольним розчином сірчаної кислоти протягом 60 хв при 80 °С. Екстракцію

МЕЖК виконували додаванням 1 мл суміші (1:1 об./об.) гексану і етилового ефіру. МЕЖК висушували і повторно ресуспендували в 200 мкл гексану для аналізу методом ГХ/МС на капілярній колонці HP-5MS (J&W Scientific, Folsom, Каліфорнія, США) за допомогою газового хроматографу Agilent 6890 з мас-селективним детектором 6890N (Palo Alto, Каліфорнія, США). Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення Workstation (Agilent Technologies). Ідентифікацію сполук проводили відносно часу утримання за стандартами бактеріальних МЕЖК (Supelco) та порівнянням мас-спектрів у бібліотеці MS NIST02. Стандартами слугували метилові ефіри пальмітинової кислоти (16:0), стеаринової кислоти (18:0), пальмітолеїнової кислоти (16:1) та олеїнової кислоти (18:1) (Sigma, м. Сент-Луїс, США). Аліквоти (3 нМ/мл) внутрішніх стандартів жирних кислот С21 (генейкозанової) та С23 (трикозанової) (які не виявляються у дослідних зразках) додавали до зразків МЕЖК виділених з клітин дріжджів і використовували для корекції коефіцієнтів і нормалізації даних.

Визначення стеролів

Екстракти стеролів з біомаси дріжджів готували і аналізували за допомогою ГХ/МС відповідно до методики [383]. Для екстракції стеролів використовували суміш диметилформаміду з метанолом (3:1). Аналіз проводили методом ГХ/МС за допомогою газового хроматографу Agilent 6890 з мас-селективним детектором 6890N (Palo Alto, Каліфорнія, США). Внутрішнім стандартом для корекції коефіцієнтів і нормалізації даних слугував холестерол (Sigma, м. Сент-Луїс, США).

Визначення концентрації білків в дослідних зразках

Концентрацію білку в дослідних зразках визначали за зміною кольору зразків при взаємодії із Coomassie G-250 (Детальний протокол в Додатку 13). Аліквоти зразків (по 1 мкл) наносили на хроматографічний папір і після висихання папір із зразками ретельно змочувався ацетоном і повторно висушувався. Після цього папір із зразками покривався розчином Coomassie G-

250 на 5 хв із наступною відмивкою водою. Стандартом слугували розчини бичачого сироваткового альбуміну (БСА) відомої концентрації.

Аналіз білків клітин дріжджів: загальний білок, білки клітинної стінки

Загальний білок з клітин дріжджів виділяли методом лужного гідролізу клітин дріжджів в 0,4 М NaOH з послідуючою обробкою в SDS-PAGE буфері [384]. Ми не застосовували етап обробки клітин розчином 2,0 М LiAc, як зазначено в протоколі, адже, за результатом попередньо проведених нами досліджень, така процедура не мала суттєвого впливу на результат.

Білки клітинної стінки виділяли з фракцій КС для чього попередньо проводили фракціонування клітин дріжджів і очищення фракції КС згідно протоколу [385]. Інгібітором протеіназ слугував 1 мМ розчин PMSF (флуорид фенилметансульфонилу). Виконували механічне руйнування клітин дріжджів струшуванням суспензій із скляними кульками діаметром 0,4-0,5 мм при 3500 обертів/хв на вортексі MSV-3500 (BioSan, Латвія), при 4°С, цикли струшування тривали 1 хв, інтервали для охолодження 1 хв. Якість руйнування оцінювали візуально при мікроскопіюванні зразків і вважали достатнім при досягненні 95% рівня руйнування клітин.

Електрофорез білків

Екстракти білків розділяли за молекулярною вагою методом вертикального денатуруючого гель-електрофорезу (SDS-PAGE) [386]. В разі необхідності виконували попередньо процедуру преципітації білків і залежно від концентрації білків в екстрактах використовували один з методів: за допомогою трихлороцтової кислоти, ацетону, метанолу, або ацетонітрилу [386]. Візуалізацію білків в гелі виконували за допомогою фарбування Coomassie G-250 (0,02% розчин) відповідно до протоколу [387] або за допомогою Coomassie R-250 відповідно до протоколу [388]. Візуалізацію білків в зразках отриманих з КС клітин дріжджів виконували методом фарбування нітратом срібла за протоколом [389].

Визначення вмісту цукрів в клітинній стінці і позаклітинному матриксі

Метод газової хроматографії мас-спектрометрії (GC/M)S використано для вивчення вмісту цукрів в кислотних гідролізатах КС за методом [390]. Гідроліз фракцій КС клітин дріжджів виконували за допомогою концентрованої сірчаної кислоти впродовж 3-х годин за кімнатної температури. Внутрішнім стандартом слугувала фукоза (0,3 мг/мл).

Метод лектинів мічених колоїдним золотом використано для вивчення вміст цукрів в КС і ПКМ. Використовували лектини конканавалін А (*ConA* із вуглеводною специфічністю до *D*-манози/*D*-глюкози і *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну (GlcNAc)), лектин пшениці (*WGA* специфічний до GlcNAc і *N*-ацетилнейрамінова кислота (NANA)), лектин сої (*SBA* специфічний до *N*-ацетил-*D*-галактозамін (GalNAc) і *D*-галактоза), чечевиці і гороху (*LCA* і *PSA*, відповідно, обидва специфічні до *D*-манози/*D*-глюкози), картоплі (*STA* специфічний до GlcNAc) і квасолі (*PHA* специфічний до GalNAc). Відносний вміст моноцукрів розраховували наступним чином:

D-маноза, D-глюкоза = *LCA* + *PSA*

α-D-маноза, *α*-D-глюкоза = *ConA* - *STA*

D-галактоза = *SBA* - *PHA*

N-ацетил-D-глюкозамін = *STA*

N-ацетил- D-галактозамін = *PHA*

Сіалова кислота = *WGA* - *STA*

Кількість мічених лектинів, зв’язаних в ПКМ, який утворюється навколо клітин дріжджів, визначали шляхом прямого підрахунку наночасток золота на одиницю площі (од./мкм^2) на цифрових зображеннях, отриманих методом просвітлювальної електронної мікроскопії.

Відносну кількість лектинів жорстко зв’язаних із структурами КС дріжджів аналізували за зміною оптичної густини при довжині хвилі 492±10 нм. (Вказана довжина хвилі була обрана зважаючи на результати попередніх досліджень з визначення оптимальних умов для даного аналізу: Додаток 9).

Визначення довжини клітинних поліфосфатів

Довжину ланцюгів полі(Ф) визначали в екстрактах з клітин дріжджів, а також в екстрактах з фракції КС [9]. Фракцію КС виділяли як це описано вище відповідно до протоколу [385]. Визначали луго-, соле- і кислоторозчинні фракції. Довжину полі(Ф)-ланцюгів визначали шляхом розділення екстрактів методом вертикального гель-електрофорезу.

2.7. Вивчення адгезивних властивостей клітин дріжджів до біотичних і абіотичних поверхонь

Адгезія до клітин ссавців: Клітини дріжджів (по 180 мкл, 10^7 кл/мл) додавали до моношару клітин ссавців у 96-ти лункових плашках, до яких попередньо вносили 20 мкл розчинів блокаторів адгезії або ж дистильована вода, як негативний контроль. Співвідношення клітин дріжджів до клітин ссавців в робочих зразках становило 100 : 1. Після акуратного перемішування шляхом струшування зразки поміщали в термостат на 60 хв при 37 °С із періодичним струшуванням. По завершенню експозиції зразки обережно ресуспендували, проводили серію розведень з верхньої фракції, яка містила неадгезовані клітини і робили висів на щільне поживне середовище для утворення окремих колоній.

Адгезія до поверхні сплавів металів: Аліквоти (50 мкл) суспензій клітин дріжджів (10^7 кл/мл) наносили на поверхню кобальт-хромових (Wironit, Wirobond 280, Gialloy PA) і нікель-хромових (Viron 99, Virocer plus, Gialloy CB/N) сплавів металів і витримували 60 хв при 28°С. Сплави представляли собою пластинки розміром 10×10 мм. Основні фізичні характеристики сплавів представлені в Додатку 10. Поверхню пластинок попередньо очищували водою, висушували і стерилізували етанолом 96°. По завершенню експозиції неадгезовані клітини дріжджів змивали і проводили серію серійних розведень для визначення кількості неадгезованих клітин за величиною колонієутворюючої одиниці.

В обох випадках ***величину адгезії*** (I_A, у %) визначали за формулою $I_A = (1 - X_{неадгезовані} / X_{початкова}) \times 100\%$, де $X_{неадгезовані}$ – кількість неадгезованих клітин дріжджів по завершенню експозиції, $X_{початкова}$ – кількість клітин дріжджів у вихідній суспензії.

Інгібіторами міжклітинної взаємодії (при вивченні взаємодії між клітинами ссавців і клітинами дріжджів) були обрані цукри (маноза 2%, глюкоза 2%, сахароза 2% і галактоза 2%), ЕДТА (етилендиамінтетраоцтова кистота) 0,1 мМ, солі кальцію ($CaCl_2$ 0,1 мМ) та заліза ($FeCl_3$ 0,04 мМ и $FeSO_4$ 0,04 мМ). Стокові десятикратні (×10) розчини готували в стерильній деіонізованій воді та зберігали при +4°С, перед використанням розчини прогрівали до температури 37°С. Інгібітори адгезії вносили до клітин ссавців сформованого моношару і витримували 10 хв до додавання клітин дріжджів.

2.8. Блокування транскрипції (пригнічення біосинтезу білків de novo)

Пригнічення процесів біосинтезу білків *de novo* виконували за рахунок блокування процесу транскрипції за допомогою відповідного інгібітора транскрипції – актиноміцина D, який є цитостатичним препаратом з групи протипухлинних антибіотиків, підгрупи актиноміцинів, який пригнічує клітинну проліферацію шляхом утворення стабільного комплексу з ДНК і тим самим порушує синтез РНК. Розчин актиноміцину D 20 мкг/мл в PBS (pH 7,2) вносили до суспензії клітин дріжджів 10^8 КУО/мл і витримували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Для відмивання від актиноміцину D клітини тричі центрифугували при 2000 обертів/хв (500g) по 5 хв кожен раз і ресуспендуючи в PBS до початкового об'єму. З контрольними клітинами проводили такі ж маніпуляції, але без додавання актиноміцину D.

Підготовані таким чином суспензії клітин дріжджів використовували для подальших досліджень адгезії клітин дріжджів до біотичних поверхонь. Для чого аліквоти суспензій клітин дріжджів вносили до моношару клітин ссавців і через 60 хв при 37 °С вміст пробірок акуратно перемішували піпетуванням і

проводили серію розведень з висівом на щільне поживне середовище для визначення числа неадгезованих клітин за КУО, як це наведено вище.

2.9. Визначення чутливості клітин дріжджів до антибіотиків

Диско-дифузійний метод

Суспензію клітин дріжджів у концентрації 10^8 кл/мл наносили суцільним газоном на поверхню агаризованого середовища YPD і розкладали диски з антибіотиками відомої концентрації виробництва ОАО «Науково-дослідний центр фармакотерапії» (м. Санкт-Петербург, Росія): амфотерицин В (40 мкг), ністатин (80 од), ітраконазол (10 мкг), флуконазол (40 мкг) і клотримазол (10 мкг). Результат враховували через 3 доби культивування при 28°С. Чутливість до антибіотиків визначали за діаметром зон затримки росту (в *мм*).

Метод розведень

Ністатин (500тис ОД, виробництва ПАТ «Науково-виробничий центр «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод»», м. Київ, Україна) розчиняли в диметилсуфоксиді (ДМСО) і доводили стерильною дистильованою водою до необхідних концентрацій, так щоб концентрація ДМСО в робочій суспензії не перевищували 0,003%. Суспензії використовували лише свіжеприготованими адже при зберіганні антибіотик втрачав значну частину активності. Розчин антибіотика змішували із водними суспензіями клітин дріжджів щільністю 10^8 кл/мл. Визначали рівень життєздатності клітин за колонієутворюючою одиницею і склад жирних кислот. Додатково оцінювали вплив ДМСО у використаних концентраціях на досліджувані показники.

2.10. Оцінка генетичної взаємодії (fitness-test)

Визначення типу і ступеню взаємодії між парою генів (*PPN1* і *PPX1*) проводили за фенотиповими ознаками росту колоній одиночних мутантів у порівнянні із ознаками росту клітин із подвійною мутацією [391–393]. Фенотиповим показником слугувала площа колоній клітин дріжджів через 24 г росту на поверхні агаризованого середовища YEPD (з 2,5% агару). Площу колоній визначали за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.64 з

цифрових зображень колоній. Тип генетичної взаємодії визначали за величиною генетичної взаємодії (ε) між парою генів (ген *a* і ген *b*) за формулою: $\varepsilon = f_{ab} - f_a \times f_b$, де f_a, f_b і f_{ab} – це кількісні виміри фенотипових показників двох поодиноких і одного подвійного мутанту (див. Додаток 11).

2.11. Аналіз і величина геномної мінливості

Для швидкої оцінки генетичних відмінностей клітин дріжджів і зміну геному в наслідок дії факторів стресу використовували метод генетичного аналізу для виявлення штамових відмінностей. Для цього з клітин дріжджів виділяли ДНК і проводили її ампліфікацію з праймерами до тетрануклеотидного повтору $(GACA)_4$ і до гуанін-збагаченого повтору $(GGG(TGGGG)_2TG)$ в структурі ДНК.

Виділення загальної ДНК проводили з використанням набору реагентів AmpliSens DNA-sorb-C DNA kit (Federal Budget Institution of Science, Central Research Institute of Epidemiology, Москва, Росія), відповідно до інструкції виробника. Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі “BioPhotometer” (“Eppendorf”, Німеччина) при довжині хвилі 260 нм.

Реакційна суміш для ПЛР об’ємом 25 мкл містила 2,5 мкл 10× буферу для ферменту (“Promega”, США), 3 мМ $MgSO_4$, 2 мМ кожного dNTP (“АмплиСенс”, Росія), 15 пМ праймеру, 2,5 U *Taq*-полімерази (“Promega”, США) і 30 нг ДНК-матриці. ПЛР проводили за допомогою термоциклеру MasterCycler personal (“Eppendorf”, Німеччина) з наступними температурними режимами: денатурація при 94°C, 2 хв, 45 циклів – денатурація при 94°C, 30 сек, віджиг праймеру при 52°C, 45 сек, елонгація при 72°C, 2 хв, по завершенню циклів заключна елонгація відбувалася при 72°C, 7 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 1,7% агарозному гелі із використанням Трис-борат-ЕДТА буферу (х0,5). До гелю додавали 0,01% бромистого етидію. Результати візуалізували в УФ-світлі, а отримані електрофореграми обробляли за допомогою програми Gel Imager (“ДНК-технология”, Росія).

2.12. Аналіз цілісності структури ДНК

Розділення ДНК методом гель-електрофорезу: З клітин дріжджів виділяли ДНК за методом [394] оптимізованим за рядом показників (Додаток 12): осаджені і відмиті клітини дріжджів ресуспендували в 100 мкл суміші ТЕ-буферу (pH 7,2) з SDS, а через 60 секунд до суспензії вносили 100 мкл суміші Triton з цитратом натрію і через наступні 60 секунд додавали 200 мкл скляних шариків діаметром 0,4-0,5 мм і 200 мкл суміші Фенол-Хлороформ (у співвідношенні 1:1). Зразки струшували 180 секунд при 3500 обертів/хв. До зразків додавали 200 мкл ТЕ-буферу (pH 8,0) і центрифугували при 14000 обертів/хв, 10 хв. Супернатант із ДНК переносили в лунки 96-лункового планшету і зберігали при -20°С для подальших процедур. Перед гель-електрофорезом зразки змішували з ДНК-буфером для електрофорезу. Гель-електрофорез проводили в агарозному гелі на 0,5х ТБЕ-буфері. Концентрацію агарози варіювали від 0,8% до 1,5% залежно від умов розділення і довжини очікуваних фрагментів. Після проведення електрофорезу гель фарбували бромистим етидієм для візуалізації продуктів ампліфікації в УФ-світлі на трансілюмінаторі (Bio-Rad, США).

Метод лужного гель-електрофорезу (***метод комет***) при pH>13 клітин дріжджів і клітин ссавців проводили за методикою [395]. Суспензію клітин дріжджів в PBS pH 7,2 і суспензію клітин ссавців в PBS pH 7,2 змішували в співвідношення 100 : 1 і витримували 60 хв при 37°С. Позитивним контролем слугували клітини оброблені нітрозометилсечовиною. Негативний контроль – клітини дріжджів і клітини ссавців за оптимальних умов культивування. Зразки фарбували розчином бромистого етидію і вивчали за допомогою люмінесцентної мікроскопії.

2.13. Виділення РНК з клітин дріжджів і синтез кДНК

Виділення РНК: усі процедури проводили відповідно до протоколу [396] при 4°С. Екстракцію РНК проводили за допомогою розчину кислого фенолу. Зразки із виділеною РНК додатково обробляли ДНКазою I при 37°С, 30 хв.

Преципітацію РНК виконували за допомогою льодяного 96% етанолу із 40 мкл 3М ацетату натрію, pH 5,3. Осаджену та відмиту в 70% метанолі РНК розчиняли у 20 мкл води.

Зворотна транскрипція: по 10 мкл підготованих зразків з РНК використовували для синтезу кДНК за допомогою готових сумішей з набору реагентів GenePak RT Core **(**НеоГен, Україна) відповідно до рекомендацій виробника. Синтезовану кДНК зберігали при -20ºС.

2.14. Полімеразна-ланцюгова реакція в режимі мультиплекс

Дизайн праймерів для проведення ПЛР методом мультиплекс проводили відповідно до рекомендацій [397] за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення MPrimer [398]. Були підібрані праймери для 10 генів маркерів стресів (*PDR12*, *RNR3*, *STI1*, *TRX2*, *GSY2*, *PHO84*, *CWP1*, *HSP12*, *GRE2*, *GPD1*), для трьох референтних генів (*SEC21*, *ALG9*, *ACT1*) і двох генів полі(Ф)аз *PPN1* і *PPX1*. Специфічність відібраних праймерів перевірили при їх взаємодії і ампліфікації із ДНК клітин дріжджів (характеристика генів і праймерів наведена в Додаток 13).

Дизайн дослідження: Для кращого розділення продуктів ампліфікації методом гель-електрофорезу праймери поділяли на три групи, кожна з яких містила праймери для чотирьох генів-маркерів стресу і двох референтних генів (Додаток 13). Загальний об’єм реакційної суміші становив 20 мкл (9 мкл суміші праймерів, 10 мкл Мастерміксу («QIAGEN Multiplex PCR Master Mix», Антверпен, Бедльгія) і 1 мкл кДНК). Негативним контролем слугувала деіонізована вода, яку використовували для приготування стокових розчинів праймерів. Ампліфікацію проводили за допомогою приладу ABI 2720 (AppliedBiosystems, США). Температурні режими ампліфікації: денатурація 95°С, 2 хв із наступними 30 циклами (денатурація 15 сек/95°С, віджиг праймерів 30 сек/55°С, синтез 45 сек/68°С), заключний синтез 5 хв. при 72°С. Ампліфіковані зразки зберігали при -20ºС.

Гель-електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 1% агарозному гелі із використанням 0,5× ТБЕ-буферу.

Концентрацію ампіконів (в нг) визначали за інтенсивністю флуоресценції ПЛР-продуктів на гелі відносно маркеру молекулярної ваги з відомою концентрацією ДНК-матриці (детальний протокол див. в Додаток 14).

2.15. Полімеразна-ланцюгова реакція в режимі реального часу і напівкількісна

Рівні експресії генів *FLO11*, *ELO1*, *OLE1* і *FAS1* проводили методом кісної ПЛР в реальному часі із використанням специфічних пар праймерів. Для *FLO11* використовували праймери F: GTTCAACCAGTCCAAGCGAAA і R: GTAGTTACAGGTGTGGTAGGTGAAGTG з довжиною амплікону 67 п.н.; для *OLE1* використовували праймери: F: TGCCAACTTCTGGAACTACTATTGA і R: ACCAGTTTCGTAGATTTCACCTC з довжиною продукту 1520 п.н. Для *ELO1*: F: GGAAAAATTTTTGCCTCGAGA і R: TTGTTGATCTTCTTCTTA-CCACTAG з довжиною продукту 923 п.н. Для *FAS1*: F: ACTCCACAAGACC-ATTAACCCTATC і R: CTTTTCCCAGTTGTCGATGA з довжиною продукту 6141 п.н.

Рівні експресії *UBC6* визначали напівкількісним методом за інтенсивністю флуоресценції ампліконів на гель-електрофорезі (Додаток 15). Використавши наступну пару праймерів: F: GATACTTGGAATCCTGGC-TGGTCTGTCTC і R: AAAGGGTCTTCTGTTTCATCACCTGTATTTGC з довжиною амплікону 272 п.н.

2.16. Мікроскопічні методи дослідження

Люмінесцентна мікроскопія використана для візуалізації клітин дріжджів і ссавців фарбованих водними розчинами флуоресцентних барвників ДАФІ (4',6-діамідинів-2-феніліндол, 1,5 мкг/мл), акридиновий оранжевий (1:10тис.), йодид пропідію (0,1 мг/мл), бромистий етидій (50 мкг/мл). Візуальну оцінку і фотофіксацію зразків проводили за допомогою люмінесцентного

мікроскопу XS-3320 (MICROmed, Китай) облаштованою цифровою фотокамерою Canon D500.

Скануюча електронна мікроскопія використана для вивчення поверхні клітин дріжджів і клітин ссавців. Для цього моношар клітини ссавців на покривних скельцях фіксували за допомогою 2,5% розчину глутарового альдегіду, проводили процедуру зневоднення у градієнті концентрацій метанолу (30% - 100%), вкривали шаром гексаметилдисилазану і залишали до повного висихання. Підготовані зразки використовували для аналізу за допомогою растрового електронного мікроскопу JSM-35C (Японія).

Просвітлювальна (трансмісійна) електронна мікроскопія використана для вивчення ультратонкої субклітинної організації клітин мікроорганізмів шляхом аналізу ультратонких зрізів, для вивчення зв'язування лектинів мічених колоїдним золотом із структурами ПКМ і КС, для вивчення розмірів і особливостей будови наночасток, для вивчення впливу наночасток на цитоморфологічні параметри клітин бактерій. Зразки аналізували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1400 (Jeol, Японія). Прискорююча напруга становила 80 кВ, операційне збільшення ×10-150 тис.

Для ***приготування ультратонких зрізів*** клітин дріжджів, клітини фіксували розчином глутарового альдегіду і тетраокисом осмію з послідуючим зневодненням у серії спиртових розчинів і заливкою в смолу для полімеризації Епон за методикою [399]. Зрізи товщиною 40-100 нм готували за протоколом [400] за допомогою ультрамікротому LKB 8800 (Стокгольм-Бромма, Швеція) і наносили на мідні сіточки без підложки. Зрізи контрастували в розчині уранілацетату і цитрату свинцю [401].

2.17. Проточна цитофлуориметрія

Метод проточної цитофлуориметрії використовували для визначення розмірів клітин мікроорганізмів, для визначення вмісту полярних і нейтральних ліпідів, зміну оптичних показників клітин дріжджів за дії факторів стресу. Використовували прилад COULTER EPIC XL (Beckman, США).

Аналіз розмірів клітин дріжджів і бактерій проводили шляхом фіксації прямого світлорозсіювання (FS). Суспензії клітин мікроорганізмів готували у PBS (pH 7,2).

Оцінку вмісту полярних і нейтральних ліпідів в клітинах дріжджів і клітинах ссавців при їх взаємодії оцінювали шляхом фарбування суспензій цих клітин (у співвідношенні 100 : 1) нільським червоним. Стоковий розчин нільского червоного (1 мг/мл метанолу). Робоча концентрація нільского червоного становила 222 мкг/мл.

Оптичні показники клітин дріжджів вивчали за величинами бічного світлорозсіювання (SS) і флуоресценції на світлофільтрах FL2 і FL3. Ці показники були відібрані як найбільш показові за результатами попередніх досліджень. Безпосередньо перед аналізом до суспензії клітин дріжджів додавали водний розчин пропідію йодиду (10 мг/мл) у співвідношенні 1:100, таким чином робоча концентрація пропідій йодиду в суспензії клітин становила 0,1 мг/мл.

2.18. Морфометрія і аналіз цифрових зображень

Аналіз цифрових зображень електрофореграм білків, ДНК, продуктів ампліфікації генів, а також всі морфометричні аналізи для визначення площі колоній, що утворилися на поверхні агаризованого середовища, морфометричні і RGB-аналізи зображень клітин дріжджів і клітин ссавців профарбованих флуорохромними барвниками – проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.50i (National Institute of Health, USA) яке є у вільному доступі в мережі Інтернет (https://imagej.nih.gov/ij/). Для оцінки морфологічних показників колоній аналізували не менше 300 колоній із кожного зразку. Для аналізу RGB-величин використовували не менше 10 цифрових зображень, які містили клітини з різних ділянок предметного скельця.

2.19. Статистична обробка даних

Дослідження проводили мінімум в трьох повторностях. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакету програм Microsoft

Office Exel 2013 (Корпорація Майкрософт, США) і пакету програм Statistica версія 10 (StatSoft, Ink., США). Визначали середні значення і стандартне відхилення. Різницю між середніми значеннями визначали за *t*-критерієм Ст'юдента і вважали достовірною при $p \leq 0,05$. Достовірність відмінностей між медіанними значеннями визначали за критерієм Маннана-Уітні.

Факторний дисперсійний аналіз з пост-хок аналізом Шеффе і Тюкі використовували для оцінки достовірності штамових відмінностей щодо вмісту в клітинах стеролів, жирних кислот, вмісту цукрів і білків, а також для оцінки профілів експресії і величини адгезії до біотичних і абіотичних поверхонь в нормі і за дії факторів стресу.

Кластерний аналіз даних проводили за критерієм Уорда із використанням евклідової відстані, як показнику ступеню відмінності.

Величину впливу досліджуваних факторів на оцінюваний показник у багатофакторних експериментах оцінювали методом Бокса-Бенкена і методом центрального композиту. Обидва методи не потребують нормальності розподілу ознак і їх представлення в інтервальній шкалі. Оцінювали лінійні і квадратичні (нелінійні) ефекти кожного з факторів окремо і в групі з іншими факторами. Достовірність відмінностей між дисперсіями і середніми значеннями оцінювали за *F*-критерієм Фішера. Розрахунки вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Нормалізацію даних напівкількісної ЗТ-ПЛР проводили за рахунок геометричного усереднення рівнів експресії *housekeeping*-генів [402]. Нормалізованими рівнями мРНК стрес-індукованих генів приймалися співвідношення стрес-індукованих генів до середнього геометричного значення *housekeeping*-генів [403]. Отримані профілі експресії представлені у вигляді теплових карт за допомогою програмного забезпечення Heatmapper (www.heatmapper.ca) із застосуванням методу незваженого попарного середнього (UPGMA) та використанням евклідової відстані, як ступеню відмінності [404].

Величину генетичної відмінності клітин дріжджів відповідно до довжини продуктів ампліфікації загальної ДНК з праймерами до тетрануклеотидних повторів проводили за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення NetWork 4.1.0.8 (Fluxus Technology, Суффолк, Великобританія). Отримані дані представляли у вигляді матриці даних. Відносини між складовими частинами матриці оцінювали за допомогою алгоритму Median Joining (MJ) і представляли у вигляді медіанної сітки. Ступінь порушень ДНК оцінювали по відстані ρ, яка відповідає середній відстані від оригінального генотипу для всіх наступних генотипів, в тому числі гіпотетичних (так звані медіанні вектори, *mv*). Вузли на медіанній сітці відображають матрицю, а їх розмір (пропорційний числу компартментів, включених в конкретний вузол) відображає частоту, з якою кожен варіант зустрічається в матриці. Відстань між двома вузлами пропорційна відстані ρ.

РОЗДІЛ 3.

МОРФОЛОГО-СТРУКТУРНІ І ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЙ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ НА ДІЮ ФАКТОРІВ СТРЕСУ

3.1. Морфолого-структурні особливості клітин мікроорганізмів різних систематичних груп на дію факторів стресу хімічної і фізичної природи

Структурні особливості будови КС і ЦПМ мікроорганізмів різного систематичного положення є важливим і зручним показником для вивчення механізмів впливу різних хімічних і фізичних чинників. Нами проведено аналіз морфологічних і ультраструктурних змін, які мають місце в клітинах мікроорганізмів представників різних систематичних груп з царства про- та еукаріотів за дії хімічних і фізичних факторів стресу проводили із використанням бактерій *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquefaciens* представників роду *Clostridium* і *Photobacterium phosphoreum*, а також дріжджів видів *Saccharomyces cerevisiae* і *Candida albicans*.

Вивчення низки хімічних сполук і фізичних факторів, показало, що вони є індукторами структурних перетворень в КС і ЦПМ. Наночастки металів (наночастки срібла [405] і церію [406], гадолінію і ванадію [407]), а також похідні арилаліфатичних аміноспиртів (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенікси]-3-диметиламіно-2-пропанолу гідрохлорид), [408, 409] і адамантану((1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(*N*-бензил, *N*-диметил-аміно)-2-пропанолу хлорид) [410–412] здатні змінювати величину електронної щільності основних шарів і загальну товщину КС, щільність контакту ЦПМ із компонентами цитоплазми, викликати відшарування і локальні набряки в периплазматичному просторі із відповідною деформацією внутрішньоклітинного вмісту, тощо. Наночастки металів, а також нанобіокомозити галактоманану і карагенану мали вплив на структуру ПКМ клітин бактерій, що відображалося в зміні профілів цукрових залишків ПКМ

(рис. 3.1) [413]. Одночасно з цим, ці ж сполуки не виявляли цитотоксичної дії на клітини дріжджів *S. cerevisiae* за результатом МТТ-тесту і не порушували цілісність ДНК *in vivo*, проте, були здатними посилювати дію інших індукторів клітинного стресу, таких як пероксид гідрогену, оцтова кислота і нітрозометилсечовина [414].

Результати цих досліджень дозволяють припустити, що зміни в складі ПКМ можуть бути причиною збільшення чутливості клітин мікроорганізмів до дії факторів стресу. Це припущення підтверджується результатами проведеного нами аналізу штамоспецифічних особливостей будови екзополімерного матриксу клітин бактерій представників виду *Alteromonas macleodii* [415], який показав, що організація ПКМ досить добре відповідає не стільки штамовим особливостям мікроорганізмів, скільки умовам їх існування. Це може бути

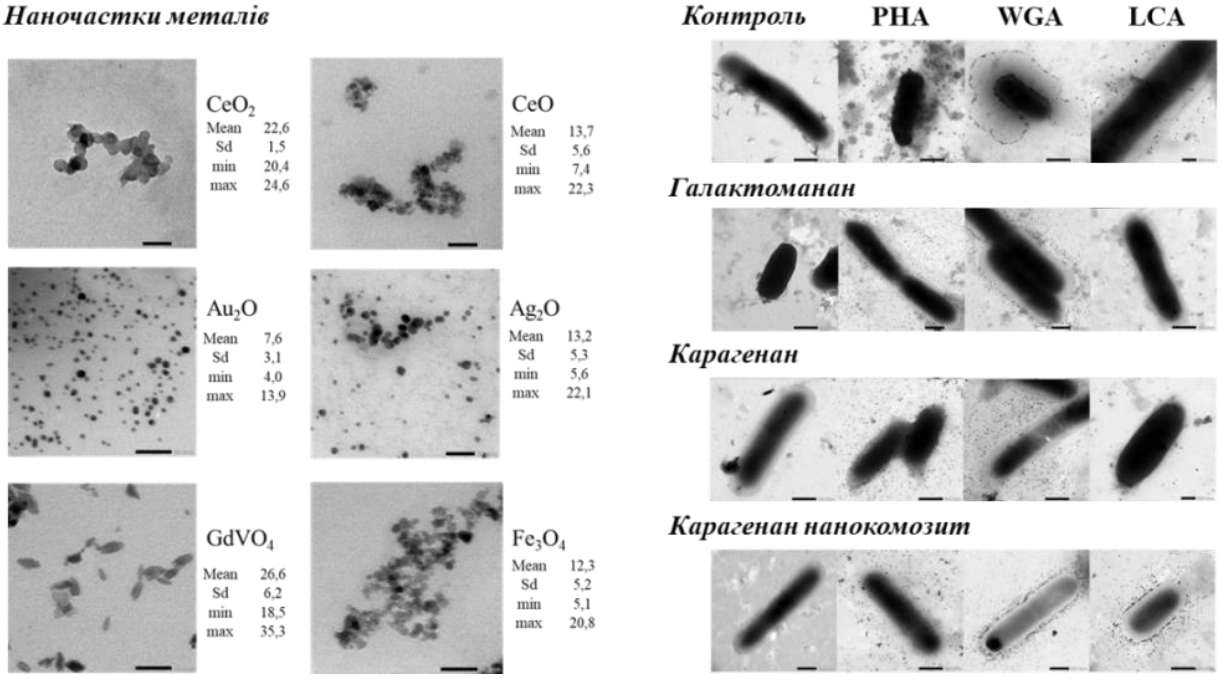


Рис. 3.1. Вплив наночасток і нанобіокомозитів карагенану і галактоманану на морфологію *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ B-5139 і вміст цукрових залишків в позаклітинному матриксі.

Примітки: «PHA», «WGA» і «LCA» – відповідно, лектини квасолі, пшениці і сочевиці, мічені колоїдним золотом, специфічні до *D*-манози/*D*-глюкози, *D*-галактози і сіалової кислоти.

непрямою вказівкою на захисну роль, яку відіграють не лише клітинні оболонки (КС і ЦПМ), але й структури ПКМ у забезпеченні виживання клітин мікроорганізмів за різних умов.

Ефекти дії похідних арилаліфатичних аміноспиртів і похідних адамантану відрізнялася щодо клітин бактерій і дріжджів. Вплив цих сполук на бактерії обумовлював зміни організації КС, ЦПМ і ПКМ (Рис. 3.2А-В).

Дослідження впливу сполук на дріжджові гриби *C. albicans* показало, що адамантанвмісна сполука не здійснює негативного впливу на структуру КС і ЦПМ [412], в той час як дія похідного арилаліфатичних аміноспиртів, напроти, викликала повне руйнування КС клітин дріжджів *S. cerevisiae* (Рис. 3.2Г-Е) [409].

Ефект дії арилаліфатичних аміноспиртів на клітинні КС бактерій, може бути непрямим, як результат ушкодження зовсім інших внутрішньоклітинних структур і процесів. Про це свідчать зміни структури цитоплазми клітин бактерій (Рис. 3.2В):): загальне зменшення її електронної щільності, що може бути результатом деградації цитоплазматичних структур, і зменшенням кількості рибосом. Подібних змін в цитоплазмі клітин дріжджів виявлено не було і першочергові цитологічні ефекти сполуки КВМ-114 реалізувались лізисом КС вже на 3-тю годину культивування зі сполукою (Рис. 3.2Д) із одночасним збереженням відносної цілісності інших внутрішньоклітинних структур, таких як ядро, вакуолі, мітохондрії і структури ендоплазматичного ретикулуму. Це вказує на пряму дію даної сполуки на цілісність КС клітин дріжджів, які здатні зберігати свою життєздатність у вигляді сферопластів [409].

Серед інших чинників стресу був відмічений вплив доксорубіцину (DOX) на структуру КС і ПКМ клітин дріжджів *S. cerevisiae* (Рис. 3.3). Такий ефект може бути пов’язаним із здатністю DOX змінювати текучість ЦПМ [416].

За дії DOX відбувалося зменшення щільності зовнішнього і внутрішнього шарів КС (Рис. 3.3А). Зовнішній мано-протеїновий шар КС виглядав як ворсинки на поверхні КС, в той час як внутрішній шар мав зернистий вигляд. КС при цьому щільно прилягає до ЦПМ і периплазматичний простір не

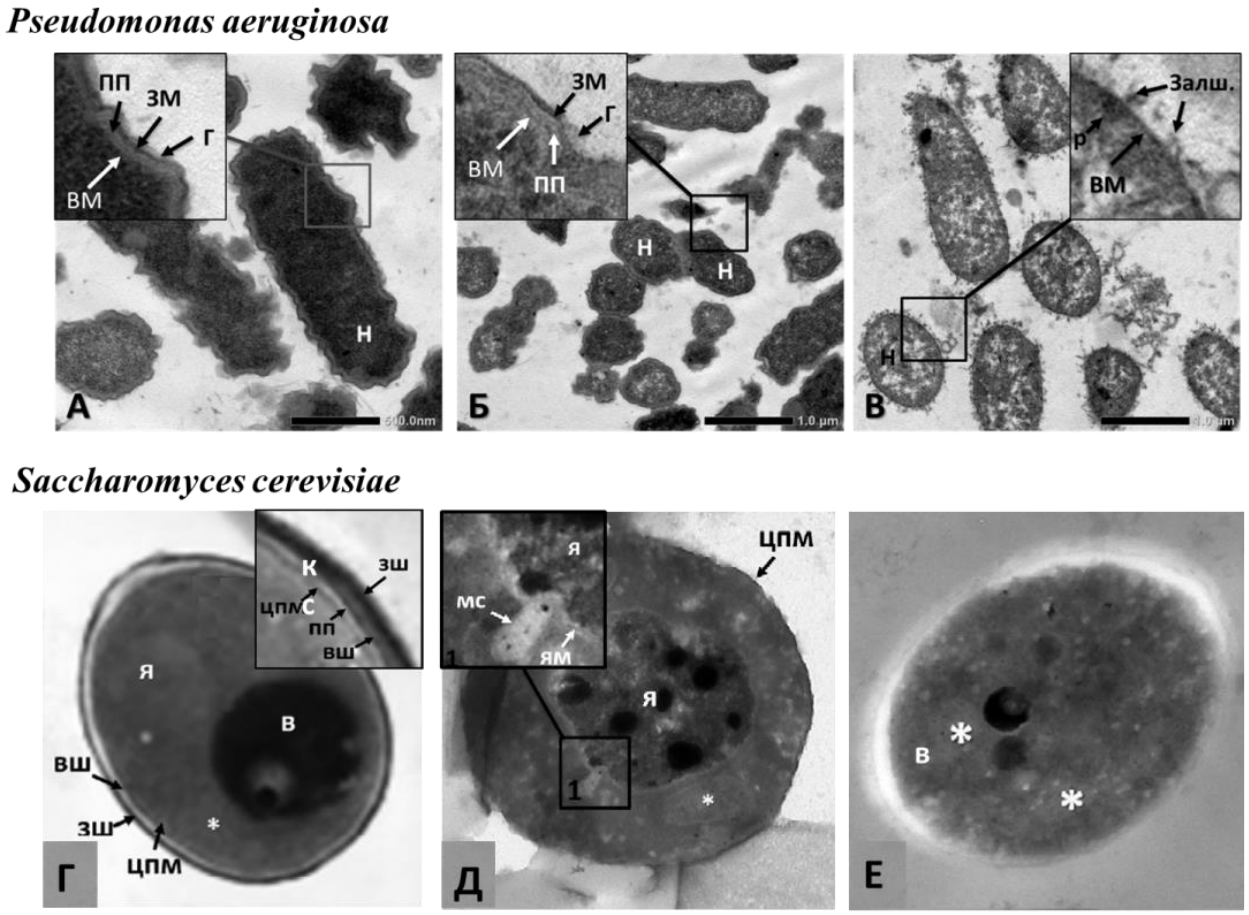


Рис. 3.2. Ультраструктура клітин *P. aeruginosa* (А-В) і *S. cerevisiae* (Г-Е) за дії сполуки КВМ-114. (А і Г) – клітини контрольних популяцій *P. aeruginosa* і *S. cerevisiae*, відповідно. (Б і В) – клітини *P. aeruginosa* через 1 год інкубації зі сполукою в концентраціях 0,5 і 2,0 МІК. (Д і Е) – клітини *S. cerevisiae* через 3 год і 24 год дії сполуки в концентрації 1,0 МІК.

Примітки: «н» - нуклеоїд, «я» - ядро, «цпм» - цитоплазматична мембрана, «ям» - ядерна мембрана, «пп» - периплазматичний простір, «зм» - зовнішня мембрана, «вм» - внутрішня мембрана, «г» - глікокалікс, «р» - рибосоми, «*» - мітохондрія, «в» - вакуоль, «мс» - мембранна структура, «Залш.» - залишки зруйнованої клітинної стінки.

візуалізується. Цитоплазма була просвітленою і гранульованою, що вказує на утворення багаточисельних полірибосомальних комплексів. Ядерний апарат містив ділянки конденсованого хроматину, а в окремих випадках в клітинах були відмічені по два ядра (Рис. 3.3В).

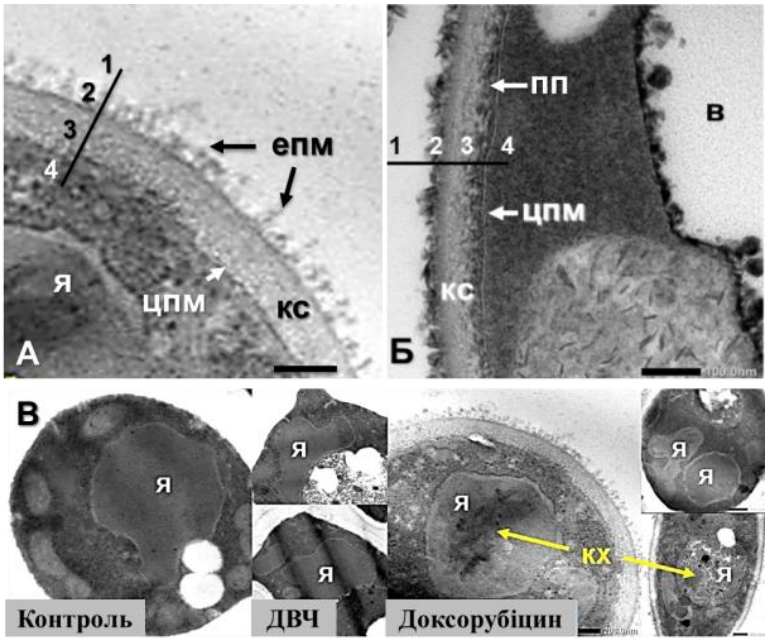


Рис. 3.3. Вплив доксорубіцину на ульраструктуру клітин *S. cerevisiae*. (А і Б) – відповідно, клітинна стінка за дії доксорубіцину і в нормі. (В) – ядерний апарат клітин дріжджів в нормі, за дії ДВЧ-ЕМВ і доксорубіцину. Примітки: «я» - ядро, «пп» - периплазматичний простір, «цпм» - цитоплазматична мембрана, «епм» - екзополімерний матрикс, «кс» - клітинна стінка, «кх» - конденсований хроматин, «1, 2, 3 і 4» - відповідно, позаклітинна зона, зовнішній і внутрішній шари клітинної стінки, цитоплазма.

Подібно до дії хімічних чинників, дія факторів фізичної природи, таких гіпергравітація [417, 418] і неіонізуючі електромагнітні випромінювання радіочастотного діапазону, також викликали фізіолого-біохімічні і структурні змін клітин дріжджів і бактерій [20, 419–421]. Комплексне випромінювання, яке надходить від відеодисплейних терміналів (комп'ютерних моніторів з електронно-променевою трубкою і рідкокристалічною матрицею) впливало на перебіг клітинного циклу і стійкість опромінених клітин дріжджів до антибіотику ністатину [421–426]. Рівень життєздатності клітин дріжджів

знижувався після опромінювання, що надходять від моніторів з електронно-променевою трубкою і навпаки зростав після дії на клітини комплексного випромінювання від моніторів з рідкокристалічною матрицею. При вивченні окремих частот в спектрі РЧ-ЕМВ було виявлено, що дія РЧ-ЕМВ частотою 40,68 МГц [419] викликає утворення навколо клітин дріжджів зовнішнього шару (Рис. 3.4b), компоненти якого активно взаємодіяли з манан-специфічними лектинами (Рис. 3.4e), що вказує на полісахариду природу цієї структури.

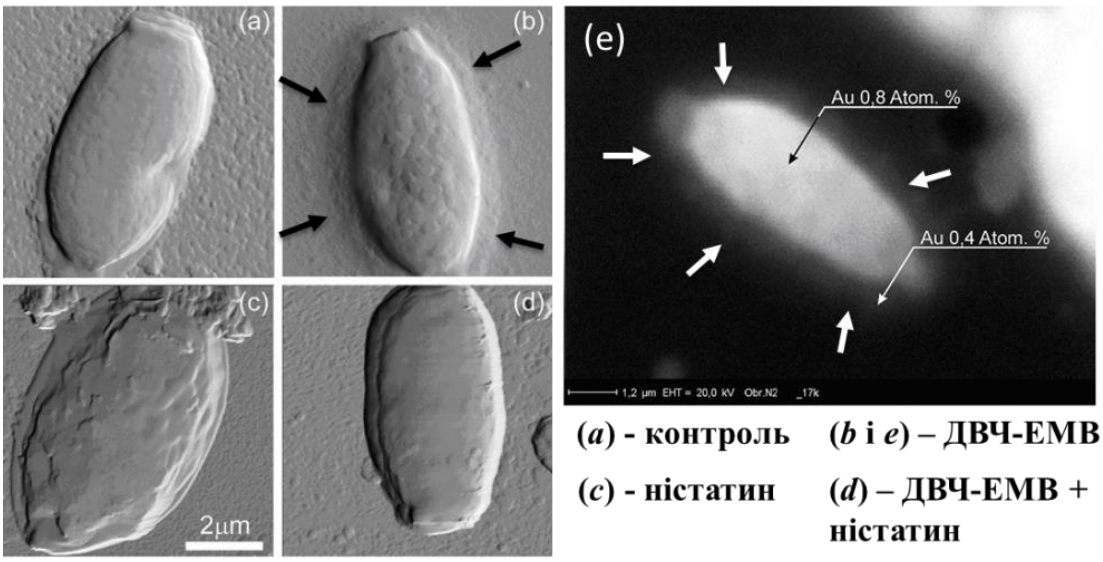


Рис. 3.4. Топографія поверхні клітин дріжджів *S. cerevisiae* опромінених ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц) і оброблених антибіотиком ністатином. (a-d) – атомно-силова мікроскопія, (e) – скануюча електронна мікроскопія опромінених клітин дріжджів після взаємодії з манан-специфічним лектином міченим колоїдним золотом. Стрілочки вказують на новоутворений зовнішній шар.

Зміни ж в структурі клітин бактерій характеризувалися в основному організації периплазматичного простору, який помітним чином зменшувався в наслідок дії ЕМВ міліметрового діапазону частотою 61,22 ГГц (Рис. 3.5). Такий ефект може бути непрямим і пов’язаним зі здатністю РЧ-ЕМВ впливати на активність окремих біохімічних процесів, які задіяні у формуванні периплазматичного простору. В даному випадку вочевидь відбувається пригнічення таких процесів під дією НзВЧ ЕМВ.

Проведені дослідження показали, що ПКМ, КС і ЦПМ є досить чутливими до змін оточуючого середовища і до певних внутрішньоклітинних пертурбацій, викликаних дією хімічних і/або фізичних чинників. Не всі вивчені сполуки можуть мати безпосередній вплив на структуру КС чи ЦПМ і часто ефект можна було вважати опосередкованим через певні внутрішньоклітинні зміни в результаті загибелі клітин за дії досліджуваного чинника. Окрім того, ефекти значною мірою залежали від виду мікроорганізму, для про- та еукаріотичних організмів відмічали різну дію однакових хімічних чинників, що може бути пов'язано із специфікою мішеней, на які направлена дія цих сполук. Окрім іншого, за дії РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону, яка не мало летального ефекту, було виявлено штамові залежності прояву біологічних ефектів.

Це може бути пов'язано із відмінностями у складі КС і ЦПМ досліджених штамів, або ж бути вказівкою на формування різної внутрішньоклітинної відповіді на дію цього чинника. Така особливість реакції клітин дріжджів на дію

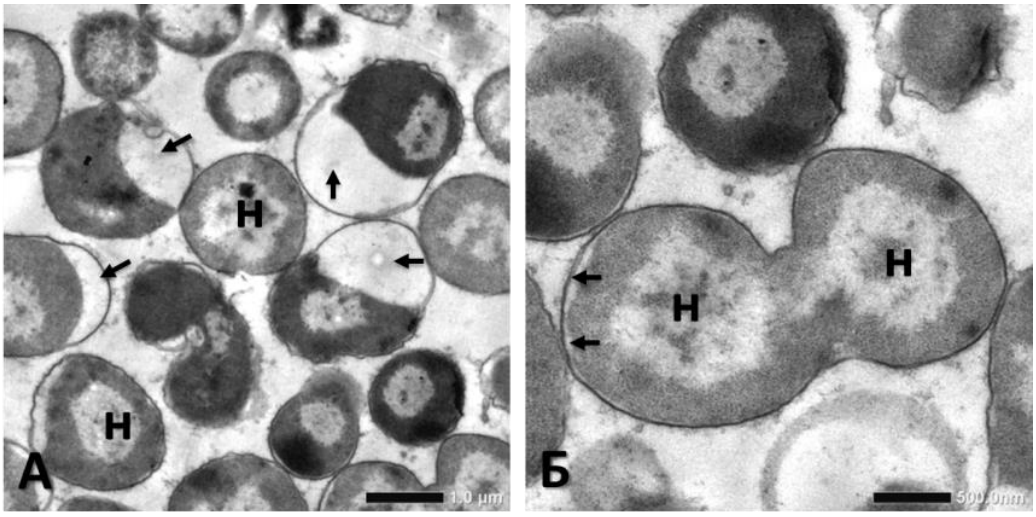


Рис. 3.5. Ультраструктура клітин *Photobacterium phosphoreum* за дії електромагнітного випромінювання НзВЧ-діапазону (61,22 ГГц, потужність 1 мкВт, 30 хв). А – клітини без опромінювання. Б – клітини після дії випромінювання. Електронна мікроскопія, збільшення ×5000 (А), ×20000 (Б). Стрілочками показано периплазматичний простір, «Н» - нуклеоїд.

цього чинника може бути корисною для вивчення механізмів дії РЧ-ЕМВ на біологічні системи і бути використана при створенні біосенсорних систем, тощо [427, 428]. Тому подальші наші дослідження ми зосередили на клітинах дріжджів, які є загальновизнаним модельним організмом для вивчення біологічних процесів притаманних еукаріотичним клітинам [19–21].

3.2. Вплив фізичних природних факторів на фізіолого-біохімічні особливості клітин дріжджів

Клітини дріжджів є природними космополітами і існують в симбіозі з більшістю живих організмів, включаючи людину, хоча серед них зустрічаються й патогенні форми, такі як представники виду *Candida albicans*, які викликають кандидози у людей. Однак, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* можуть бути чудовою моделлю для вивчення особливостей функціонування і формування біологічної відповіді клітинами еукаріотів на зміни оточуючого середовища [429].

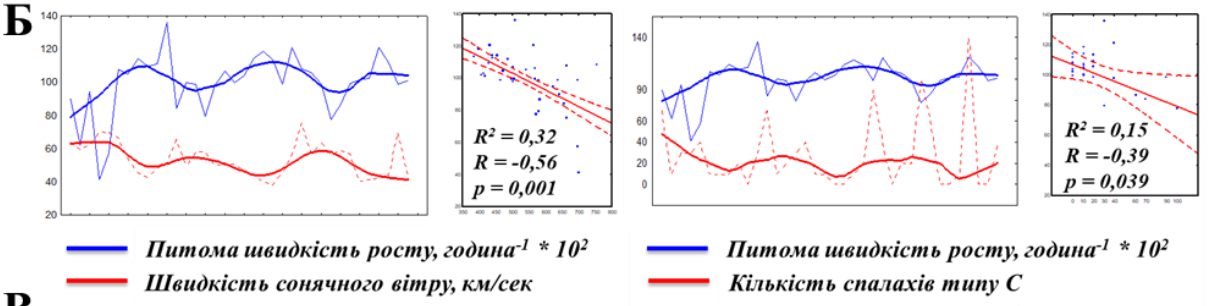
Фізіологічні показники росту клітин дріжджів, навіть в лабораторних умовах, не є величиною константною. Це може бути пов’язано з незначними варіаціями фізичних чи хімічних властивостей поживного середовища. Однак, за результатами наших досліджень [430–432], зміни показнику питомої швидкості росту клітин дріжджів за оптимальних умов культивування, так само як і зміна показнику чутливості клітин дріжджів до дії фунгіцидних антибіотиків проявляє досить високу кореляційну залежність з показниками активності гео-космічних чинників , такими як щільність сонячного потоку (*Solar flux*), швидкість сонячного вітру (*Solar wind speed*), число плям (коронарних збурень) на Сонці (число Вольфа), тощо (Рис. 3.6).

Аналіз відмічених залежностей показав, що величина питомої швидкості росту може бути досить точно (R^2= 0,91) передбачена виходячи з щоденних показників гео-космічної активності (Таблиця 3.1). Модель, яка включає всі вивчені фактори вказує на вагому роль низки чинників, які не виявляють високих кореляційних залежностей, адже мають нелінійний характер впливу –

А

Показник	Середнє ± ст. відх.	Мінімальне значення	Максимальне значення	Шапіро-Вілка *W*-тест	
				W	*p*
Питома швидкість росту S. cerevisiae:					
Питома швидкість росту, $r_{АСБ}$/год$^{-1}$	0.293 ± 0.055	0.134	0.439	0.90	0.004
Фактори Сонячно-Земної активності:					
Сонячний потік, одиниці (10^{-22} Вт/м^2/Гц)	126.8 ± 12.9	96.1	155.7	0.99	0.939
Число Вольфа (число плям на Сонці)	108.3 ± 40.4	41.0	190.0	0.96	0.240
Сонячні спалахи: тип С	35.7 ± 32.4	10	140	0.79	0.000
тип М	13.3 ± 5.2	10	20	0.47	0.000
тип Х	0	0	0	-	-
Геомагнітне поле, A_p-індекс, нТ	15.5 ± 4.9	5.0	28.0	0.94	0.064
Сонячний вітер, км/сек	544.2 ± 98.5	382.0	755.0	0.96	0.192
Атмосферна активність:					
Температура, °С	-1.8 ± 6.0	-15.0	25.0	0.73	0.000
Тиск, мм-Hg	74.9 ± 0.9	73.1	77.3	0.97	0.364
Вологість, %	77.2 ± 12.5	49.0	93.0	0.89	0.002

Б



В

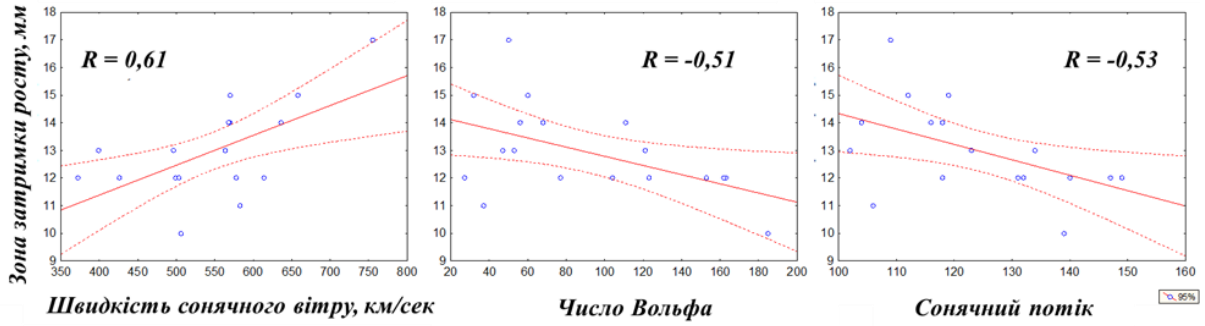


Рис. 3.6. Кореляційні зв'язки між величиною питомої швидкості росту клітин дріжджів і їх чутливістю до антибіотику клотримазолу із показниками сонячної активності. (А) – таблиця досліджених показників. (Б) – графіки зміни показнику питомої швидкості росту і відповідні величини показників сонячної активності. (В) – кореляційні залежності між величиною зон затримки росту і показниками сонячної активності.

це число Вольфа, величина геомагнітної активності *Ap*, кількість спалахів типу *M*, добова температура і вологість [431].

Таблиця 3.1.

Вплив гео-космічних факторів на величину питомої швидкості росту дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 за оптимальних умов культивування.

Показник	Модель 1 R^2= 0,62 adj.R^2= 0,41	Модель 2 R^2= 0,42 adj.R^2= 0,29	Модель 3 R^2= 0,78 adj.R^2= 0,54
Перехват (*Intercept*)	77,46 ± 8,29 [a]	104,21 ± 7,14 [a]	79,26 ± 11,52 [a]
Сонячний потік (L)	-31,69 ± 19,02	–	-60,52 ± 26,26 [c]
Число Вольфа (Q)	-36,00 ± 22,82	–	-44,32 ± 23,29
A_p-індекс (Q)	-55,48 ± 22,02 [c]	–	-63,82 ± 20,66 [b]
Швидкість сонячного вітру (L)	-34,58 ± 11,37 [b]	–	-29,09 ± 11,88 [c]
Спалахи, тип *C* (Q)	18,09 ± 25,43	–	-11,10 ± 29,03
Спалахи, тип *M* (Q)	46,66 ± 19,97 [c]	–	53,36 ± 19,84 [c]
Температура (Q)	–	46,78 ± 30,04	44,02 ± 38,58
Атмосф. тиск (L)	–	-27,02 ± 13,96	-28,44 ± 15,23
Вологість (Q)	–	-69,20 ± 17,71 [a]	-37,68 ± 19,02

Примітки: величину ефектів (середнє значення ± похибка середнього) визначено за результатом багатофакторного дисперсійного аналізу (factorial ANOVA). Моделі №1 і №2 включають, відповідно, геліокосмічні і атмосферні фактори, модель №3 включає всі фактори. * adj.R^2 – величина скорегованого (*adjusted*) коефіцієнту детермінації, «*L*» і «*Q*» – відповідно, лінійні і нелінійні ефекти дії факторів, [a]$p < 0{,}001$, [b] $p < 0{,}01$, [c]$p < 0{,}05$.

Найбільш вагомий вплив на величину питомої швидкості росту мають показники геомагнітного поля Землі (*Ap*-індекс) і сонячного потоку: збільшення величини обох цих показників (що особливо проявляється в дні геомагнітних бурь) відповідає зниженню швидкості росту клітин дріжджів. Ці два показники є взаємопов’язаними, адже високоенергетичні частки, які надходять від сонця, екрануються значною мірою геомагнітним полем, і

збільшення інтенсивності перших викликає значні збурення магнітного поля Землі. Окрім того, самі по собі заряджені частки, частина яких досягає поверхні Землі (особливо в періоди геомагнітних бурь), негативно впливають на живі організми. А тому виявлені закономірності є цілком логічними.

Слід зазначити, що показник сонячного потоку – це так звана величина *F10.7*, яка відповідає довжині електромагнітних хвиль (10,7 см або ж 2800 МГц), які надходять від Сонця і фіксуються відповідними приладами на Землі. В цілому вимірювання можна проводити в широкому діапазоні частот, але ця довжина хвилі найкраще описує активність сонячного потоку. Зважаючи не це, очевидним є той факт, що показник питомої швидкості росту може залежати не від кількості заряджених часток, які потрапляють на Землю, а від загального електромагнітного фону, який створюють природне магнітне поле Землі (яке відповідає величині *Ap*-індексу) і сонячний потік (який являє собою широкий діапазон частот електромагнітного випромінювання). Таке припущення підтверджують результати наших попередніх досліджень, в яких було показано здатність електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону впливати на фізіологічні показники росту клітин дріжджів, на активність біохімічних процесів гліколітичного циклу і циклу трикарбонових кислот, а також викликати стійкість клітин дріжджів (родів *Saccharomyces, Candida* і *Schizosaccharomyces*) до фунгіцидних антибіотиків [14]. Разом, це вказує на те, що природне і антропогенне електромагнітне випромінювання радіочастотного діапазону може бути одним з найбільш вагомих модуляторів життя мікроорганізмів. Всі живі організми, від бактерій до людини, пристосовують власні фізіологічні і поведінкові процеси до коливань абіотичних параметрів оточуючого середовища. В основі здатності живих організмів реагувати на активність зовнішніх абіогенних чинників лежить зміна ендогенних біохімічних процесів, таких як, наприклад, синтез мелатоніну, який визначає циркадну ритміку. Аналіз результатів власних досліджень [433] показав, що процеси, які проходять в клітинах дріжджів, також мають циклічність, яка співпадає з циклами активності Сонця (Таблиця 3.2). Це, в свою

чергу, вказує на можливе існування відповідних ендогенних чинників, які сприймають певні зовнішні сигнали.

Таблиця 3.2.

Циклічність проявів реакції метахромазії фосфатвмісних (волютинових) гранул клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 порівняно з циклами активності Сонця

Періодичність Сонячної активності, *доба* [441]	**Періодичність проявів метахромазії**	
	Косінор аналіз	**Фур'є аналіз**
3,5	-	3,2
5,0	5,0	5,3
7,0	-	7,4
9,0	9,0	10,5
13,5	14,0	13,7
17	-	18
21	22	20
23	-	23
26-29	27	28,5
30	-	-
34	35	33,8-35,9
44±1	47	44 - 46,5
53,2	51	52,9
-	59	59
87	89	84,6
114	108	103-119
120	124	121
152-155	153	153-157

За результатом наших досліджень, кандидатами на роль рецепторів зовнішніх абіотичних сигналів може бути система енергетичного метаболізму

поліфосфатів [434–437]. За даними літератури, активність ферментів поліфосфатного обміну визначає цілу низку життєвоважливих процесів починаючи від експресії генів, структурної організації органел, і завершуючи поведінковими реакціями, вірулентністю, тощо [9]. Зміна ж кольору фосфатвмісних гранул (волютинових гранул) від червоного до синього виявляє залежність із вірулентністю таких мікроорганізмів як коринебактерії, що було пов'язано з активністю Сонця (ефект Чижевського-Вельховера) [435, 436, 438–440].

Результати проведених нами досліджень показали, що реакція метахромазії волютинових гранул може бути вагомим біологічним показником геліокосмічної активності адже проявляє високу кореляційну залежність (до 95%) із інтенсивністю космічних променів (*cosmic rays*) (Рис. 3.7) [434, 438, 442–444]. Зв'язок між цими двома показниками був дуже сильним ($F_{(2)} = 151{,}14$)

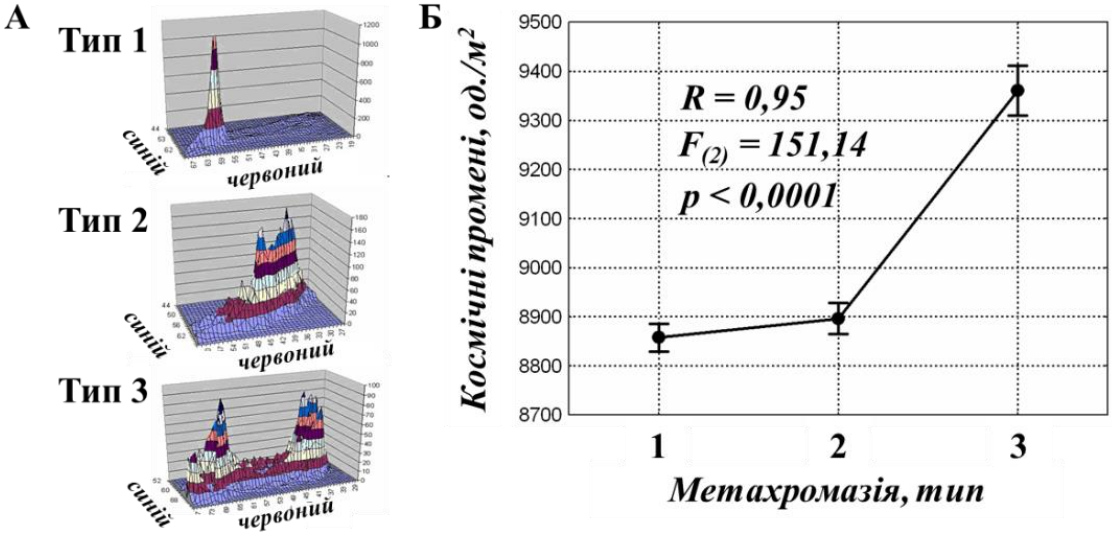


Рис. 3.7. Залежність інтенсивності реакції метахромазії волютинових гранул клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 від величини космічних променів. (А) - типи метахромазії волютинових гранул клітин дріжджів залежно від кольору (співвідношення синього і червоного кольорів на цифрових зображеннях). (Б) – залежність прояву реакції метахромазії від інтенсивності космічних променів (за результатом однофакторного дисперсійного аналізу).

із величиною $p < 10^{-7}$. Для порівняння, зв'язок між метахромазією й інтенсивністю інших факторів сонячної активності був значно слабшим і величина $F_{(2)}$ була вдвічі нижчою і становила 70,99 із $p < 10^{-6}$, а при порівнянні із геомагнітною активністю величина $F_{(2)}$ становила 19,90 при $p < 10^{-4}$. Тобто інтенсивність космічних променів була найбільш вагомим показником для описання і прогнозування типу метахромазії волютинових гранул клітин дріжджів.

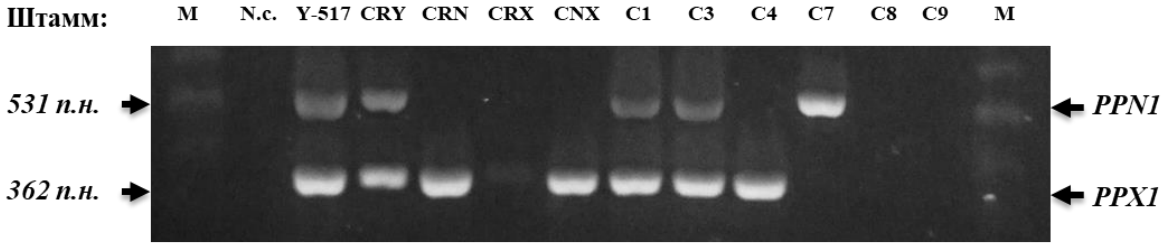
Космічні промені є потоком заряджених часток, інтенсивність яких визначається за кількістю електронів. Вивчення екрануючих властивостей різних матеріалів (сталь, пермалой, вода, віск, тощо) показали, що реакція метахромазії проявляється навіть за таких умов і слабко залежить від типу екрану [445–448]. Однак ще одним непрямим ефектом дії космічних променів на поверхні Землі є зміна величини електромагнітного випромінювання в метровому діапазоні хвиль, яке створюється в атмосфері Землі при потраплянні космічних променів. Тобто фактично, метахроматична реакція може бути результатом як впливу з боку електронів (саме цей кількісний показник ми брали для кореляційного аналізу), так і результатом дії РЧ-ЕМВ метрового діапазону. Це важливо, беручи до уваги вищезазначений факт, що фізіологічні показники росту клітин дріжджів виявляють кореляційні залежності із активністю геомагнітного поля (*Ap*-індекс) і інтенсивністю сонячного випромінювання в сантиметровому діапазоні (величина сонячного потоку за *F10.7*) [431]. А тому, цілком ймовірно, що поліфосфатвмісні структури і власне процес метаболізму поліфосфатів, є саме тим ендогенним сенсором, який здатен сприймати радіочастотне випромінювання в широкому діапазоні частот [439, 449].

Поліфосфати і активність ферментів поліфосфатаз винайдена в усіх органелах і компартментах клітин дріжджів [9], а тому ці структури можуть виконувати регуляторну роль на всіх ланках організації живого і виступати сенсорними молекулами у сприйнятті зовнішніх сигналів на рівні клітинних КС [435, 446, 450–452]. Тому ми зосередили увагу на вивченні ролі цих молекул і

процесу поліфосфатного обміну у сприйнятті абіогенних факторів на прикладі факторів хімічного і фізичного стресу.

3.3. Порівняльний аналіз фізіолого-біохімічних і фенотипових характеристик штамів дріжджів дефектних за поліфосфатазами

В нашому розпорядженні були дві групи штамів дріжджів дефектних за двома основними ферментами полі(Ф)азами (PPN1 і PPX1) відомими на сьогодні для клітин дріжджів *S. cerevisiae*. Перша група штамів (CRY-CNX) отримана від колег з м. Пущіно (Росія), а друга група штамів (C1-C10) створена для вирішення питань даної роботи разом з колегами з Ягелонського Університету (м. Краків, Польща). ПЛР-валідація генетичних дефектів виявила деякі розбіжності між заявленим і фактичним станом геному клітин дріжджів з групи CRY-CNX (Рис. 3.8) адже клітини штамів CRX і CNX, заявлені як дефектні за PPX1 і як подвійний мутант, відповідно, виявилися подвійним мутантом і дефектними за геном PPN1. Зважаючи на такий результат ми використовувати генотипи, виявлені в результаті ПЛР-валідації, як основу при



Штам	Y-517	CRY	CRN	CRX	CNX	C1	C3	C4	C7	C8	C9
Заявлений генотип	*Wt*	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*	*Wt*	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*
Виявлений генотип	*Wt*	*Wt*	*Δppn1*	*Δppn1::Δppx1*	*Δppn1*	*Wt*	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*

Рис. 3.8. ПЛР-валідація делецій клітин дріжджів дефектних за поліфосфатазами PPN1 і PPX1.

Примітки: «M» - маркер молекулярної ваги, «N.c.» - негативний контроль (вода). «Wt» - штам дикого типу, «Δppn1» і «Δppx1» - штами з делеціями генів відповідних полі(Ф)аз PPN1 і PPX1.

інтерпретації отриманих нами даних і вивченні ролі ферментів поліфосфатаз PPN1 і PPX1 в досліджуваних нами процесах.

Фізіолого-біохімічні, морфологічні, а також фенотипові показники, такі як чутливість до антибіотиків були різними для представників цих двох груп за рівноцінних мутацій. Так клітини штамів з групи CRY-CNX відрізнялися за розмірами (Рис. 3.9А) і виявляли різну здатність до росту на рідкому поживному середовищі (Рис. 3.9Б), що могло б бути пов'язано із дефектністю за полі(Ф)азами і, відповідно, роллю цих ферментів в даних процесах. Проте,

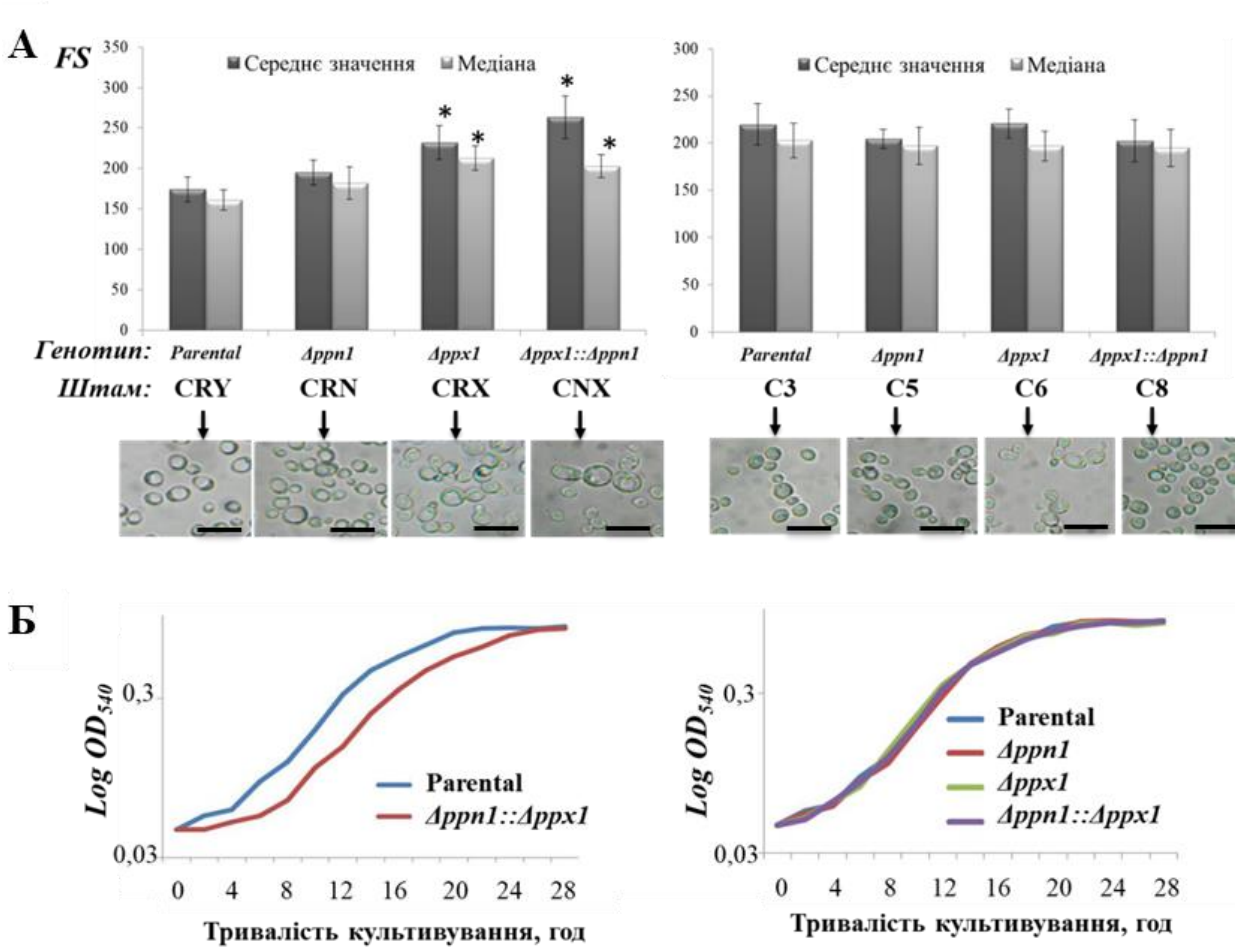


Рис. 3.9. Порівняння клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 з двох незалежних колекцій мікроорганізмів за розміром клітин (А) і ростом на рідкому поживному середовищі (Б).

Примітка: розміри клітин визначали за показником світлорозсіювання (FS) методом проточної цитофлуоримтерії. Шкала на фотографіях 10 мкм, збільшення х1000.

представники групи С1-С10 не мали відмінностей за розміром клітин і характером росту на рідкому поживному середовищі незалежно від генотипу (Рис. 3.9А і Б). Тому дані ознаки не можуть бути загальними для виду, а швидше є штамовими особливостями реакції клітин на дефектність за однією з полі(Ф)аз.

За низкою інших показників, таких як активність ферментів дегідрогеназного комплексу, величина нанотвердості клітин, вміст жирних кислот і чутливість до антибіотиків, так само були відмічені значні відмінності між відповідними (за генотипом) представниками з цих двох груп штамів (Додаток 15).

Тобто, за всіма визначеними показниками, клітини дріжджів з однієї колекції відрізнялися від аналогічних за генотипом клітин дріжджів з другої колекції, що вказує на існування суттєвих штамових особливостей функціонування полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 в клітин дріжджів.

3.4. Вплив стресових факторів на морфолого-структурні і оптичні характеристики клітин дріжджів

Для оцінки стану популяції клітин дріжджів і вивчення особливостей перебігу процесів клітинної загибелі і виявлення ролі полі(Ф)аз в цих процесах, ми використали метод проточної цитофлуориметрії у поєднанні із аналізом ультраструктури клітин дріжджів за допомогою електронної мікроскопії. Визначення оптичних показників клітин профарбованих специфічними барвниками є зручним методом вивчення різноманітних процесів, які протікають в живих клітинах. Однак оптичні показники за будь-яких умов вимагають цитоморфологічного підтвердження виявлених відмінностей і «золотим стандартом» для цього вважається метод електронної мікроскопії.

За оптичними показниками в популяції клітин дріжджів профарбованих йодидом пропідію було виявлено чотири основні субпопуляції (або ж фракції) (Рис. 3.10А). Фракції №1 (Ф1) і №2 (Ф2) відповідають живим клітинам і виявляються при культивуванні за оптимальних умов. Популяція клітин

дріжджів досить чітко розділяється на ці дві фракції, при тому, що вони не пов'язані із клітинним циклом чи поділом, і, вочевидь, є відображенням фізико-хімічних властивостей поживного середовища, адже на різних середовищах відмічається зміщення відсотку клітин кожної з фракцій в одну чи іншу сторону (Рис. 3.10Б). Незважаючи на те, що клітини обох фракцій (Ф1 і Ф2), незалежно від їх відсоткового співвідношення, здатні до формування окремих колоній на поверхні агаризованого поживного середовища, забігаючи наперед, слід зазначити, що максимальне (понад 80%) накопичення клітин у фракції Ф1

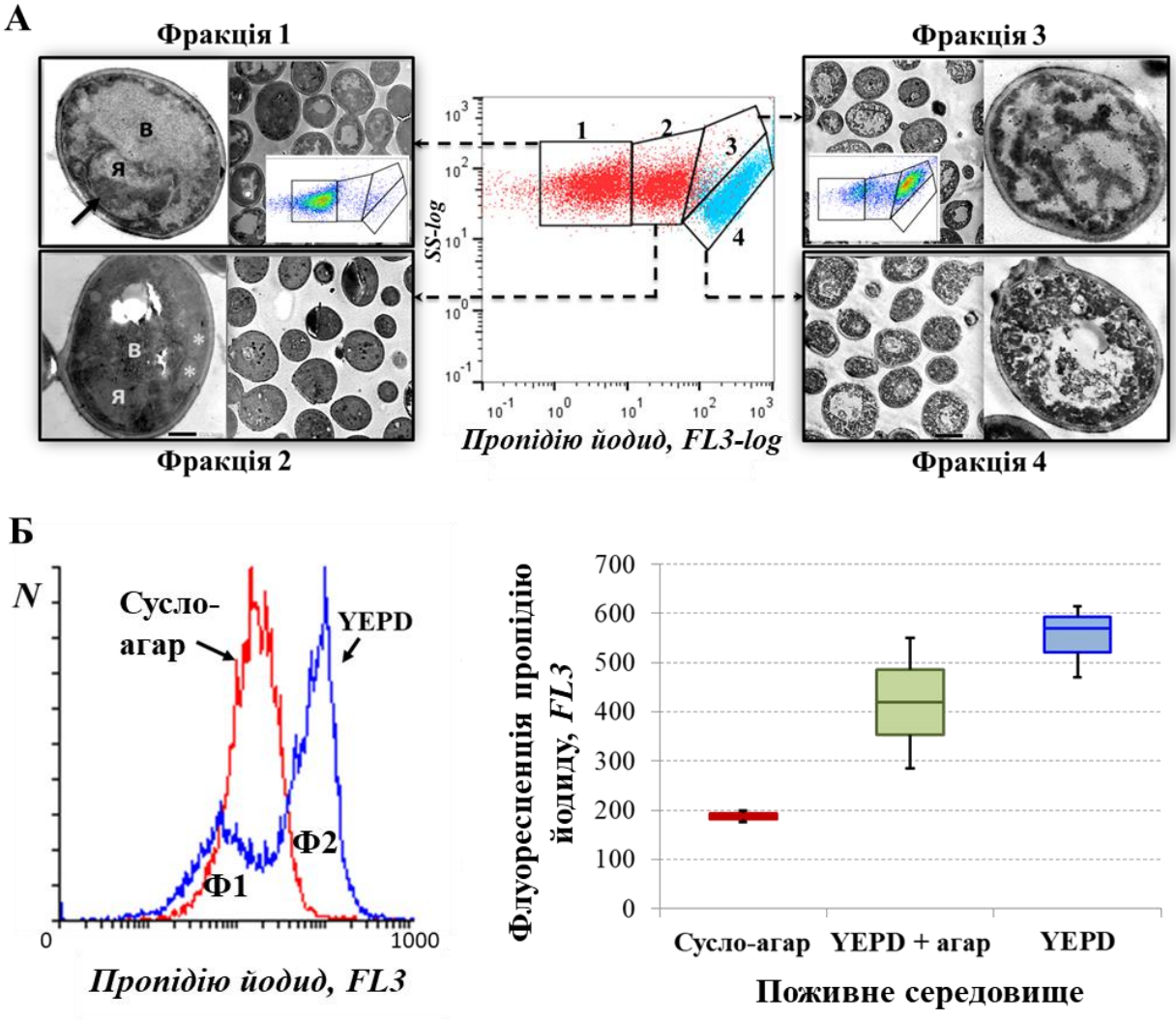


Рис. 3.10. Диференціювання популяції клітин дріжджів за оптичними показниками і особливостями ультраструктурної організації (А). Зміна оптичних показників клітин дріжджів при культивуванні на різних поживних середовищах за оптимальних умов (Б).

(показано на відповідній вставці Рис. 3.10А) відмічали лише за дії комплексу стресів, таких як оцтова кислота і пероксид гідрогену. Зважаючи на це, можна припустити, що відсоток клітин у фракції Ф1 може бути індикатором стресовості оточуючого середовища.

Інші дві фракції клітин були відмічені лише за дії факторів стресу і за оптимальних умов культивування, майже не представлені. Серед цих двох фракцій, фракція №4 (Ф4) має найвищий показник флуоресценції і відповідає мертвим клітинам, адже саме сюди потрапляють клітини вразі впливу на них високої температури (100^{o}C, 10 хв). При висіві на агаризоване поживне середовище, клітини з фракції Ф4, відповідно, не виявляли проліферативної активності і не формували колоній. Фракція №3 (Ф3) досить чітко відображалася на графіках в основному за дії стресів (високої концентрацій оцтової кислоти (1 М) і пероксиду гідрогену (0,1 М)) і знаходилася між фракцією живих клітин (Ф2) і фракцією мертвих клітин (Ф4), проте за оптичними показниками досить чітко від них відрізнялася більш високим показником бічного світлорозсіювання (SS) і дещо нижчим значенням флуоресценції порівняно із мертвими клітинами з фракції Ф4. Клітини з Ф3 вочевидь не здатні до проліферативної активності, адже у випадку коли більшість клітин у популяції знаходяться у цій фракції (як наприклад, штам дефектний за PPX1 в присутності оцтової кислоти і пероксиду гідрогену має до 99% клітин у цій фракції Рис. 3.11В), такі клітини не здатні до утворення колоній на щільному поживному середовищі (Рис. 3.11Б), а тому клітини з фракції Ф3, вочевидь, можуть бути віднесені до мертвих клітин разом із клітинами з фракції Ф4.

Вивчення внутрішньоклітинної будови представників окремих фракцій показало, що клітини, які попадали до фракції 1 (Ф1), мають ознаки формування гетерохроматинових осередків в ядрах, цитоплазма має досить однорідну електронну щільність, а вакуолі позбавлені включень волютину. Формування гетерохроматинових осередків в ядрах клітин дріжджів є ознакою індукції апоптозу. Беручи до уваги той факт, що максимальне накопичення,

клітин з такими цито-морфологічними ознаками відбувається лише за дії стресів, можна припустити, що клітини цієї фракції перебувають у стадії раннього апоптозу, який, на відміну від пізнього апоптозу, є процесом оберненим і за умови потрапляння клітини у нормальні умови проліферативна активність їх відновлюється, що ми й спостерігаємо за КУО. Клітини ж другої

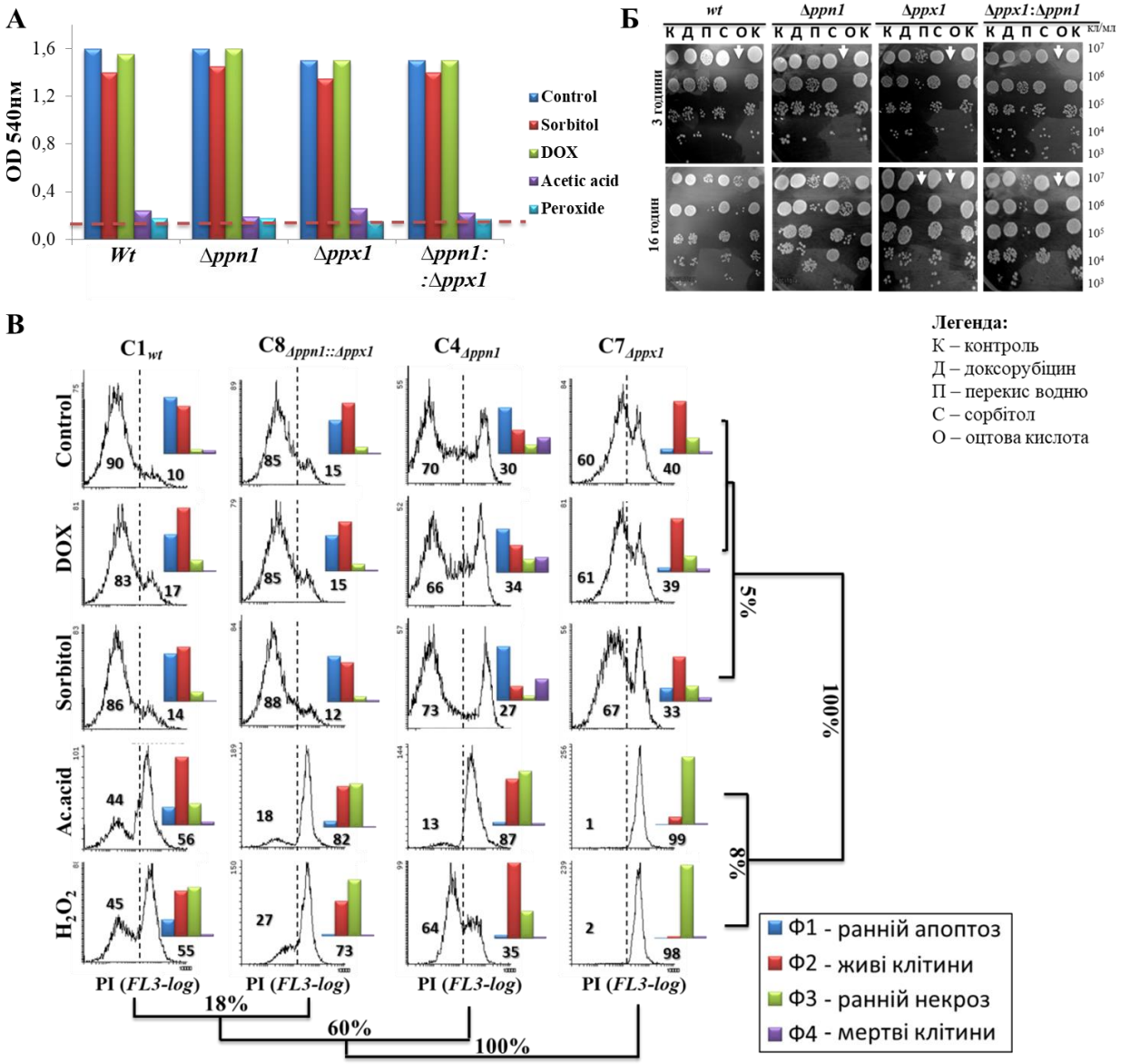


Рис. 3.11. Життєздатність клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 за дії стресових факторів. (А) Зміна показнику приросту біомаси (оптична густина при 540 нм). (Б) – ріст клітин дріжджів на агаризованому середовищі YEPD після дії факторів стресу. (В) – оптичні показники клітин дріжджів після дії факторів стресу.

фракції (Ф2) відповідають живим неушкодженим клітинам, адже в цих клітинах візуалізуються ядро, вакуоль, заповнена чисельними електроннощільними включеннями волютину, мітохондрії і цитоплазма має однорідну електронну щільність і щільно прилягає до КС. Клітини фракції 3 (Ф3), ймовірно можуть бути віднесені до клітин на етапі пізнього апоптозу, або ж раннього некрозу, адже в цих клітинах цитоплазма втрачає однорідність і характеризується наявністю ділянок з високою електронною щільністю в перемішку із ділянками низької електронної щільності. В ядрах візуалізується гетерохроматин, мітохондрії і вакуоль виявляються лише в поодиноких клітинах як видозмінені, безформні осередки оточені мембранами. Має місце формування мембранних структур, які можуть бути результатом розпаду органел, тощо. Клітини фракції 4 (Ф4) – це мертві клітини, в яких досить добре прослідковуються місця попередньої локалізації вакуолей, як внутрішньоклітинні ділянки з низькою електронною щільністю позбавлені цілісної мембрани. Вміст цитоплазми являє собою хаотичну неоднорідну суміш із гранул досить високої електронної щільності. Органели не виявлені.

Беручи до уваги результати трьох методів (цитофлуориметрію, КУО і цитоморфологічні особливості будови клітин) стає очевидним, що оптичні показники клітин дріжджів відображають цитоморфологічні ознаки, відповідно до яких клітини в популяції можна умовно поділити на: живі клітини (Ф2), клітини на етапі раннього апоптозу (Ф1, цей етап є оберненим і за оптимальних умов в клітинах відновлюються проліферативні функції), клітини на етапі пізнього апоптозу/раннього некрозу (Ф3), і мертві клітини (Ф4). Саме такої характеристики ми будемо притримуватися при подальшому аналізі даних щодо впливу стресових факторів на клітини дріжджів дефектних за полі(Ф)азами.

3.5. Стійкість клітин дріжджів до однофакторного стресу

Середовище YEPD вважають оптимальним для росту клітин дріжджів сахароміцетів, і, як було показано вище, найбільший рівень клітин у фракції Ф2

(активно проліферуючі клітини) спостерігається при культивуванні дріжджів саме на цьому середовищі. Через 16 годин культивування у поживному середовищі YEPD приріст біомаси дріжджів уповільнюється і приблизно на 24 годину клітини переходять у стаціонарну фазу росту. Сорбітол (1М) і доксорубіцин (5 мкг/мл) не впливали на показник оптичної густини дріжджових суспензій порівняно із контролем, в той час як оцтова кислота (1 М) і пероксид гідрогену (0,1 М) викликали блокування приросту біомаси (Рис. 3.11А).

За дії пероксиду гідрогену відбувалося пригнічення життєздатності клітин дріжджів на 1-3 порядки в залежності від штаму, яке посилювалося із часом, проте навіть через 16 годин в популяції все ще були присутні клітини здатні до поділу (Рис. 3.11В). Це вказує на те, що пероксид гідрогену поступово пригнічував проліферативну активність клітин і при потраплянні в умови без стресу, здатність клітин до поділу відновлювалася. Однак, ефект мав часову залежність і, відповідно, з часом все менше клітин були здатними відновити поділ.

Серед штамів дріжджів дефектних за полі(Ф)азами, найбільш чутливим до дії пероксиду гідрогену виявився штам дефектний за PPX1, чутливість якого була принаймні на порядок вищою у порівнянні із іншими штамами. За оптичними характеристиками клітини цього штаму більшістю перебували у фракції Ф3. В той же час чутливість клітин дефектних за PPN1 і клітин подвійного мутанта були близькими до контролю. Хоча, слід зазначити, що в клітин дефектних за PPN1 відбувалося незначне збільшення стійкості до дії пероксиду гідрогену, на що вказував й показник Ф2, який був найвищим серед всіх досліджених штамів за дії пероксиду гідрогену.

За дії оцтової кислоти ріст клітин дріжджів повністю зупинявся вже на 3-тю годину (Рис. 3.11В) і клітини переходили у фазу відмирання (Ф3) (Рис. 3.11В). Проте через 16 годин в популяціях клітин батьківського штаму і клітин дефектних за PPN1 відмічали утворення колоній в розведеннях 10^6 кл/мл і 10^5 кл/мл, відповідно. Ймовірно, що серед цих клітин все ж є певна доля таких,

які виявляють стійкість до дії оцтової кислоти і здатні до розмноження навіть за досить екстремальних умов. Доля стійких до оцтової кислоти клітин була невисокою, адже їхню присутність можна було виявити лише в результаті висіву на агаризоване поживне середовище і жодним чином не відображалася на показнику оптичної щільності дріжджових суспензій навіть через 16 годин культивування. Серед клітин дефектних за PPN1 виявилося принаймні на порядок більше клітин стійких до екстремальних значень оцтової кислоти ніж у контролі, в той час як за оптичними показниками цей штам мало чим відрізнявся від подвійного мутанту і мав значно меншу кількість клітин у Ф2. Такі розбіжності між оптичними показниками і здатністю клітин до проліферації вказують, перш за все, на те, що оптичні параметри жодним чином не характеризують проліферативний потенціал клітин. По-друге, на фоні дії оцтової кислоти, клітини подвійного мутанта хоча й зберігають цитоморфологічну «стабільність» (вочевидь, завдяки дефектності за PPN1), проте проліферативний потенціал все ж втрачають (ймовірно, як наслідок дефектності за PPX1).

Відсутність дії доксорубіцину на клітин дріжджів у середовищі YEPD може бути пов’язана із блокуванням молекул доксорубіцину екзометаболітами самих клітин дріжджів адже при мікроскопіюванні було відмічено, що доксорубіцин, який добре розчиняється у середовищі YEPD, в присутності клітин дріжджів переходить у нерозчинну форму і утворює кристали, які оточують клітини дріжджів формуючи різного розміру агломерати не виявляючи жодної токсичної дії. (*Подібним чином вів себе й етопозид, інша генотоксична сполука, яку ми спробували використати замість доксорубіцину*). В той же час, доксорубіцин не утворював кристалів за присутності клітин дріжджів у дистильованій воді. Зважаючи на це, ми оцінили дію цього фактору у воді. Хоча вода не є оптимальним середовищем для вивчення клітин дріжджів, адже створює гіпотонічні умови, однак, штами дріжджів, використані у даному дослідженні, залишаються життєздатними при зберіганні у воді, як за кімнатної температури, так і при 28°С, принаймні

протягом 24 годин (*дані не наведено*). При використанні дистильованої стерильної води дія доксорубіцину фіксувалася вже через годину культивування і посилювалася з часом (Рис. 3.12А). Клітини дріжджів дефектні за обома полі(Ф)азами виявилися найбільш чутливими до дії доксорубіцину адже вже через годину експозиції при концентрації доксорубіцину 50 мкг/мл кількість життєздатних клітин цього штаму дріжджів була принаймні на порядок нижчою ніж в клітин інших штамів. Величина LD_{50} для цього штаму дріжджів становив 12,2 мкг/мл/годину (Рис. 3.12В).

Клітини дріжджі дефектні за PPX1 виявилися менш чутливими до дії доксорубіцину: порівняно із контролем LD_{50} для цих клітин становила 33,7 мкг/мл/годину експозиції, в той час як у контролі – 27,1 мкг/мл/годину експозиції і через годину експозиції кількість життєздатних клітин цього штаму

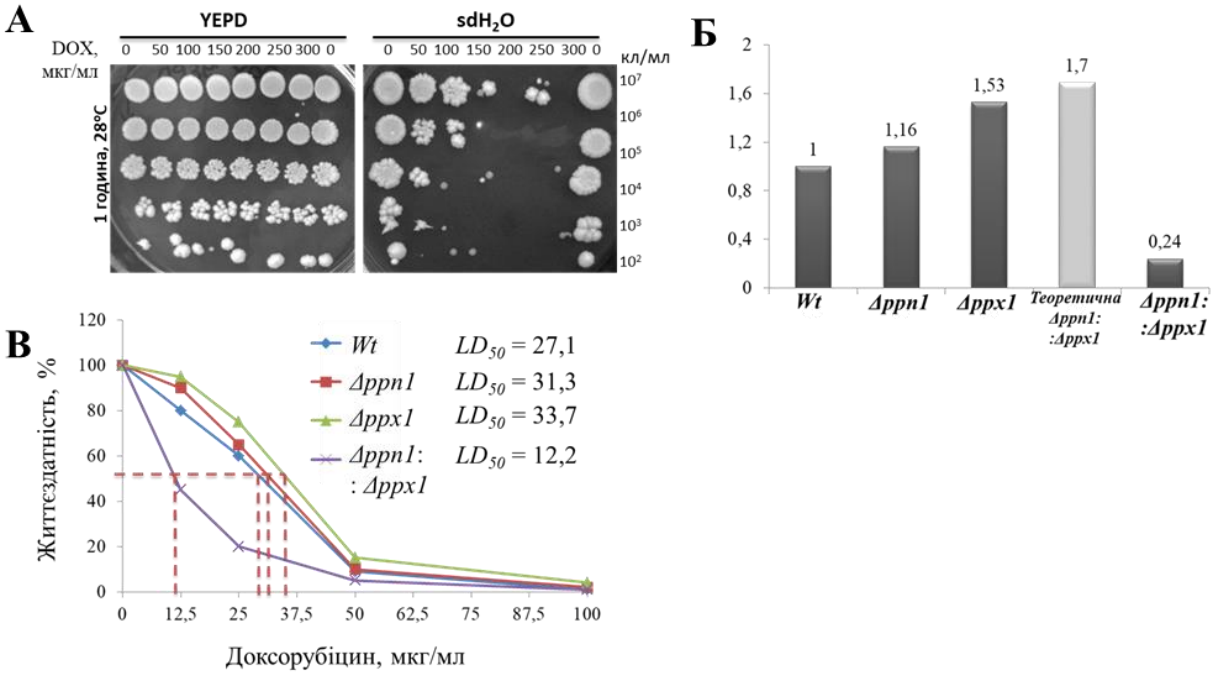


Рис. 3.12 Чутливість клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами до доксорубіцину. (А) Відмінності дії доксорубіцину на клітини дріжджів у поживному середовищі YEPD і у дистильованій воді. (Б) Відносний показник стійкості клітин дріжджів до дії доксорубіцину. Стійкість клітин дріжджів батьківського штаму прийнято за 1. (В) Відмінності у чутливості клітин дріжджів до доксорубіцину за величиною LD_{50}.

була майже вдвічі вищою порівняно із клітинами інших штамів. Дефектність за PPN1 так само виявляла незначне збільшення стійкості до доксорубіцину, хоча ефект не мав достовірного характеру.

Для порівняння ми перевірили й ефективність сорбітолу (1 М) викликати біологічні ефекти при дії у воді. Проте, як і у середовищі YEPD, він не виявляв жодного помітного впливу, а ні на показник життєздатності клітин дріжджів, а ні на оптичні характеристики.

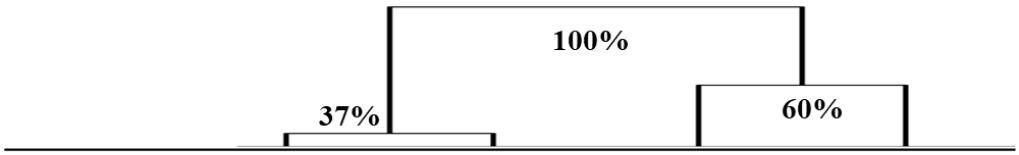
3.6. Стійкість клітин дріжджів до дії комплексу факторів стресу

Вивчення дії комплексу факторів проводили у воді адже, по-перше, доксорубіцин втрачає активність при взаємодії із компонентами поживного середовища YEPD. По-друге, за дії ЕМВ у поживному середовищі утворюються вторинні випромінювання, які можуть мати власні біологічні ефекти, а також відбувається помітне підвищення температури середовища, що заразом погіршує оцінку дії безпосередньо досліджуваного випромінювання.

Серед усіх досліджених факторів лише доксорубіцин очевидним чином впливав на показник життєздатності ($F_{(1,\ 210)}$ = 384,4 при p<0,001). Дія доксорубіцину мала лінійний характер (тобто ефект дії зростав пропорційно збільшенню концентрації сполуки), в той час як дія пероксиду гідрогену і оцтової кислоти була незначною ($F_{(1,\ 210)}$ = 17,3 при p<0,001 і $F_{(1,\ 210)}$ = 3,5 при p≤0,06, відповідно) і максимум ефективності (пригнічення КУО) обох речовин припадав на концентрацію 1 мМ, і зменшувався із збільшенням концентрації до 100 мМ. Загалом же ефективність зниження КУО при використанні кожного з факторів окремо від інших була вищої порівняно із варіантами їх сумісної дії, що пов’язано із зниженням активності кожного з факторів при сумісному використанні. Дія доксорубіцину хоча й незначним чином, але послаблювалася у присутності пероксиду гідрогену ($F_{(1,\ 210)}$ = 23,6 при p<0,001). Так само ефективність використання оцтової кислоти і пероксиду гідрогену знижувалася при їх сумісному використанні ($F_{(1,\ 210)}$ = 19,5 при p<0,001).

За результатом вимірювання оптичних показників клітин дріжджів за дії комплексу стресів, було виявлено, що реакція на комплекс стресів з боку клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азою PPN1 була найменш відмінною (на 40%) від клітин батьківського штаму (Рис. 3.13). Відмінності в реакції на стреси клітин інших двох штамів (дефектних за полі(Ф)азою PPX1 і клітин подвійного мутанта) так само були найменшими і становили 60%. Усі використані фактори знижували кількість клітин у Ф2 фракції і збільшували їх кількість у інших фракціях (Ф1, Ф3 і Ф4). Серед використаних хімічних сполук пероксид гідрогену виявляв найбільшу близьку до статистично достовірної негативну дію на вміст клітин у Ф2-фракції в батьківського штаму і штаму дефектному за PPN1 (кореляційний індекс становив -62% ($p \leq 0{,}08$) і -63% ($p \leq 0{,}07$), відповідно. Одночасно з цим пероксид гідрогену виявляв позитивну кореляцію із кількістю клітин в інших фракціях цих двох штамів. Тобто залежно від концентрації інших факторів пероксид гідрогену стимулював перехід клітин батьківського штаму і клітин дефектних за PPN1 з фракції Ф2 у інші фракції (Ф1, Ф3 і Ф4).

Для клітин дефектних за PPX1 і клітин подвійного мутанта вплив пероксиду гідрогену був значно меншим і кореляційні індекси щодо вмісту клітин у фракції Ф2 становили -31% ($p \leq 0{,}42$) і -43% ($p \leq 0{,}25$), відповідно.



Фракція	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*
Ф1	EMB *(58%)*	EMB *(59%)*	EMB *(36%)*	Немає
Ф2	Немає	Немає	DOX *(55%)*	DOX *(34%)*
Ф3	H_2O_2 *(33%)* Оцт. к-та *(47%)*	Немає	Немає	H_2O_2 *(34%)* Оцт. к-та *(55%)* DOX *(38%)*
Ф4	H_2O_2 *(43%)* Оцт. к-та *(34%)*	H_2O_2 *(32%)*	Немає	H_2O_2 *(30%)*

Рис. 3.13. Кількість клітин (*у %*) на етапах раннього (Ф1) і пізнього (Ф3) апоптозу і на етапі некрозу (Ф4) під дією на популяцію дріжджів факторів стресу. «Ф2» – клітини без ознак цитоморфологічних змін.

Позитивна кореляція із вмістом клітин в інших фракціях представників цих двох штамів була відмічена лише для фракції Ф1 у випадку PPX1-дефектних клітин і для фракцій Ф3 і Ф4 – для клітин подвійного мутанта.

Дія оцтової кислоти також виявляла негативний вплив на кількість клітин у фракції Ф2. Такий ефект кислоти був характерним для всіх штамів окрім дефектного за PPX1. Так клітини батьківського штаму виявили найбільші позитивні кореляційні індекси із дією оцтової кислоти на вміст клітин у фракціях Ф3 (47%, $p \leq 0{,}20$) і Ф4 (34%, $p \leq 0{,}37$). Клітини PPN1-дефектного штаму – для фракції Ф1 (20%, $p \leq 0{,}61$). А клітини подвійного мутанта – для фракції Ф3 (55%, $p \leq 0{,}12$). В клітин дефектних за PPX1 пул клітин у фракції Ф2 жодним чином не корелював із концентрацією оцтової кислоти; окрім того вміст клітин у інших фракціях цього штаму дріжджів так само виявляв лише негативну кореляційну залежність із цим фактором. Такий результат може вказувати на те, що дефектність за PPX1 призводить до зростання внутрішньоклітинного pH і додавання оцтової кислоти призводить до його нормалізації і тим самим позитивно відображається на стані популяції. Для клітин інших штамів, кореляція між концентрацією оцтової кислоти і вмістом клітин в різних фракціях не мала очевидних спільних закономірностей, а носила індивідуальний (штамоспецифічний) характер.

Доксорубіцин виявляв позитивну кореляцію (від 22% у батьківського штаму, до 55% у мутанта за PPX1) із вмістом клітин у Ф2-Ф4 фракціях, і негативну лише із Ф1 (від -23% у батьківського штаму, до -57% у подвійного мутанта).

Кореляційні індекси між тривалістю дії EMB і вмістом клітин у різних фракціях для всіх досліджених штамів багато в чому повторювали індекси виявлені для пероксиду гідрогену. Це могло б свідчити про те, що дія EMB викликає утворення пероксидів. Певні докази на користь цього припущення були отримані при аналізі каталазної активності в опромінених клітин дріжджів. Активність цієї групи ферментів збільшувалася в три рази в клітинах дикого типу після 15 хв експозиції, однак, поверталася фактично до рівня

контролю після експозиції 30 хв (Рис. 3.14). Одночасно з цим, в клітин дріжджів дефектних за обома полі(Ф)азами цей показник зростав вдвічі лише після 30 хв експозиції (Рис. 3.14).

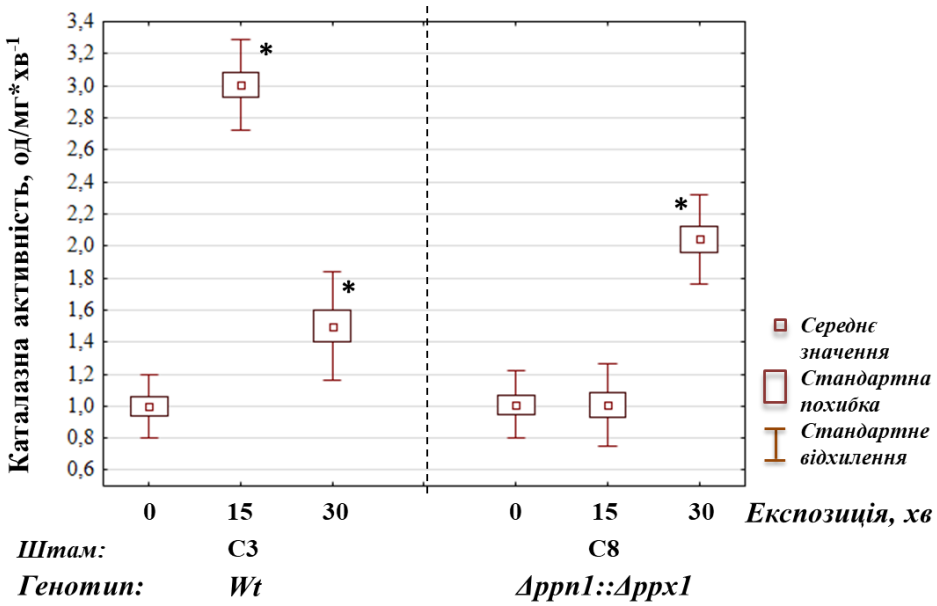


Рис. 3.14. Активність ферментів каталаз (в одиницях на мг білку за хвилину) в клітин дріжджів за дії електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону (40,68 МГц). Відмічені астериском (*) ефекти відрізняються від відповідних значень за експозиції 0 хв при $p \leq 0{,}05$.

Активація каталазної активності, звісно ж може свідчити про утворення певної кількості АФК в клітинах дріжджів за дії ДВЧ. Однак той факт, що в клітин дикого типу із збільшенням тривалості експозиції активність каталаз все ж зменшується, вказує на те, що утворення АФК є непрямим результатом дії ДВЧ і може бути пов'язаний з індукцією ЕМВ ряду деструктивних процесів (таких як, наприклад, деградація білків, тощо), що й виступає джерелом АФК. Це очевидним чином, має запускати внутрішньоклітинні репараційні процеси, які й призводять до відновлення пошкоджених структур і відповідного зменшення пулу АФК і активність каталаз, таким чином, зменшується. Опосередкованим підтвердженням другорядності АФК в ряду ефектів дії ДВЧ-ЕМВ, може бути відмінність характеру змін показника життєздатності клітин

дріжджів за дії ДВЧ порівняно із дією пероксиду гідрогену, які вказують на різний характер і механізм дії цих двох факторів.

Слід зазначити, що жодна з комбінацій факторів не призводила до повної загибелі клітин у популяції і доля клітин у фракції Ф4 хоча й виявляла штамові особливості проте не перевищувала 6%. У клітин батьківського штаму основний ефект на вміст клітин у фракції Ф1 виявляли оцтова кислота і доксорубіцин у низьких концентраціях, а також ЕМВ, яке нелінійним чином збільшувало кількість клітин у цій фракції разом із збільшенням тривалості опромінення. Однак кількість клітин у цій фракції суттєво зменшувалася при зростанні концентрації хімічних сполук і клітини переходили у Ф3, в основному за дії оцтової кислоти і у Ф4 за дії пероксиду гідрогену. Окрім того, близькою до достовірної була дія ЕМВ, щодо ефективного збільшення клітин у фракції Ф4, але це лише на фоні дії високих концентрацій пероксиду гідрогену і оцтової кислоти. В клітин дефектних за полі(Ф)азою PPN1 фактично роль окремих факторів втрачалася і більш-менш високі кореляційні індекси залишалися для фракції Ф1, яка показала певну залежність від дози опромінення і для фракції Ф4 (від концентрації пероксиду гідрогену). Для клітин дефектних за PPX1 вплив окремих факторів був ще меншим і, що цікаво, дія доксорубіцину призводила до збільшення числа клітин у фракції Ф2, яка відповідає нормальним клітинам. Подібний ефект доксорубіцину відмічений й для клітин подвійного мутанта, хоча в цьому випадку доксорубіцин одночасно збільшував кількість клітин і у фракції Ф3 (мертві клітини). Такий ефект доксорубіцину на клітини дефектні за PPX1 залишається нез'ясованим, проте, як і у випадку індивідуальної дії даного чинника, дефектність за обома полі(Ф)азами має протилежний характер і призводить до зростання числа клітин у фракції Ф3.

3.7. Формування адаптивної відповіді клітинами дріжджів

Зниження показнику ДГГА за дії стресів в усіх дефектних штамів може вказувати на цитотоксичні властивості вивчених стресів (включаючи ЕМВ) і відповідно на зниження проліферативної активності клітин дріжджів дефектних

за полі(Ф)азами. Можливо саме з цим і пов’язано зменшення діаметру колоній в клітин дефектних за полі(Ф)азами за дії стресів (за винятком кислотного стресу). Відомо, що даний тип ЕМВ здатен виявляти бінарну (стохастичну) дію (стимулювання і пригнічення ростових процесів) на клітини дріжджів [179, 453]. Зважаючи на те, що зміна ДГГА не пов’язана із життєздатністю клітин дріжджів (адже незалежно від того чи мають клітини дефектність за полі(Ф)азами, чи ні, рівень їх життєздатності за дії ЕМВ ДВЧ лишався незмінним), можна припустити, що цитотоксична дія ДВЧ ЕМВ реалізується на рівні регуляції проліферативної активність клітин дріжджів: уповільнює розвиток клітин, тобто збільшує загальну тривалість клітинного циклу.

Передобробка клітин дріжджів ЕМВ ДВЧ-діапазону може збільшувати стійкість клітин дріжджів до дії ряду стресових факторів [14, 181]. Такий ефект може бути пояснений індукцією адаптивної відповіді в клітинах дріжджів за дії ЕМВ ДВЧ-діапазону: здатність фактору (зазвичай слабкого стресу) запускати в клітинах захисні механізми і тим самим збільшувати їх стійкість до дії більш сильних стресів.

Ми перевірили, чи проявлятиме цей тип ЕМВ подібний ефект за відсутності полі(Ф)аз [454]. Клітини батьківського штаму були чутливими до дії стресових факторів і продемонстрували зниження числа КУО, в той час як активність ферментів ДГГ в перерахунку на КУО достовірно знижувалася лише за дії пероксиду гідрогену у концентрації 0,3 мМ (Рис. 3.15А). Тим не менше, попереднє опромінення клітин дріжджів ЕМВ ДВЧ-діапазону сприяло підвищенню показників КУО (окрім дії оцтової кислоти), а також підвищувало показник ДГГА за дії пероксиду гідрогену (0,3 мМ) і оцтової кислоти. Слід зауважити, що ми вказуємо лише на загальну відмічену в дослідженнях тенденцію, а не на абсолютні значення зміни ДГГА, адже цей показник змінювався від досліду до досліду, в той час як загальна тенденція залишалася незмінною. Тим не менше, ми, як попередньо вже було сказано, відмітили, що передобробка клітин ЕМВ ДВЧ має протекторний характер, адже призводила до збільшення показників ДГГА і КУО. Здатність ЕМВ збільшувати КУО і

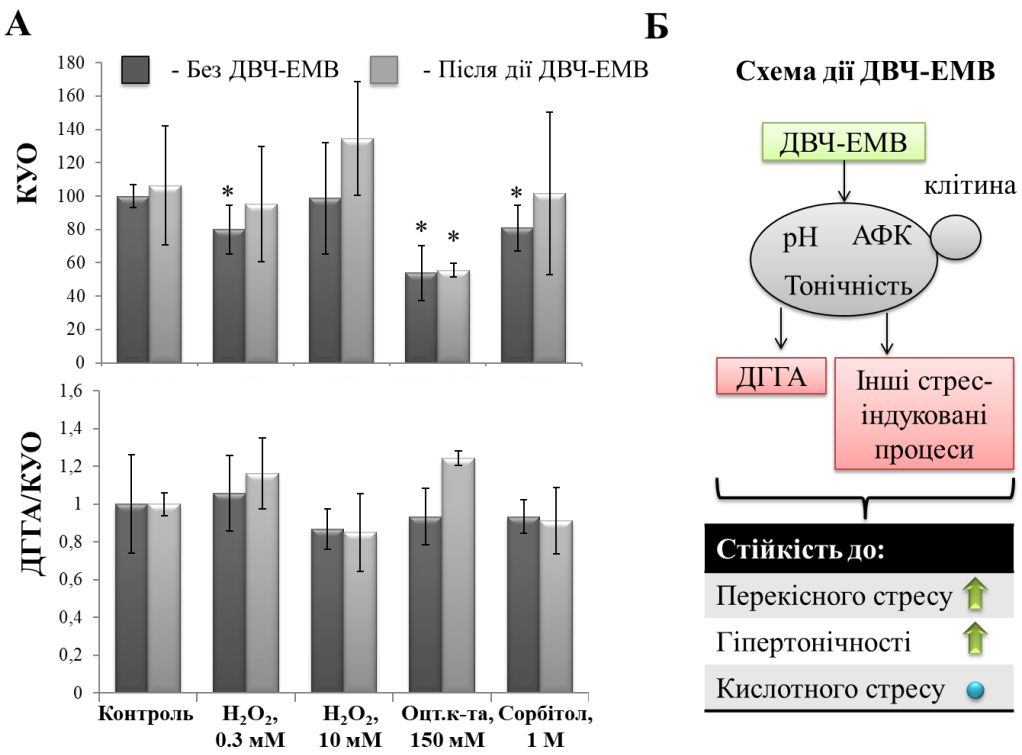


Рис. 3.15. Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на стійкість (за колонієутворюючою одиницею, КУО) клітин дріжджів дикого типу до дії факторів стресу (оксидативного, кислотного і гіпертонічного) і активність ферментів дегідрогеназного комплексу (ДГГА) (А). (Б) – теоретична схема реалізації відмічених ефектів.

ДГГА за дії стресових факторів може опосередковано вказувати на механізм, за яким на субклітинному рівні відбувається реалізація дії ЕМВ: індукція АФК, зміна pH і зміна тонічності (Рис. 3.15Б). Проведені нами дослідження показали, що ЕМВ ДВЧ-діапазону впливає на структуру КС [419], що, в свою чергу, може впливати на внутрішньоклітинну тонічність і бути фактором загального стресу. Окрім того, цей, та інші типи РЧ-ЕМВ, здатні викликати утворення АФК [77] і, цілком ймовірно, змінювати внутрішньоклітинне pH. Тому отримані нами дані не лише підтверджують дані літератури, але й вказують на можливий механізм дії ДВЧ- ЕМВ на клітини дріжджів.

Зменшення життєздатності було відмічене в клітинах дріжджів дефектних за PPN1 за дії пероксиду гідрогену (10 мМ), а також в клітинах дефектних за обома полі(Ф)азами за дії пероксиду гідрогену (0,3 мМ і 10 мМ) і сорбітолу (1 М)

(Рис. 3.16). Дія ДВЧ ЕМВ при цьому не виявляла протекторного характеру, а навіть, навпаки, збільшувала чутливість клітин дефектних за PPN1 до дії пероксиду гідрогену (0,3 мМ), і виявляла певну тенденцію до зниження життєздатності цих клітинах за дії оцтової кислоти і сорбітолу. Дефектність за іншою полі(Ф)азою (PPX1) мала позитивний ефект і збільшувала стійкість клітин до дії всіх досліджених факторів стресу. Виглядає так, наче дефектність за PPX1 слугує індуктором процесів адаптивної відповіді і тому життєздатність клітин за умов стресу зростала. Можливо саме з цим пов'язано те, що додаткова обробка цих клітин (дефектних за PPX1) ЕМВ ДВЧ- діапазону не мала вагомого ефекту.

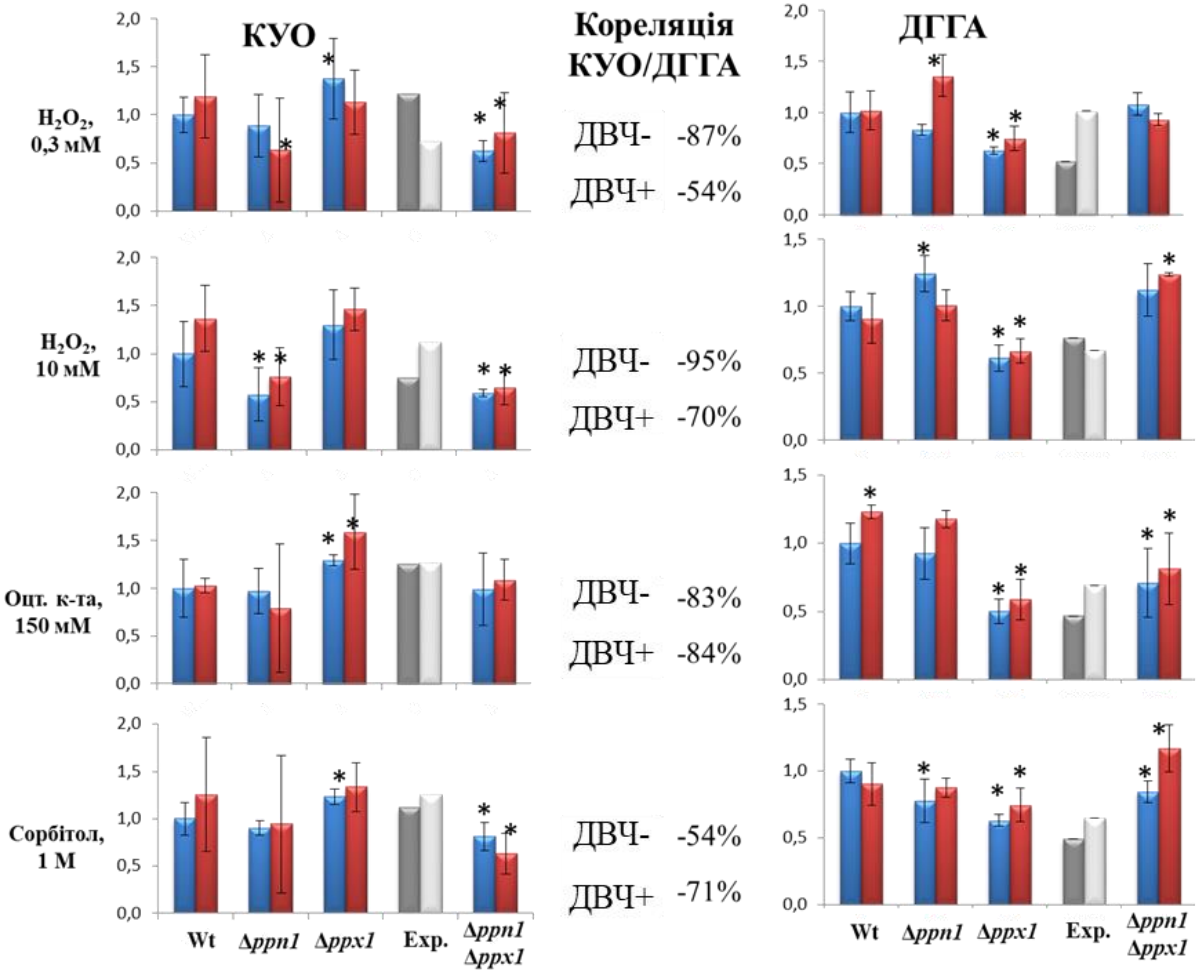


Рис. 3.16 Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на фенотипові індекси (за величиною колонієутворюючої одиниці (КУО) і активністю ферментів дегідрогеназного комплексу (ДГГА)) клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)ами PPN1 і PPX1 за дії факторів стресу.

Тобто дефектність за PPN1 негативно вплинула на стійкість до факторів стресу, в той час як дефектність за PPX1 мала позитивний вплив. Видалення обох генів в цілому мало негативний вплив на показник життєздатності, який здебільшого був нижчим від очікуваного. В свою чергу передобробка цих клітин ДВЧ ЕМВ не мала позитивного впливу на показник їх життєздатності.

На відміну від показнику життєздатності, дефектність за PPX1 мала негативний вплив на показник ДГГА за дії усіх досліджених факторів стресу. В цілому кореляційні індекси між показниками КУО і ДГГА були негативними, тобто для низьких показників життєздатності були характерними більш високі показники ДГГА. Дефектність за PPN1 виявляла вплив за дії високих концентрацій пероксиду гідрогену (10 мМ) де було відмічене збільшення ДГГА, а за дії гіпертонічного шоку – зменшення ДГГА. В усіх випадках (окрім, як за дії малих концентрацій пероксиду гідрогену) ДГГА подвійного мутанту займала проміжне положення між показниками ДГГА для клітин з поодинокими делеціями. Попередня дія ДВЧ ЕМВ у більшості випадків призводила до зростання показнику ДГГА, проте цей ефект не мав глобального характеру.

Найбільш вагомим є те, що активність ферментів ДГГ не корелювала із проявом явища адаптивної відповіді, адже показник ДГГА міг, як збільшуватися, так і зменшуватися, залежно від ситуації і незалежно від рівня стійкості клітин до дії факторів стресу. Тому очевидно, що немає прямого зв’язку між показником активності ферментів ДГГ і явищем адаптивної відповіді. Хоча не виключено, що певні ферменти ДГГ все ж приймають активну участь у прояві адаптивної відповіді.

Зважаючи на це цілком очевидно, що полі(Ф)аза PPN1 приймає безпосередню участь у формуванні адаптивної відповіді клітин дріжджів на дію стресів, адже за її відсутності клітини втрачали таку здатність. В той час, як полі(Ф)аза PPX1 не мала достовірного впливу і явище адаптивної відповіді проявлялося, хоча й меншою мірою в клітинах дефектних за цим ферментом. В клітинах з подвійною делецією середній показник виживання за дії факторів

стресу (окрім дії гіпертонічного шоку) був вищим після дії ЕМВ ДВЧ, проте ця різниця не була достовірною. До того ж рівень життєздатності клітин з подвійною делецією в цілому наближався до величин характерних для клітин дефектних за PPN1. Тому в цих клітинах явище адаптивної відповіді ймовірно пригнічене з-за дефектності за PPN1.

3.8. Шляхи генетичної взаємодії полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу

Фізіолого-біохімічні зміни, які відбуваються в результаті видалення генів, є показником залучення білків, кодованих цими генами в певних біохімічних процесах. В той же час відповідні фенотипові зміни у подвійного мутанта, слугують кількісною характеристикою генетичного взаємодії (ε) між віддаленою парою генів [391]. Даний метод використовується для побудови мап генетичних зв’язків і передбачає використання батьківського і мутантних штамів (поодиноких і подвійних мутантів) на оптимальному поживному середовищі і оцінку розмірів їх колоній. Саме різниця в розмірі колоній батьківського штаму і мутантів свідчить про роль, яку виконує даний ген і, відповідно, пара генів у житті клітини. Очевидно, що делеція життєвоважливих генів проявляється як летальний фенотип (відсутність росту колоній), в той час як делеція інших генів може не проявляти жодного впливу на розмір колоній. Характер зміни розмірів колоній дефектних штамів дозволяє зробити висновки про зв’язок між парою генів, а також встановити розташування продуктів цих генів на метаболічній мапі.

Наряду із швидкістю периферійного росту існують й інші підходи до оцінки фізіологічного стану клітин і одним з найбільш поширених методів є визначення загальної дегідрогеназної активності. Ферменти дегідрогеназного комплексу беруть участь в усіх процесах пов'язаних із забезпеченням основних життєвих функцій, а тому активність ферментів даної групи є основним з показників, за яким оцінюють життєздатність клітин, їх проліферативну активність, а також цитотоксичність різного роду хімічних або фізичних

факторів [455]. Генетичні дефекти можуть відображатися на активності цієї групи ферментів, що, в свою чергу буде свідченням про залучення цих ферментів в процеси, які прямо або ж опосередковано забезпечують функціонування ферментів дегідрогеназного комплексу. Основний внесок у показник активності ДГГ становить сукцинатдегідрогеназа, яка забезпечує перетворення солі ТТХ у формазан, і яка розташована в мембранах мітохондрій де одночасно розташована й полі(Ф)аза PPN1, в той час як в цитозолі мітохондрій розташована інша полі(Ф)аза PPX1. Використання обох методів дозволить більш детально оцінити фізіолого-біохімічні зміни, які мають місце в клітинах за дії факторів стресу і наблизитись до розуміння механізмів взаємодії полі(Ф)аз на різних метаболічних шляхах.

За результатами проведених досліджень [454] площа колоній, які формувалися клітинами дріжджів на поверхні агаризованого поживного середовища за 24 год росту в середньому становила 1,51-1,57 мм^2. Дефектність за геном *ppn1* не впливала на значення фенотипового індексу (f = 1), в той час як делеція гену *ppx1* призводила до зменшення на 30% площі колоній і відповідно значення фенотипового індексу складало 0,7 (Рис. 3.17). Таким чином, очікуване (теоретичне) значення фенотипового індексу для подвійного мутанта ($f_{ppn1::ppx1} = f_{ppn1} \times f_{ppx1}$) становило 0,7. Однак фактична площа колоній сформованих клітинами з подвійною мутацією не відрізнялася від розміру колоній клітин батьківського штаму ($1{,}60 \pm 0{,}19$ мм^2). Тому, величина генетичної взаємодії (ε) для клітин подвійного мутанта виявилася позитивною (ε = 0,3) і асиметричною.

Такий результат вказує на супресорний характер взаємодії генів, тобто ефект делеції одного з генів нівелюється делецією іншого гену, що найчастіше є характерним для генів чиї функції хоча й перекриваються однак відбуваються на різних метаболічних шляхах, а також це може бути свідченням того, що дана пара генів кодує ферменти, які є частиною більшого білкового комплексу [391], який, в даному разі, вочевидь, має відповідати за деградацію полі(Ф) в клітинах дріжджів.

За нормальних умов культивування розмір колоній суттєво зменшувався в середньому на 30% лише в клітин дефектних за PPX1 і паралельно з цим ці ж клітини показали на 20% нижчу ДГГА порівняно із клітинами дикого типу. Проте, клітини подвійного мутанта формували колонії, які не відрізнялися за розміром від клітин дикого типу, в той час як ДГГА була найнижчою. Цей результат може вказувати на існування прямої залежності між функціями полі(Ф)ази PPX1 і активністю ферментів ДГГ-комплексу і, відповідно, ростовими процесами: зниження ростової активності може бути пов'язане із зменшенням активності ферментів ДГГ. Проте у випадку подвійної мутації, вочевидь, відбувається зміна метаболізму з енергетичного на конструктивний, що й відображається на низьких показниках активності ферментів ДГГ і показниках росту близьких до нормальних. На цьому етапі не можна однозначно сказати чи має PPN1 безпосередній вплив на активність ферментів ДГГ, або ж її відсутність компенсується активністю PPX1 (Рис. 3.17). Тому ми звернули свою увагу на реакцію клітин дріжджів на дію факторів стресу, які запускають в клітинах дріжджів каскад стрес-індукованих процесів для формування клітинної резистентності.

Дефектність за полі(Ф)азами негативно впливала на радіальний ріст колоній за дії гіпертонічного стресу і ЕМВ ДВЧ-діапазону. Характер змін активності ферментів ДГГ майже повністю повторював зміни показнику радіального росту колоній за цих умов. У випадку ж оксидативного стресу ці мутації мали позитивний ефект, адже розмір колоній збільшувався. Тобто швидкість радіального росту колоній за умов оксидативного стресу зростала. Проте ДГГА за дії оксидативного стресу, так само знижувалася і, що характерно, майже дублювала зміни ДГГА відмічені за дії ЕМВ ДВЧ-діапазону: в обох випадках найбільше пригнічення ДГГА було характерним для клітин дефектних за PPN1 і меншою мірою для клітин дефектних за PPX1.

Клітини дріжджів з подвійною мутацією за дії усіх досліджених стресів виявили тенденцію до відновлення фенотипу за показником діаметру колоній. Однак показник ДГГА був вищім ніж у поодиноких мутантів лише за дії

оксидативного стресу. В той час як за дії ДВЧ ЕМВ цей показник дорівнював величині ДГГА клітин дефектних за PPX1, а за дії гіпертонічності – майже наближався до очікуваного значення.

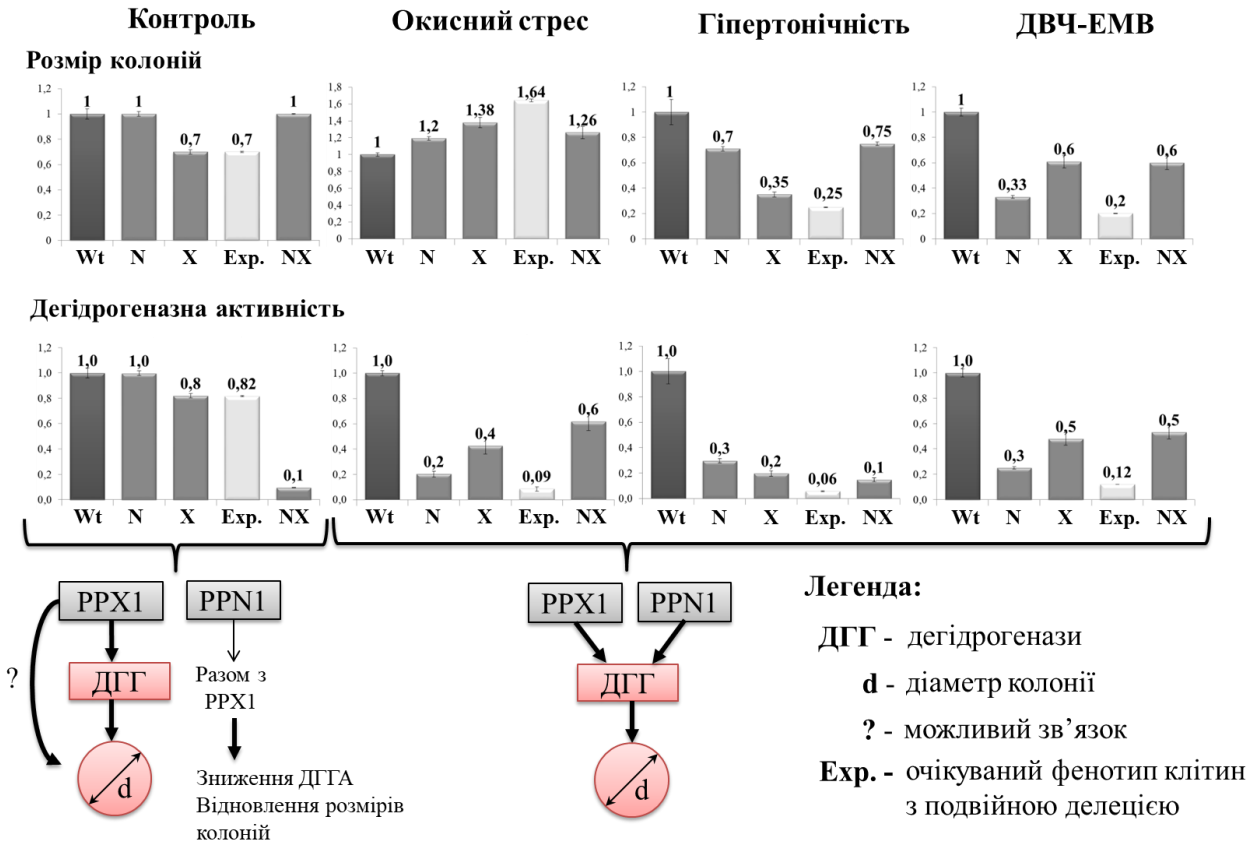


Рис. 3.17. Фенотипові індекси (за показниками радіальної швидкості росту колоній і активністю ферментів дегідрогеназного комплексу) клітин дріжджів дефектних за поліфосфатазами PPN1 (N) і PPX1 (X), і клітин подвійного мутанту (NX) за дії факторів стресу і відповідні шляхи взаємодії генів. Наведено гіпотетичний шлях реалізації відмічених ефектів.

Характер змін показнику діаметру колоній клітин подвійного мутанта вказує на супресорний механізм взаємодії між генами PPX1 і PPN1. Тобто клітини із подвійною делецією, хоча й не в повній мірі, однак повертаються до фенотипу наближеному до одного з поодиноких делеційних мутантів. Це вказує на те, що механізми, які запускаються в клітинах дріжджів за відсутності обох полі(Ф)аз, хоча й не можуть в повній мірі відтворити фенотип характерний для

клітин батьківського штаму, все ж є досить універсальними і забезпечують функціонування клітин дріжджів за різних умов оточуючого середовища.

Зменшення ДГГА в клітинах з поодинокими делеціями за дії стресів вказує на існування тісного зв’язку між ДГГА і функціональною активністю полі(Ф)аз. В той час як відмінності профілів ДГГА за дії стресу від таких за нормальних умов вказує на те, що полі(Ф)ази здебільшого є необхідними для формування реакцій на стреси, ніж для існування за нормальних умов, де лише за умови подвійної делеції було виявлено суттєвий вплив на показник ДГГА, проте це жодним чином не вплинуло на радіальну швидкість росту. Зважаючи на це полі(Ф)ази PPN1 і PPX1 можна віднести до групи ферментів стресової відповіді.

Обидва методи (фітнес тест за радіальною швидкістю росту і за ДГГА) вказують на дещо відмінний характер взаємодії генів: супресорний за результатами фітнес-тесту і на позитивний за результатом вимірювання ДГГ активності. Основний внесок у величину ДГГА вносить сукцинатдегідрогеназа (сукцинат-ДГГ), яка бере участь в дихальних процесах і розташована на внутрішній мембрані мітохондрій і є одним з важливих ферментів енергетичного метаболізму. Сукцинат-ДГГ – є регуляторним ферментом і активується фосфатом, сукцинатом і конкурентно пригнічується оксалоацетатом (щавелевооцтовою кислотою) [456, 457]. А тому збільшення активності сукцинат-ДГГ може бути пов'язане, окрім іншого, зі збільшенням пулу доступних фосфатів. Це, безсумнівно, повинно позначитися на енергетичному метаболізмі в цілому, і як було зазначено вище, фізіологічні показники росту клітин дріжджів на агаризованому поживному середовищі в цілому не знижуються (за винятком PPX1-дефектних клітин), що може вказувати на більш ефективне використання енергетичних можливостей клітинами дефектними за PPN1 і клітинами подвійного мутанта, відповідно.

Отримані нами дані вказують на участь обох ферментів полі(Ф)аз у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії стресових факторів. Вивчення чутливості клітин до дії кожного зі стресів окремо від інших має певні переваги

перед дослідженням комплексної дії стресів, адже, як виявилося, використані хімічні стреси пригнічують активність один одного і стійкість клітин за дії комплексу стресів збільшується. За дії окремих стресів прослідковується чітка залежність від дози і основними чинниками виступають оксидативний стрес, кислотний стрес і фактор генотоксичності (доксорубіцин). Ці фактори впливали на показник життєздатності і на цитоморфологічні особливості внутрішньоклітинної будови, яка добре візуалізувалася за зміною оптичних показників клітин. Гіпертонічність, викликана сорбітолом (1 М), не впливала на показник життєздатності клітин дріжджів, а також на їхні цитоморфологічні показники, так само як і гіпотонічність (витримування клітин дріжджів у дистильованій воді) протягом 24 годин не знижувала показник життєздатності. Електромагнітне випромінювання ДВЧ-діапазону із збільшенням тривалості опромінювання (дози) стимулювало перехід клітин у фракцію Ф1 (за оптичними показниками), яка, за особливостями ультраструктурної організації клітин, вочевидь, відповідає клітинам у стані раннього апоптозу, адже життєздатність клітин при цьому не знижувалася.

Проведений кластерний аналіз показав певні відмінності у реакції клітин дріжджів на дію поодиноких факторів і на комплекс стресів. Так за дії окремих факторів, найбільш відмінними від клітин батьківського штаму були Δ*ppx1*-клітини, в той час як клітини із подвійною мутацією мали найменший відсоток відмінностей (Рис. 3.11В). За дії ж комплексу стресів найбільш відмінними були Δ*ppx1*-клітини і клітини із подвійною мутацією (Рис. 3.13). По-перше, це вказує на те, що дефектність за PPX1 має найбільший вплив на чутливість клітин дріжджів до дії стресових факторів. По-друге, дефектність за PPN1 дещо збільшувала стійкість клітин до дії пероксиду гідрогену і оцтової кислоти, а тому при вивченні дії окремих факторів у подвійного мутанта спостерігали реверсивний фенотип (Таблиця 3.3). По-третє, негативний фенотип, відмічений у клітин подвійного мутанта за дії комплексу стресових факторів може бути пов’язаний із підвищеною чутливістю до доксорубіцину, який був присутнім в кожному з варіантів досліду при вивченні дії комплексу стресів. Таке пояснення

і схема наведена у таблиці (Таблиця 3.3) хоча й пояснюють відмічені відмінності між дією поодиноких факторів і комплексу факторів, проте, все ж, є спрощеними, адже у реальному експерименті звісно ж присутні інші дієві чинники, які впливають на оцінюваний показник. В нашому дослідженні, одним з таких чинників виступало взаємне пригнічення активності хімічних факторів.

Однозначно можна стверджувати, що полі(Ф)аза PPX1 відіграє роль у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії оксидативного і кислотного стресу, адже дефектність за цим ферментом призводила до зростання чутливості клітин дріжджів до дії цих факторів, що добре відображалося на оптичних показниках клітин (клітини переходили у фракцію Ф3) і за зниженим показником життєздатності. Проте ці ж клітини мали дещо вищу стійкість до дії доксорубіцину.

Таблиця 3.3.

Роль полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 для забезпечення стійкості клітин дріжджів до дії пероксиду гідрогену (*H2O2*) і доксорубіцину (DOX)

Манера дії факторів стресу	**Діючий фактор**	**Фенотип**			
		Δppn1	***Δppx1***	***Теоретично Δppn1::Δppx1***	***Фактично Δppn1::Δppx1***
Поодиноко	$F1_{H2O2}$	S (-1)	R (+1)	S + R = **0**	Ревертивний (0)
	$F2_{DOX}$	R (+1)	R (+1)	R + R = **+2**	Негативний (-2)
Комплексна дія	$F1_{H2O2}$ + + $F2_{DOX}$	S, R → S (-1)	R, R → R (+1)	S + R = **0**	Негативний (-2) (*кумулятивна дія комплексу факторів*)

Примітки**:** «S» і «R» - чутливі і резистентні, відповідно. «F1» і «F2» - фракції клітин 1 і 2, відповідно, за оптичними показниками, визначені методом проточної цитофлуориметрії.

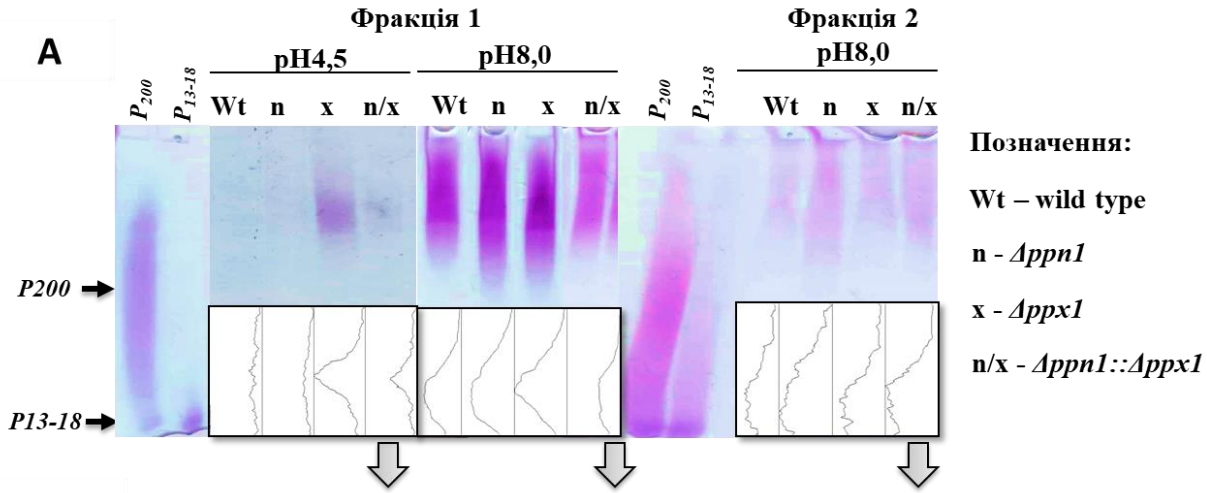
Дефектність за полі(Ф)азою PPN1 призводила до помірного зростання стійкості клітин дріжджів до дії оксидативного і кислотного стресу, а також збільшувала їх стійкість до дії доксорубіцину. За дії стресових факторів клітини дефектні за PPN1 більшістю зберігали цитоморфологічні особливості

притаманні нормальним клітинам. А це може вказувати на те, що цей фермент не відіграє безпосередньої ролі у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії вивчених факторів стресу.

Зважаючи на розбіжності біологічних ефектів викликаних дефектністю кожної з полі(Ф)аз постає питання, яким чином ці ферменти можуть забезпечувати стійкість до дії факторів стресу і чому дефектність за PPN1 має позитивний вплив на стійкість клітин до дії стресових чинників. Розбираючи механізм за яким ці полі(Ф)ази приймають участь у забезпеченні стійкості до факторів стресу слід звернути увагу на те, що прояв позитивного ефекту (позитивного фенотипу) викликаний делецією гену *ppn1* може вказувати на функціональну роль не самого ферменту PPN1, а продуктів і/або субстрату, який він метаболізує. В даному контексті – це полі(Ф)-ланцюги. В разі дефектності за PPN1 в клітинах дріжджів має відбуватися накопичення довголанцюгових полі(Ф), які можливо й забезпечують більш високу стійкість до оцтової кислоти. Однак очевидним є необхідність збереження активності PPX1, адже штам дефектний за PPX1 втрачає стійкість до пероксиду гідрогену і оцтової кислоти, в той час, як клітини подвійного мутанту, проявляли більш високу стійкість до пероксиду гідрогену. Тому можна припустити, що для забезпечення стійкості до пероксиду гідрогену ключовою є довжина полі(Ф) ланцюгів (чим довше, тим краще). У випадку ж кислотного стресу – довжина полі(Ф) ланцюга плюс активність полі(Ф)ази PPX1 є ключовими. У випадку доксорубіцину, клітини дріжджів дефектні за будь-якою з полі(Ф)аз показали більшу стійкість порівняно із клітинами батьківського штаму, і слід було б очікувати ще більшого зростання стійкості в клітин подвійного мутанта, проте такого не відбувається, натомість ми бачимо, що ці клітини є більш чутливими до дії доксорубіцину. Такий результат вказує на те, що в даному випадку субстрат (полі(Ф)) не має суттєвого значення і ключовими є інші, не встановлені фактори.

На сьогодні показано, що полі(Ф) проявляють властивості хелатуючих агентів, шаперонів [458] і тим самим знижують токсичність важких металів,

опосередковано знижують токсичність вільних радикалів, регулюють внутрішньоклітинне pH, тощо. Зважаючи на це, збільшення довжини ланцюга полі(Ф) може бути пасивним механізмом, який забезпечує стійкість клітин дріжджів до дії пероксиду гідрогену і оцтової кислоти. Теоретично, збільшення довжини полі(Ф) ланцюгів має відбуватися в клітинах дефектних за полі(Ф)азами (Рис. 3.18) і подібний ефект був відмічений в клітинах дефектних за PPN1 [459]. Відмічені нами зміни стійкості дефектних клітин до різних чинників стресу дозволяють припустити, що довжина полі(Ф)-ланюгів може бути важливим чинником при формуванні стійкості клітин дріжджів до кислотного стресу викликаного дією оцтової кислоти (Рис. 3.18). В нормі з клітин дріжджів виділяють до п’яти фракцій полі(Ф), які відрізняються



Б

Медіана довжини ланцюгів поліФ, P_i

Штам	Фракція 1 pH4,5	Фракція 1 pH8,0	Фракція 2 pH8,0
Wt	0	280 ± 14	305 ± 21
Δppn1	0	275 ± 35	300 ± 42
Δppx1	280 ± 45 *	255 ± 64	335 ± 7 *
Δppn1::Δppx1	290 ± 12 *	275 ± 21	335 ± 49

Рис. 3.18. Профілі кислото- і лугорозчинної фракцій полі(Ф) в клітинах дріжджів із дефектністю за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1. (А) – електрофоретичні профілі полі(Ф), (Б) – Довжина полі(Ф)-ланцюгів.

Примітка: відмічене астериском (*) значення достовірно відрізняється від контролю при $p<0,05$.

розчинністю у різних кислотах, солях і лугах. Проте, в нашому досліджені ми виявляли лише дві фракції полі(Ф) розчинні у кислоті і лугові (Рис. 3.18А).

Аналіз довжини полі(Ф)-ланцюгів показав незначне збільшення довжини полі(Ф) в лугорозчинній фракції №2 в клітин дефектних за полі(Ф)азою PPX1 і клітин подвійного мутанту (Рис. 3.18Б). Такий результат не дозволяє однозначно стверджувати, що довжина полі(Ф) може мати принципове значення при формуванні стійкості клітин дріжджів до дії чинників стресу. Проте деякі літературні дані все ж вказують на можливу роль полі(Ф). Так, наприклад, відомо, що пероксид гідрогену (1 мМ) викликає зменшення внутрішньоклітинного пулу PPX1 і PPN1 [460], результатом чого може бути зростання вмісту довголанцюгових полі(Ф). Окрім того в амінокислотних послідовностях ферментів PPN1 і PPX1 немає ділянок, які б могли вказувати на можливу участь цих ферментів у забезпеченні стійкості до стресових факторів. Окрім того, серед білків, з якими вони можуть взаємодіяти фізично чи генетично, немає безпосередніх кандидатів із анти-АФК, чи каталазною, чи пероксидазною активністю. А тому роль PPX1 і PPN1 у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії доксорубіцину, оксидативного і кислотного стресу вбачається другорядною через порушення, які відбуваються в інших метаболічних шляхах. Адже, наприклад встановлено, що дефектність за PPX1 може призводити до суттєвого зниження внутрішньоклітинного пулу гліцерол-3-фосфату і 1-деоксиксилулозо-5-фосфату в клітинах *M. tuberculosis*, а також порушує метаболізм аргініну і НАДН, і стимулює накопичення метаболітів циклу Кребса [461].

Таким чином, ми можемо припустити, що за дії стресів (пероксиду гідрогену, оцтової кислоти, доксорубіцину, тощо) в клітинах дріжджів відбувається пригнічення експресії генів полі(Ф)аз, що призводить до зменшення числа цих ферментів в клітинах і до відповідного зростання пулу довголанцюгових полі(Ф), які проявляють захисні властивості. Блокування експресії цих ферментів не відбувається, адже принаймні PPX1 є необхідною для забезпечення стійкості до оцтової кислоти, і хоча б одна з цих полі(Ф)аз

необхідна для збільшення стійкості до дії доксорубіцину. Тому в забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії різноманітних стресових факторів задіяні одночасно, як полі(Ф), так і полі(Ф)ази. Перші, вочевидь, безпосередньо взаємодіють із факторами хімічного стресу, в той час, як другі, мають опосередкований вплив.

Узагальнення розділу

Отримані дані вказують на те, що гени, які кодують ферменти полі(Ф)ази відіграють важливу функціональну роль для забезпечення стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу. Механізм взаємодії цих генів є позитивним і супресорним, що є характерним для функціонально відмінних метаболічних шляхів [392]. Розташування на різних метаболічних шляхах може бути причиною відміченої різниці ефектів викликаних делецією PPN1 (знижує стійкість до факторів стресу, відповідно впливає на одну групу ферментів ДГГ) і PPX1 (збільшує стійкість до факторів стресу, впливає на іншу групу ферментів ДГГ). Полі(Ф)аза PPN1 вочевидь приймає активну участь у формуванні явища адаптивної відповіді клітинами дріжджів, адже за її делеції, клітини втрачають таку здатність. До того ж, на відміну від двох інших показників (діаметр колоній і ДГГА) показник КУО (який опосередковано вказує на прояв явища адаптивної відповіді) відповідав мінімальним значенням КУО відміченим для клітин дефектних за PPN1. Такий результат може вказувати на унікальну роль саме PPN1 у забезпеченні явища адаптивної відповіді в клітинах дріжджів, яка не може бути замінена іншими ферментними системами клітини.

Отримані дані дозволяють запропонувати механізм формування адаптивної відповіді в клітинах дріжджів за участі ферментів дегідрогеназного комплексу, полі(Ф)аз PPN1 та PPX1, та низки процесів залучених до формування явища адаптивної відповіді (Рис. 3.19). Дія слабкого фактору стресу (який не призводить до зміни показнику життєздатності клітин), такого як ДВЧ-ЕМВ ініціює в клітинах дріжджів зміну pH, утворення АФК і зміну тонічності. Ферменти полі(Ф)тази PPN1 і PPX1 перебувають на різних

метаболічних шляхах і регулюють активність низки ферментів ДГГ-комплексу, які приймають активну участь у формуванні клітинної відповіді на дію різних факторів стресу.

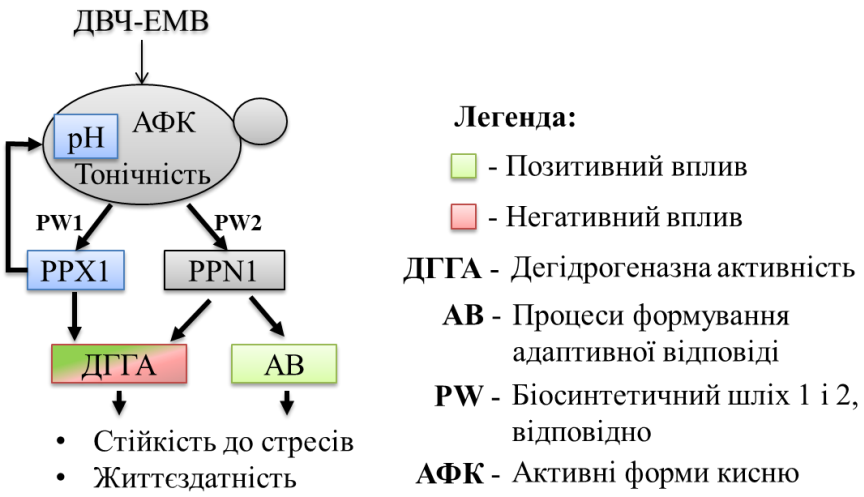


Рис. 3.19. Схема індукції адаптивної відповіді в клітинах дріжджів за дії ДВЧ ЕМВ за участі полі(Ф)аз і ферментів дегідрогеназного комплексу.

Проте відсутність залежності між рівнем ДГГА і проявом явища адаптивної відповіді вказує на те, що останнє не має прямої залежності від активності цих ферментів, а тому на наведеній схемі ці два блока відокремлені один від одного. В той же час полі(Ф)аза PPN1 безпосередньо приймає участь у ініціюванні процесів адаптивної відповіді і за її відсутності клітини дріжджів не здатні до прояву цього явища. Полі(Ф)аза PPX1 не має прямого впливу на процес адаптивної відповіді, проте за її відсутності, в клітинах дріжджів запускаються процеси, які (через PPN1) запускають процес адаптивної відповіді і таким чином в клітин дефектних за PPX1 стійкість до стресових факторів збільшена.

Тут слід наголосити на ще одній виявленій особливості: спускові механізми, які запускають процес адаптивної відповіді в клітинах дріжджів за дії ДВЧ ЕМВ відрізняються від таких, що виникають в разі дефектності клітин за PPX1. Це витікає із спостереження, що дія ДВЧ-випромінювання не

викликала зростання стійкості клітин дріжджів до дії оцтової кислоти, в той час як дефектність за PPX1 проявляла таку здатність.

Таким чином ми показали, що полі(Ф)ази PPN1 і PPX1 можуть бути віднесені до ферментів стресової відповіді, адже залучені до формування клітинами дріжджів відповіді на дію факторів стресу. Ці ферменти перебувають на різних метаболічних шляхах і тому регулюють різні аспекти клітинної діяльності, проте лише полі(Ф)аза PPN1 має безпосередню ключову роль у формуванні клітинами дріжджів явища адаптивної відповіді.

Основні положення розділу опубліковано у наукових працях [20, 21, 405-409, 411-415, 417-420, 422-440, 442-454]

РОЗДІЛ 4.

ВИВЧЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ, ПОЗАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ І МЕМБРАН КЛІТИН ДРІЖДЖІВ ЗА ДІЇ ФАКТОРІВ СТРЕСУ

4.1. Компонентний склад клітинної стінки і позаклітинного матриксу клітин дріжджів за дії факторів стресу

Клітинна стінка – це складна структура яка містить у своєму складі окрім каркасних елементів, ще й різноманітні ферментні системи, фактори адгезії, транспортні системи, тощо. Основними структурними елементами КС є полісахаридний остов, який складається в основному з манану і глюкану, які, в свою чергу, пов'язані із білками, які виконують численні функції. Окрім іншого, в КС дріжджів присутні полі(Ф)-ланцюги, а також виявлена екзополі(Ф)азна активність джерелом якої є фермент полі(Ф)аза PPX1 [9]. Яку роль можуть виконувати полі(Ф)-ланцюги в КС чи ЦПМ, на часі не відомо, в той час як фермент полі(Ф)аза, ймовірно, приймає участь у забезпеченні транспорту манану крізь мембрану (з цитоплазми до компонентів КС) [9]. Дефектність за полі(Ф)азами не перешкоджає формуванню КС і ПКМ, однак невідомо, чи відбуваються якісь зміни в цих структурних елементах в разі втрати клітинами ферментів полі(Ф)аз і відповідно при зміні довжини і кількості полі(Ф)-ланцюгів.

4.1.1. Наномеханічні властивості клітин дріжджів за дії чинників фізичного стресу

Зважаючи на те, що всі структурні компоненти КС, ПКМ і ЦПМ можуть впливати на її жорсткість, ми використали метод атомно-силової мікроскопії (АСМ), який є досить ефективним для проведення первинного порівняльного аналізу і непрямого детектування механічних, фізичних і структурних відмінностей між клітинами різних організмів, клітинами в нормі і за дії різних чинників. За допомогою цього методу проводиться вимірювання низки фізичних величин [462], серед яких, в нашому випадку, найбільш цінними

виявилися показники нанотвердості і модулю пружності, адже обидва ці показники одночасно вказують на щільність та жорсткість зв'язування між структурними елементами досліджуваного об'єкту. Відповідно, зміни цих показників в різних об'єктів вказують на відмінності у їх будові, і/або компонентному складі.

В результаті проведених вимірювань було показано, що значення модуля пружності для КС дріжджів *S. cerevisiae* знаходяться в межах 200-250 кПа (Рис. 4.1). Ці значення залишаються незмінними при проникнення АСМ-зонду в клітину на глибину до 50-100 нм (що відповідає товщині КС *S. cerevisiae*), після чого відбувається істотне зниження і стабілізація пружності на рівні 80 кПа на глибині понад 400 нм. Відповідно до отриманих даних проводиться розрахунок величини відносної жорсткості/твердості (нанотвердості) поверхні.

Клітини дріжджів суттєво відрізняються за показником нанотвердості навіть серед представників батьківських штамів, клітини яких формально не є дефектними за тим чи іншим геном. Нанотвердість клітин батьківського штаму С3 становила 0,1 у.о. і була в 2,5 рази вищою, ніж в клітин іншого батьківського штаму CRY (0,04 у.о.) (Рис. 4.2). Це вказує на очевидну різницю в будові,

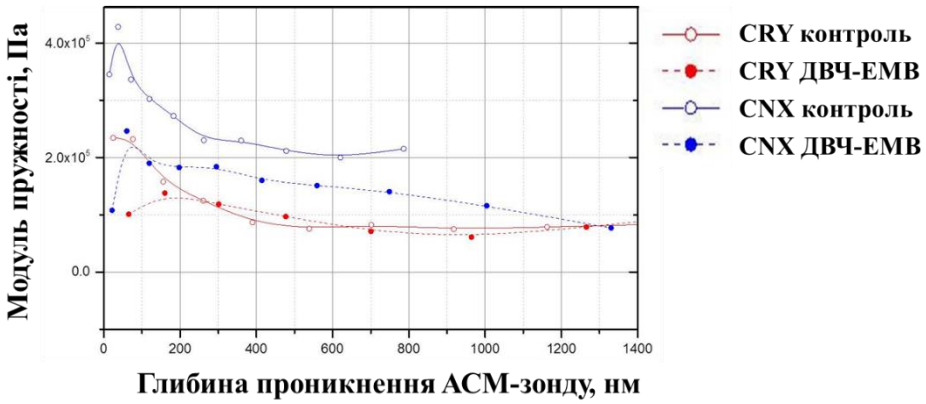


Рис. 4.1. Залежність величини модуля пружності від глибини проникнення зонду атомно-силового мікроскопу (АСМ-зонд) в клітини дріжджів *S. cerevisiae* штамів CRY і CNX опромінених електромагнітним випромінюванням (40,68 МГц, 15 Вт, 30 хв) і без опромінювання (контроль).

структурі, компонентному складі структур клітинної поверхні серед клітин різних штамів одного виду мікроорганізмів.

В свою чергу клітини дріжджів дефектні за геном *ppn1* мали менший показник нанотвердості порівняно із клітинами батьківського штаму 0,02 у.о. ($p < 0,05$), а дефектність за геном *ppx1* не мала достовірного впливу на даний показник. Нанотвердість клітин з подвійною делецією була такою ж, як і у клітин дефектних за *ppn1* (0,02 у.о.). Однак це стосувалося суто групи штамів C1-C10. Адже альтернативний набір штамів CRY-CNX показав, що дефектність за *ppn1*, навпаки, сприяє збільшенню жорсткості поверхні, що було характерним для клітин обох штамів CRN і CNX, які несуть даний дефект. В той час, як подвійна мутація (штам CRX) не мала істотного впливу на жорсткість клітин.

Очевидно, що дефектність за полі(Ф)азами по-різному впливає на клітини різних штамів, що, вочевидь, може бути обумовлено відмінностями на фізіолого-біохімічному і, можливо, генетичному й епігенетичному рівнях функціонування клітин представників різних штамів. Дефектність за PPN1

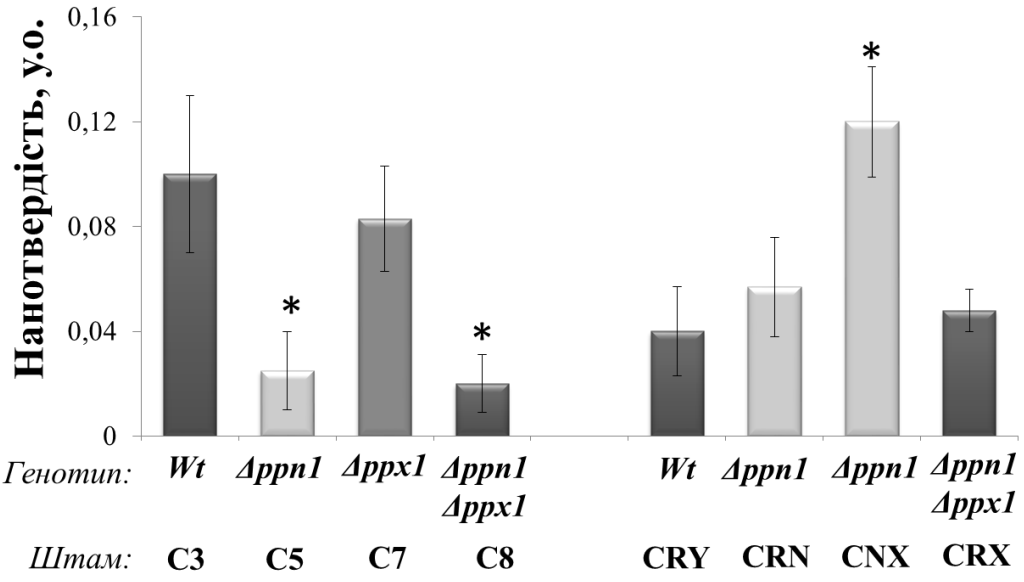


Рис. 4.2. Величина нанотвердості клітин дріжджів дефектних за генами поліфосфатаз PPN1 і PPX1. Значення відмічені астериском достовірно відрізняються від відповідного контролю (*Wt*) при $p<0,05$.

вплинула на показник жорсткості в обох групах штамів, хоча й мала різноплановий характер (зменшувала нанотвердість у штаму C5 і збільшувала у штамів CRN і CNX). Такий ефект від видалення PPN1 був досить неочікуваним, адже для цієї полі(Ф)ази не виявлено жодної функціональної ролі щодо організації будови і функцій КС, чи принаймні ЦПМ, натомість, відомо, що цей фермент локалізований в мембранах вакуолей і мітохондрій. Тому, найбільш ймовірним, є опосередкований механізм впливу, цього ферменту на показник нанотвердості клітин.

Зміни показнику нанотвердості в клітинах дефектних за полі(Ф)азами не виявили кореляції із показником радіальної швидкості росту (-40% при $p \leq 0{,}59$), ні з показником ДГГА (52% при $p \leq 0{,}48$), визначеними для клітин цих самих штамів, в той же час цей показник виявив досить високий ступінь кореляції із показником життєздатності клітин дріжджів (97,7% при $p \leq 0{,}023$). А тому очевидно, що за нормальних умов існування, життєздатність клітин дріжджів, на відміну від показників швидкості росту й їх загальної ферментативної активності (за ДГГА), виявляє пряму залежність із будовою КС.

За умов дії стресу показник життєздатності клітин дріжджів виявляє певну кореляцію із відповідними показниками нанотвердості. Найбільші значення кореляційного індексу, які вказують на існування залежності між цими показниками були відзначені за умови дії високих концентрацій пероксиду гідрогену (86% при $p = 0{,}14$) (Таблиця 4.1). Нижчі кореляційні індекси були відзначені за менших концентрацій пероксиду гідрогену (72%), а також при гіпертонічному стресі (73%).

Такий результат вказує на існування залежності між стійкістю клітин дріжджів до дії факторів стресу і наномеханічними показниками, які перш за все визначаються особливостями будови КС.

За дії РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону в клітинах дріжджів відбувається ціла низка змін, які стосуються внутрішньоклітинної тонічності й формування активних форм кисню, а за відсутності ферменту PPX1, ще й внутрішньоклітинного pH.

Окрім цього, дія РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону призводить до змін й у будові КС дріжджів дикого типу й формування додаткового позаклітинного шару (вочевидь полісахаридної природи зважаючи на виявлені у ньому манани) навколо опромінених клітин [419].

Таблиця 4.1.

Кореляційні залежності між рівнем життєздатності клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 за дії факторів стресу і показником нанотвердості клітин

Фактор стресу:	**H_2O_2, 0,3 мМ**	**H_2O_2, 10 мМ**	**Оцтова к-та, 150 мМ**	**Сорбітол, 1 М**
Кореляційний індекс, *R*:	0,72 *p=0,28*	**0,86** ***p=0,14***	0,48 *p=0,52*	0,73 *p=0,27*

Ми провели порівняння поведінки модуля пружності, в залежності від глибини проникнення зонда в опромінені і неопромінені клітини. За результатами вимірювань, загальною рисою для клітин батьківського штаму CRY і клітин дефектних за *ppn1* (CNX) було зниження величини пружності в клітинах після опромінення, тобто зниження показнику нанотвердості (Рис. 4.3), в той час як величина нанотвердості для клітин штаму дикого типу (Y-517) дещо зростала.

Оцінка механічних властивостей КС клітин інших штамів була визначена із залученням АСМ-зонду більшого діаметру (1 мкм), що дозволило уникнути протикання КС, натомість пружно їх деформувати. Такий підхід дозволив визначити значення жорсткості (пружної деформації – це здатність КС і ЦПМ протистояти тиску з боку АСМ-зонду) клітин дріжджів до, та після опромінення. Як наслідок, було показано, що жорсткість КС (Рис. 4.3Б) і показник нанотвердості (Рис. 4.2) прямопропорційні один-одному (коефіцієнт кореляції склав -99,2% при $p \leq 0{,}008$). Найменші показники жорсткості були відзначені для клітин дикого типу (в середньому 0,017 мкН/нм, а найбільші для клітин дефектних за PPN1 (0,025 мкН/нм) і у подвійного мутанта (0,026

мкН/нм). Після дії опромінення відмічена залежність зникала (коефіцієнт кореляції становив -65% при $p \leq 0{,}35$) з причини двократного (від 0,02 мкН/нм, до 0,04 мкН/нм) збільшення жорсткості КС і ЦПМ в клітин дефектних за PPN1, і непропорційним, відносно вихідних значень, змінам цього ж показнику в клітин інших штамів.

Зміни показнику нанотвердості і, відповідно, модулю пружності (жорсткості), вказують на ініціацію структурних змін в КС в результаті дії опромінення. Проте ці показники можуть як зростати, так і зменшуватися залежно від штаму і залежно від дефектності за полі(Ф)азами: клітини дефектні за PPN1 є більш вразливими до дії ДВЧ-ЕМВ за результатами цих тестів. Як було відзначено вище, показники нанотвердості і жорсткості КС як до, так і після опромінення не виявляють кореляційних залежностей із показниками швидкості периферійного росту колоній і активністю ферментів ДГГ-

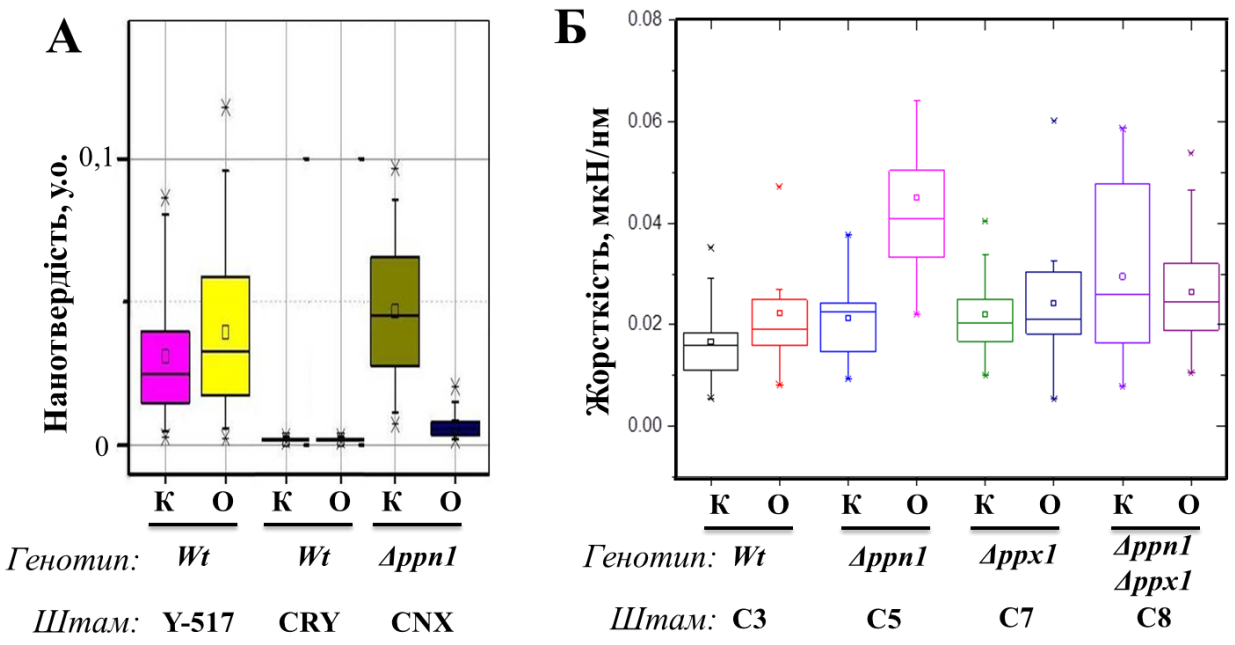


Рис. 4.3. Наномеханічні особливості клітин дріжджів *S. cerevisiae*: (Б) – відповідна, відносна величина нанотвердості клітинних стінок дріжджів (глибина проникнення зонду становила 150-200 нм).

Примітки: «К» і «О» – відповідно, клітини дріжджів неопромінені (контроль) і опромінені ЕМВ ДВЧ-діапазону (40,68 МГц, 15 Вт, 30 хв.).

комплексу. В той же час висока (97,7%) кореляційна залежність між показниками життєздатності клітин дріжджів і величиною нанотвердості і, відповідно, жорсткості, КС після опромінення зникає (59% при $p \leq 0{,}41$). А тому очевидно, що за дії факторів стресу не лише швидкість росту клітин й їх загальна ферментативна активність (за ДГГА) не виявляють прямої залежності із будовою КС, але й показник життєздатності клітин дріжджів так само втрачає такий зв'язок.

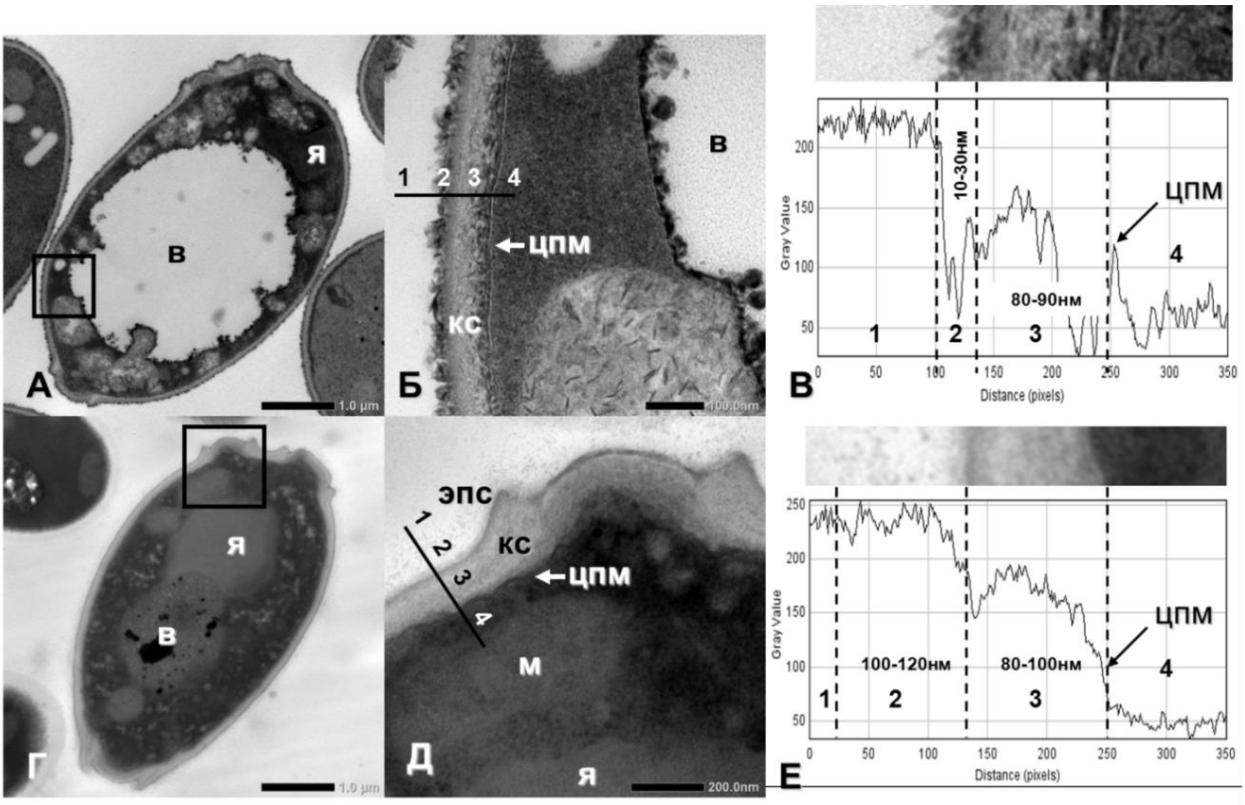


Рис. 4.4. Структура клітинної стінки дріжджів *S. cerevisiae* Y-517 неопромінених (А-В) і опромінених (Г-Е) електромагнітним випромінюванням радіочастотного діапазону частотою 40,68 МГц. Трансмісійна електронна мікроскопія.

Примітки: «я» - ядро, «в» - вакуоль, «цпм» - цитоплазматична мембрана, «кс» - клітинна стінка, «епс» - екзополісахаридний матрикс. «1, 2, 3, 4» - відповідні ділянки на шкалі оцінки електронної щільності, які деталізовані на вставках (В) і (Е), де «1» відповідає позаклітинного простору (фон), «2» - шар екзополісахаридного матриксу, «3 »- клітинна стінка і « 4 »- цитоплазма.

Для розуміння виявлених закономірностей, ми вивчили ультраструктурні особливості будови КС дріжджів за дії факторів стресу. Було виявлено, що в за нормальних умова існування КС дріжджів має три основних шари (Рис. 4.4А-В): (1) зовнішній шар з незначною електронною щільністю, (2) проміжний шар з низькою електронною щільністю і (3) внутрішній шар з високою електронною щільністю, який примикає до ЦПМ. Зовнішній шар оточений ПКМ з високою електронною щільністю і має неоднорідну товщину 10-30 нм і, за даними літератури, в основному представлений мананами [463].

За дії стресових факторів, таких як пероксид гідрогену, оцтова кислота, сорбітол, доксорубіцин і електромагнітне випромінювання ДВЧ-діапазону помітні зміни в ультратонкій структурі КС були відзначені різною мірою але для всіх досліджених штамів дріжджів. КС клітин штаму Y-517 дріжджів активно реагує на дію з боку ЕМВ, утворюючи додатковий зовнішній шар навколо клітин [419].

Аналіз ультраструктури КС показав, що за дії електромагнітного випромінювання ДВЧ-діапазону загальна товщина КС залишалася незмінною 80-100 нм, але поділ на шари ставав менш очевидним і особливих змін набував внутрішній шар, який здебільшого втрачав високу електронну щільність і злився з проміжним шаром (Рис. 4.4Д). Окрім того ПКМ втрачав властиву йому щільну структуру і набув вигляду дифузного матеріалу, що оточує клітину на відстань до 100-120 нм за її межі (Рис. 4.4Г-Е).

Дія пероксиду гідрогену і сорбітолу не викликала цитоморфологічних змін КС і оточуючої зовні полімерної оболонки. В той час як оцтова кислота призводила до суттєвого збільшення товщини КС (від 80-130 нм у контролі до 115-250 нм за дії оцтової кислоти). Подібно до ефектну викликаному дією ЕМВ, за дії оцтової кислоти КС також втрачала розподіл на шари і представляла собою структуру із низькою електронною щільністю.

Проведений аналіз показав, що зміни у будові КС за дії факторів стресу і в нормі можуть бути відзначені не для всіх клітин дріжджів, а тому вони не можуть бути пов’язані із відповідними фенотиповими проявами. Однак,

отриманий результат все ж вказує на те, що досліджені фактори стресу мають вплив на будову КС і для деяких штамів дріжджів цей ефект може відображатися на її ультраструктурі.

4.1.2. Склад цукрів клітинної стінки і позаклітинного матриксу клітин дріжджів за дії стресів

Вивчення ультраструктурних особливостей будови КС клітин дріжджів за дії факторів стресу показало, що зміни, які відбуваються в цій клітинній структурі ймовірно стосуються якісних (структурних) або ж кількісних змін полісахаридної складової КС. Тому ми вивчили вміст цукрових залишків і моноцукрів у КС та у ПКМ за дії факторів стресу [464].

Визначення моноцукрового складу клітинних стінок дріжджів

За оптимальних умов культивування в КС батьківського штаму дріжджів були виявлені глюкоза (50%), маноза (47%), глюкозамін (2,1%) і рибоза (0,6%) (табл. 4.2). Кількісне домінування глюкози і манози над глюкозаміном є типовим для даного мікроорганізму [267]. Виявлення рибози, хоча й в незначній кількості, є неочікуваним, адже в літературних джерелах рибоза не фігурує як структурний елемент КС дріжджів. Проте, зважаючи на те, що рибоза широко представлена в клітинах у складі молекул РНК/ДНК [465], можна було б припустити випадкове потрапляння в зразки КС примембранної рибосомальної фракції, яка містить РНК. Тому статус рибози, виявленої серед структурних елементів КС дріжджів є дискусійним.

Дефектність за полі(Ф)азами виявляє вплив на моноцукровий склад КС дріжджів порівняно із батьківським штамом. В цілому ці відмінності хоча й статистично є достовірними, проте стосуються незначних коливань у кількісних співвідношеннях манози : глюкози (від 1 : 0,9, у контролі до 1 : 1,1 у клітин дефектних за PPN1). Найбільш вагомі відмінності були відзначені щодо глюкозаміну, вміст якого в КС дріжджів дефектних за полі(Ф)азами був в 3-5 разів меншим порівняно із клітинами батьківського штаму (табл. 4.2).

Мінімальна кількість глюкозаміну в КС була притаманна клітинам подвійного мутанту (0,4%), в той час як клітини з поодинокими мутаціями мали приблизно однаковий вміст цього цукрового залишку (0,7%-0,8%, проти 2,1% у клітин батьківського штаму). Окрім того, рибоза, яка була відмічена в КС клітин батьківського штаму, приблизно в такій самій кількості була визначена й в КС Δ*ppn1*-клітин, в той час як в клітинах інших штамів (дефектних за PPX1 і подвійного мутанта) рибоза не була ідентифікована.

Таблиця 4.2.

Вміст цукрів (у %) в клітинних стінках дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* дефектних за генами полі(Ф)аз *PPN1* і *PPX1*

Цукор	Батьківський	Δppn1	Δppx1	Δppx1::Δppn1
Маноза	46,8±1,1	52,3±1,8	46,1±2,1	47,6±1,3
Глюкоза	50,4±1,7	46,3±0,9	53,2±0,3	52,0±1,4
Глюкозамін	2,1±0,2	0,8±0,2	0,7±0,1	0,4±0,1
Рибоза	0,6±0,1	0,5±0,1	0	0
Відсоток відмінності між штамами	60%		60%	
		100%		

Відповідно до аналізу вмісту моноцукрів у КС дріжджів, дефектність за PPX1 суттєво (на 100%) відрізняла клітини із відповідною делецією від клітин батьківського штаму і клітин дефектних за PPN1. Однак й дефектність за PPN1, в свою чергу, відрізняла ці клітини від клітин батьківського штаму на 60%.

Отримані результати вказують на те, що дефектність за полі(Ф)азами призводить не лише до структурних (за результатами ультраструктурних досліджень), але й кількісних (за вмістом цукрів) змін в організації КС дріжджів.

Визначення цукрових залишків в клітинній стінці і позаклітинному матриксі клітин дріжджів

Зменшення вмісту глюкозаміну у штамів дріжджів дефектних за полі(Ф)азами є досить важливим, адже цей цукор в КС представлений у вигляді цукрового залишку *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну і є основним компонентом, з якого складається хітин, який в свою чергу, хоча й являє собою мінорний компонент КС, проте має надзвичайно важливі структурні функції і забезпечує цілісність КС при порушенні синтезу структурних білків-компонентів КС [466]. Окрім того, *N*-ацетил-*D*-глюкозамін є необхідним для утворення хітинобіозних мостиків, які забезпечують прикріплення розгалужених манозних ланцюгів до білків, а також приймає участь у прикріпленні GPI-білків – білки, які на *C*-кінці мають глікозилфосфоінозиторний (GPI) якір, якій так само містить *N*-ацетил-*D*-глюкозамін у своїй структурі [466]. Тому зменшення глюкозаміну може свідчити як про зменшення вмісту хітину, так і про зниження відсотку принаймні GPI-білків, які виконують не лише структурні функції, але й залучені до формування клітиною відповіді на дію стресових чинників [466]. Зважаючи на це ми використали інший метод (лектинів мічених колоїдним золотом) і дослідили вміст цукрових залишків на поверхні КС й у ПКМ. Лектини – білки, які специфічно зв’язуються із певними цукровими залишками, що дозволяє диференційовано оцінити їх вміст у тій чи іншій структурі за допомогою електронної (кількісно) чи світлової (якісно) мікроскопії. Результати попередніх досліджень показали, що даний методичний підхід дозволяє досить добре візуалізувати не лише ПКМ поодиноких клітин бактерій, дріжджів, чи сформованих ними біоплівок, але й відображає просторову і структурну організацію КС і ПКМ, їх щільність, тощо [467, 468].

В клітин дріжджів сахароміцетів, яким не притаманні щільні позаклітинні структури, які можна було б порівняти із капсулою інших мікроорганізмів, був виявлений екзополімерний шар товщиною до 2 мкм, який оточує клітини (Рис. 4.5А). Окрім взаємодії із компонентами позаклітинного шару чи

приповерхевими структурами, виявилося, що лектини дуже добре взаємодіють і з компонентами КС (Рис. 4.5 Б і В).

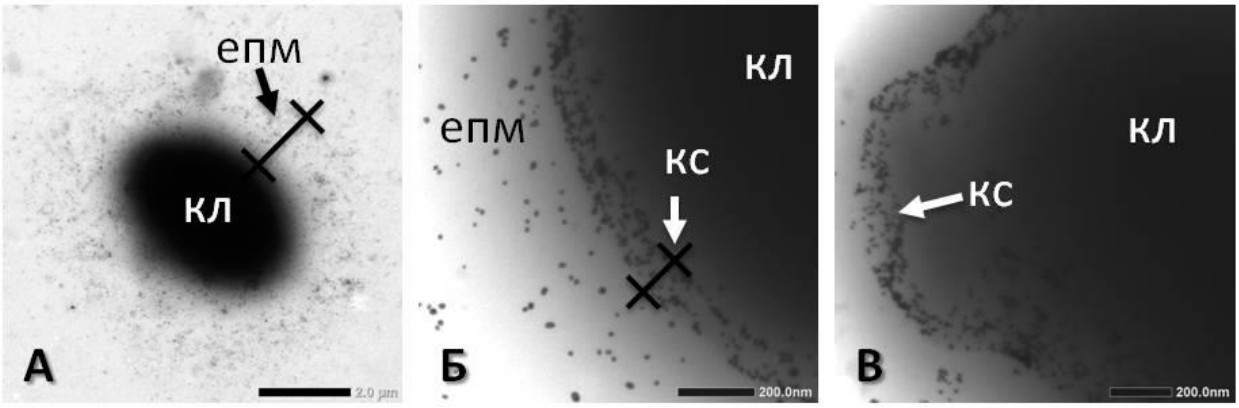


Рис. 4.5. Зв'язування лектину чечевиці міченого колоїдним золотом із позаклітинним матриксом і клітинною стінкою клітин дріжджів. (А) – клітина дріжджів *S. cerevisiae* шт. С4 (Δ*ppn1*) оточена шаром лектину, зв'язаного із компонентами екзополімерного матриксу (епм); зона епм (виділена дужками) має близько 2 мкм в товщину і оточує клітину з усіх сторін. (Б) –фрагмент клітини на якому видно зв'язування міченого лектину із клітинною стінкою (виділено і показано білою стрілкою) і екзополімерним матриксом. (В) – зв'язування лектину в зоні формування бруньки.

Вміст цукрових залишків в клітинній стінці

Найбільш високий рівень взаємодії з компонентами КС був відмічений для лектинів специфічних до *D*-манози/*D*-глюкози (46%-49%), *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну (22%-25%) і *N*-ацетил-*D*-галактозаміну (21%-24%) (Рис. 4.6) [469]. Специфічність до *D*-галактози і сіалової кислоти була невисокою, однак проявляла більшу штамову специфічність. Галактоза, *N*-ацетил-*D*-галактозамін, а також сіалова кислота не є типовими елементами, які б згадувалися при описанні будови КС дріжджів сахароміцетів. Проте, за даними літератури, мінорні кількості галактози можуть бути ідентифіковані при вивченні фракції 1,6-глюкану, виділеного з КС сахароміцетів, що підтверджується наявністю в клітинах дріжджів UDP-галактозного транспортного білкового комплексу [265, 470].

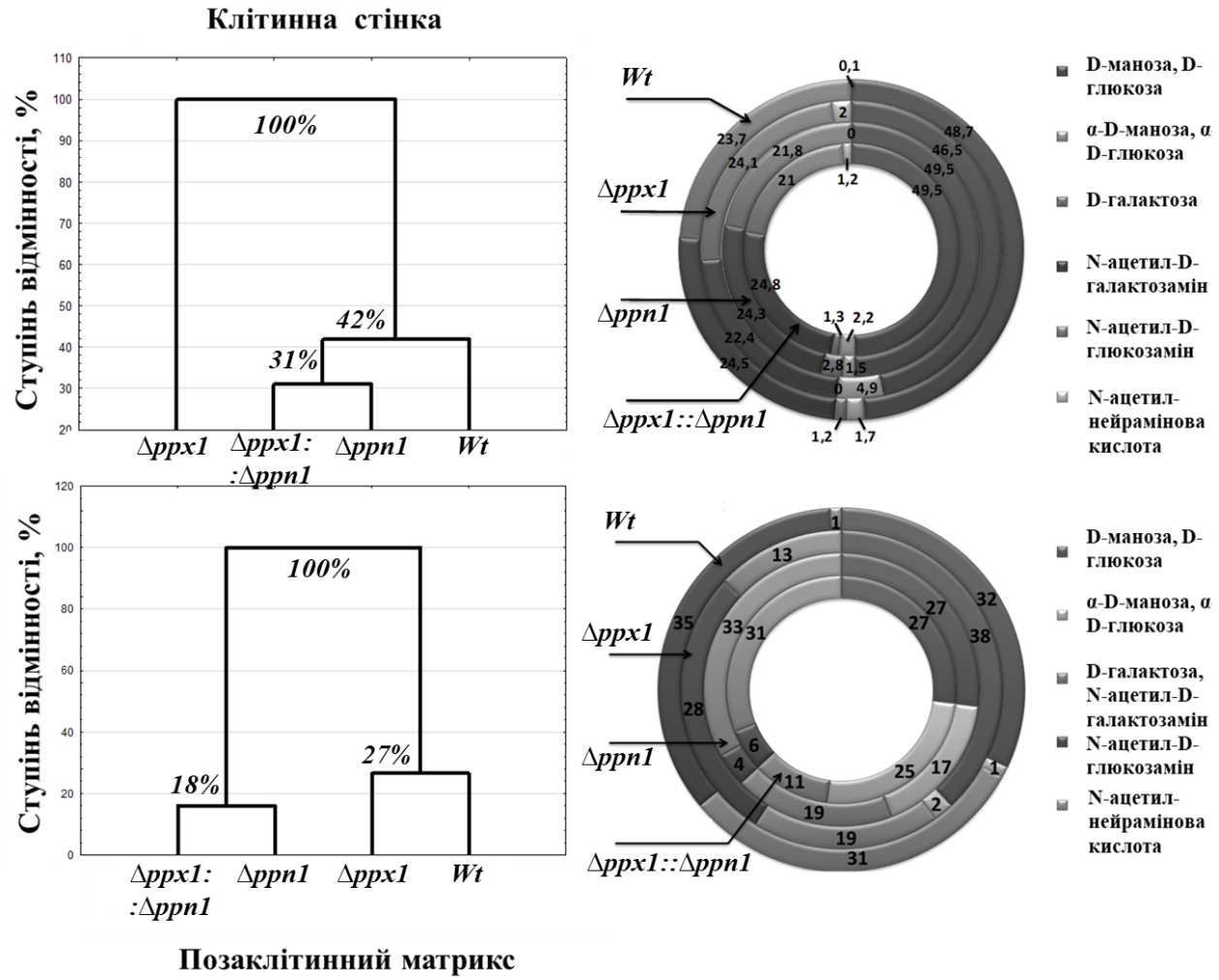


Рис. 4.6. Вуглеводні залишки полісахаридів клітинних стінок та позаклітинного матриксу дріжджів.

В клітинах дріжджів дефектних за PPN1 не виявлено галактози, а в клітинах інших штамів вміст галактози становив 1,3%-2,8%. *N*-ацетил-*D*-галактозамін і сіалова кислота є типовими для бактерій і клітин ссавців, відповідно, проте лектиновий тест, показав досить високий вміст *N*-ацетил-*D*-галактозаміну і залишкові кількості сіалової кислоти саме в КС дріжджів. Вміст сіалової кислоти в клітинах штаму дикого типу і штаму клітинах дефектних за PPX1 в середньому не перевищував 0,1%, в той час як в клітинах дефектних за PPN1 і в клітинах із подвійною делецією – становив 2,0% і 1,2%, відповідно.

Найменших відмінностей від батьківського штаму зазнали клітини дріжджів дефектні за PPN1 і клітини з подвійною делецією (Рис. 4.6), різниця між якими становила (31%) і відмінність від клітин батьківського штаму була

близько 42%. Клітини ж дефектні за PPX1 відокремились в окремий кластер, виказуючи тим самим найбільшу ступінь відмінностей від інших штамів. Основні відмінності, які відрізняли клітини дефектні за PPX1 від клітин інших штамів – це збільшений вміст сіалової кислоти (2% проти 0,1% у клітин батьківського штаму) і повна відсутність галактози, в той час як в клітин інших штамів цей показник варіював від 1,2%-1,3% у клітин батьківського штаму і клітин із подвійною делецією, до 2,8% в клітин дефектних за полі(Ф)азою PPN1. Такий результат може вказувати на ключову роль ферменту PPX1 у забезпеченні КС залишками *D*-галактози, адже цей цукровий залишок не виявляється й у ПКМ клітин дефектних за цим ферментом. В той же час фермент PPN1 може відповідати за вміст *N*-ацетилнейрамінової кислоти (сіалової кислоти) у складі КС, адже за відповідної делеції сіалова кислота відсутня на поверхні КС, проте вміст її суттєво зростає у ПКМ (від 1% у клітин батьківського штаму, до 31% в клітин із делецією PPN1).

Загальний вміст всіх цукрових залишків виявлених в клітинах дріжджів дефектних за обома полі(Ф)азами був в 1,6 рази вищим ніж в клітинах інших штамів. Можливо, саме з цим пов’язана більша жорсткість структур клітинної поверхні виявлена в клітин із подвійною мутаціє порівняно із клітинами інших штамів (Рис. 4.3Б). Окрім того, клітини подвійного мутанта виявляють реверсивний фенотип за вмістом цукрових залишків на поверхні КС, що вочевидь пов’язане із функціональною активністю альтернативного ферменту, який виконує функції відсутніх полі(Ф)аз, і тим самим забезпечує хоча б часткове відновлення фенотипу подвійного мутанта до стану батьківського штаму.

Обидва аналізи (за моноцукровим складом і за вмістом цукрових залишків) показали, що основними компонентами КС дріжджів є маноза і глюкоза. Проте дані щодо моноцукрового складу, обмежуються виявленням незначної кількості *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну, в той час як дані лектинового тесту вказують на те, що кількісний вміст цієї сполуки на рівні манози і глюкози, і окрім неї, в КС присутні ще й *N*-ацетил-*D*-галактозамін, а також

залишкові кількості галактози і сіалової кислоти. Обидва ферменти полі(Ф)ази приймають участь у формуванні структури КС і, перш за все, суттєвим чином впливають на вміст окремих мінорних компонентів КС.

Вміст цукрових залишків в позаклітинному матриксі

Ступінь зв'язування лектинів із компонентами ПКМ суттєво різнилася для представників різних штамів дріжджів. Загальна кількість лектинів зв'язаних із ПКМ клітин з поодинокими мутаціями становила в середньому 4,2 тис.од./мкм^2, в той час як в ПКМ клітин із подвійною мутацією це число становило 3,2 тис.од./мкм^2. Загальна ж кількість зв'язаних лектинів в клітин батьківського штаму переважала відповідні значення в мутантних штамів на 3-4 тис.од./мкм^2. Тобто ПКМ клітин дефектних за полі(Ф)азами виявляє зменшення загального пулу цукрових залишків, що посилюється в клітин подвійного мутанта. Профілі зв'язування лектинів дозволяють розділити досліджувані штами дріжджів на два кластери, в перший з яких потрапляють батьківський штам і штам дефектний за PPX1 (Рис. 4.6), різниця між якими становила 27%. Другий кластер, відповідно, був сформований клітинам дефектними за PPN1 і клітинами із подвійною делецією, різниця між якими була 18%. Це вказує на те, що дефектність за PPX1 і дефектність за PPN1 суттєво впливають на профілі цукрових залишків у ПКМ, проте дефектність за PPN1 спричиняє більш вагомі зміни порівняно із PPX1.

Основні відмінності клітин дефектних за PPX1 від клітин батьківського штаму полягали у значно вищому вмісті сіалової кислоти (13% проти 1%), і зменшеному пулові *D*-галактози і *N*-ацетил-*D*-галактозаміну (19%, проти 31%) (Рис. 4.6). Дефектність за PPN1 спричиняла зменшення вмісту *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну (4-6%, проти 35% у клітин батьківського штаму), збільшенню вмісту альфа-*D*-манози і альфа-*D*-глюкози (17% і 25% відповідно для клітин із поодинокою і подвійною мутаціями, проти 1% у клітин батьківського штаму) і збільшеним вмістом сіалової кислоти (31-33%, проти 1% у клітин батьківського штаму).

Найбільш стабільним виявися вміст *D*-манози, *D*-глюкози (в межах 27-38% для клітин всіх штамів), в той час як кількість інших цукрових залишків суттєво варіювала від штаму до штаму. Характер змін вмісту сіалової кислоти, альфа-форм *D*-манози і *D*-глюкози виявили прогресуючий характер збільшення власного пулу при делеції окремих полі(Ф)аз і при подвійній мутації. Так само й прогресуюче знижувався й пул *D*-галактози і *N*-ацетил-*D*-галактозаміну (31% у клітин батьківського штаму до 19% у клітин із поодинокими делеціями і до 11% у клітин подвійного мутанта). Проведений аналіз дозволяє припустити, що кількісні характеристики цукрових залишків в ПКМ клітин дріжджів знаходяться в прямій залежності від функціонування полі(Ф)аз PPN1 і PPX1.

Кожен з цукрів має здебільшого своє положення у полісахаридних ланцюгах (Таблиця 4.3), що дозволяє наблизитися до розуміння структурної організації полісахаридів. Для більшості полісахаридів основа є загальною: вони кріпляться до одного з білків КС (манопротеїнів) через 1-2 залишки *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну, останній з яких з'єднуються з 1-3-ма залишками манози. Маноза є основним будівельним компонентом полісахаридів, з яких складаються лінійні або ж розгалужені ланцюги, в той час, як сіалова кислота має здебільшого термінальне розташування і, при порівняно однаковому відсотковому вмісті манози може вказувати на збільшення розгалужень у полісахаридних структурах. Молекули *N*-ацетил-*D*-глюкозаміну можуть утворювати ди- і/або олігомери і займати проміжне положення між молекулами манози й іншими структурними одиницями, в той час як молекули галактози і *N*-ацетил-*D*-галактозаміну займають термінальне положення і можуть передувати зв'язку із нейраміновою кислотою. Додаткові ланцюги можуть бути утворені за рахунок фосфатів і/або полі(Ф), які можуть створювати містки між різними цукровими залишками.

Такі досить передбачувані характеристики конформаційного розташування цукрових залишків дозволяють наблизитися до розуміння структурних особливостей полісахаридів виходячи з інформації щодо відповідних співвідношень виявлених цукрових залишків в КС. Відповідно,

Таблиця 4.3.

Цукри позаклітинного матриксу клітин дріжджів

Цукровий залишок	**Особливість поліструктур**	**Кількість зв'язаних лектинів, %**			
		Wt	**Δ*ppn1***	**Δ*ppx1***	**Δ*ppn1*::Δ*ppx1***
• *D*-маноза (*Man*), *D*-глюкоза (*Glu*)	Розгалужена	32	27	38	27
• *D*-галактоза (*Gal*)	Лінійна	31	19	19	11
N-ацетил-*D*-галактозамін (GalNAc)	Моно- і/чи димери				
• *N*-ацетил-*D*-глюкозамін (GlcNAc)	Димери і/або олігомери	35	4	28	6
• Сіалова кислота (*Neu5Ac*)	На термінальних кінцях	1	33	13	31

отримані дані вказують на те, що в клітин батьківського штаму полісахариди представлені довгими ланцюгами з манози, до яких приєднані ланцюжки глюкозаміну і галактозаміну (Рис. 4.7). Дефектність за полі(Ф)азам зменшує довжину ланцюгів, однак, за відсутності PPX1 зменшується одночасно й доля галактозаміну на одинцю довжини ланцюга, в той час як дефектність за полі(Ф)азою PPN1, навпаки збільшує долю галактозаміну і сіалової кислоти, що вказує на збільшення розгалуженості полісахаридів (Рис. 4.7). Зв'язок між галактозаміном і нейраміновою кислотою (сіаловою кислотою) може відбуватися через фосфати, або ж полі(Ф), фракція останніх, як відомо збільшується в КС клітин дефектних за PPX1 [9], що може бути характерним й для позаклітинних полі(Ф) також.

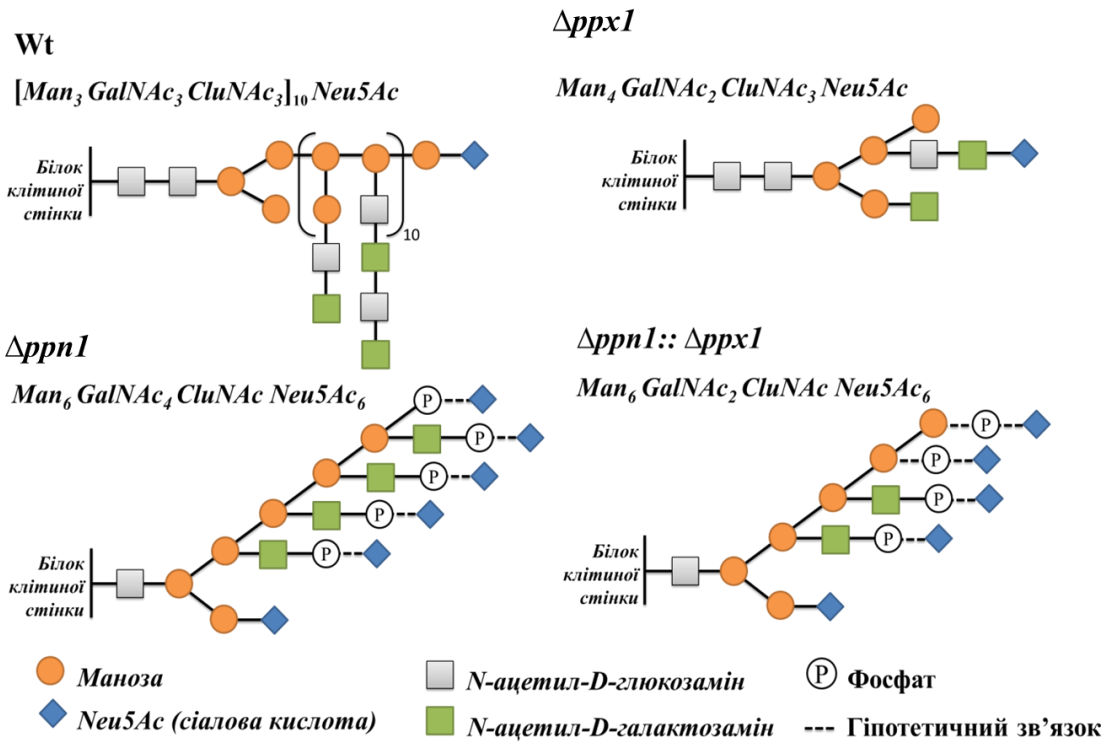


Рис. 4.7. Структурна формула і, відповідна, гіпотетична структура полісахаридів позаклітинного матриксу клітин дріжджів за дефектності за генами полі(Ф)аз PPN1 і PPX1.

Отримані дані вказують на значні відмінності між вмістом цукрів у КС клітин дріжджів та ПКМ. Відмінність між цими структурами становить щонайменше 35% (Рис. 4.8). Найбільших змін набувають позаклітинні полісахариди в клітинах дефектних за полі(Ф)азою PPN1 і в клітинах із подвійною делецією.

Будова полісахаридів КС є порівняно більш стабільною і з одного боку це могло б вказувати на більш вагому роль полі(Ф)ази PPN1 в забезпеченні будови позаклітинних полісахаридів, однак дефектність як за одним, так і за іншим ферментом призводить до структурних змін полісахаридів як в клітинній стінці, так і в ПКМ: їх укорочення і збільшення галуження. Вплив обох ферментів є мінімальним щодо вмісту манози і глюкози, однак обидва ферменти виявляють позитивний вплив на синтез глюкозаміну КС (Рис. 4.9), вміст якого суттєво знижується за браком будь-якого з цих двох ферментів і мінімальний в клітинах з подвійною делецією. При цьому в приповерхневому шарі КС вміст *N*-ацетил-

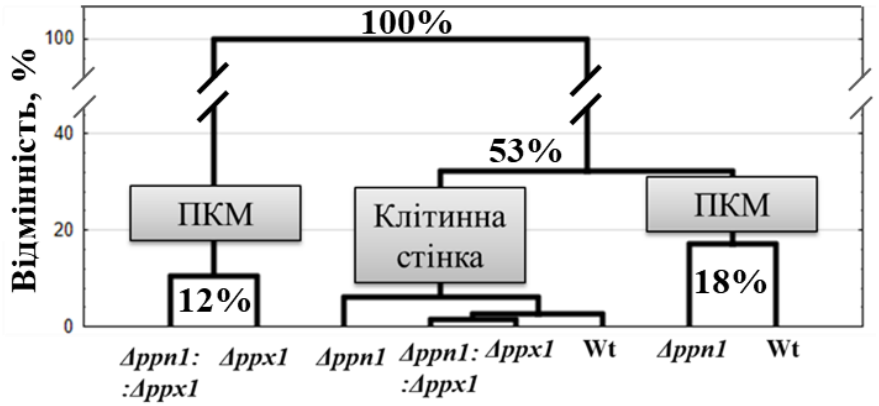


Рис. 4.8. Кластеризація клітин дріжджів за вмістом цукрових залишків у клітинній стінці та позаклітинному матриксі (ПКМ).

D-глюкозаміну не виявляв суттєвих змін за дефектності по полі(Ф)азам, в той час як вміст галактози позитивно залежав від дефектності за PPN1 і негативно від дефектності за PPX1, а доля нейрамінової кислоти мала протилежні позитивну і негативну залежність. В ПКМ виявлено позитивний вплив обох делецій на вміст нейрамінової кислоти, і негативний вплив на вміст глюкозаміну і галактозаміну. Разом усе це вказує на пригнічення синтезу глюкозаміну і збільшенню долі нейрамінової кислоти за дефектності по цим ферментам.

Вплив стресів на моносахаридний склад і вміст цукрових залишків в клітинних стінках і позаклітинному матриксі

Вивчення впливу стресових факторів на полісахаридний склад КС дріжджів показало, що загальна кількість полісахаридів є величиною досить стабільною і не зважаючи на дію факторів стресу коефіцієнт варіювання цього показника для всіх штамів знаходився в діапазоні 6-8%. Зміни в складі мінорних (полісахаридів) компонентів КС дріжджів мали найбільш високий показник варіабельності (понад 40%) у відповідь на дію факторів стресу, в той час як мінливість мажорних компонентів була нижчою (5-10%).

В клітин батьківського штаму загальна кількість виявлених цукрових залишків суттєво залежала від тонічності і кислотності середовища (ефект дії цих факторів становив 38,9 од. і 17,6 од., відповідно, Рис. 4.10). Осмотичний

стрес мав позитивний лінійний дозо-залежний характер впливу, а оцтова кислота – нелінійну залежність. Окрім того, усі фактори виявляли вплив на вміст *D*-манози/*D*-глюкози, а пероксид гідрогену ще й виявляв незначний вплив на вміст GlcNAc і GalNAc (2,3 од. і 2,4 од., відповідно). Тобто в клітин батьківського штаму за дії факторів стресу відбувається перерозподіл цукрових залишків при збереженні їх загального пулу. Маноза є основним структурним елементом КС і ПКМ, проте такі показники як жорсткість і міцність КС визначаються саме мінорними її складовими такими як GlcNAc і GalNAc.

Подібної залежності між збільшенням тонічності і зростанням пулу манози не виявлено для клітин дефектних за полі(Ф)азами, що вказує на порушення даної функції за відсутності цих ферментів. Натомість дія сорбітолу,

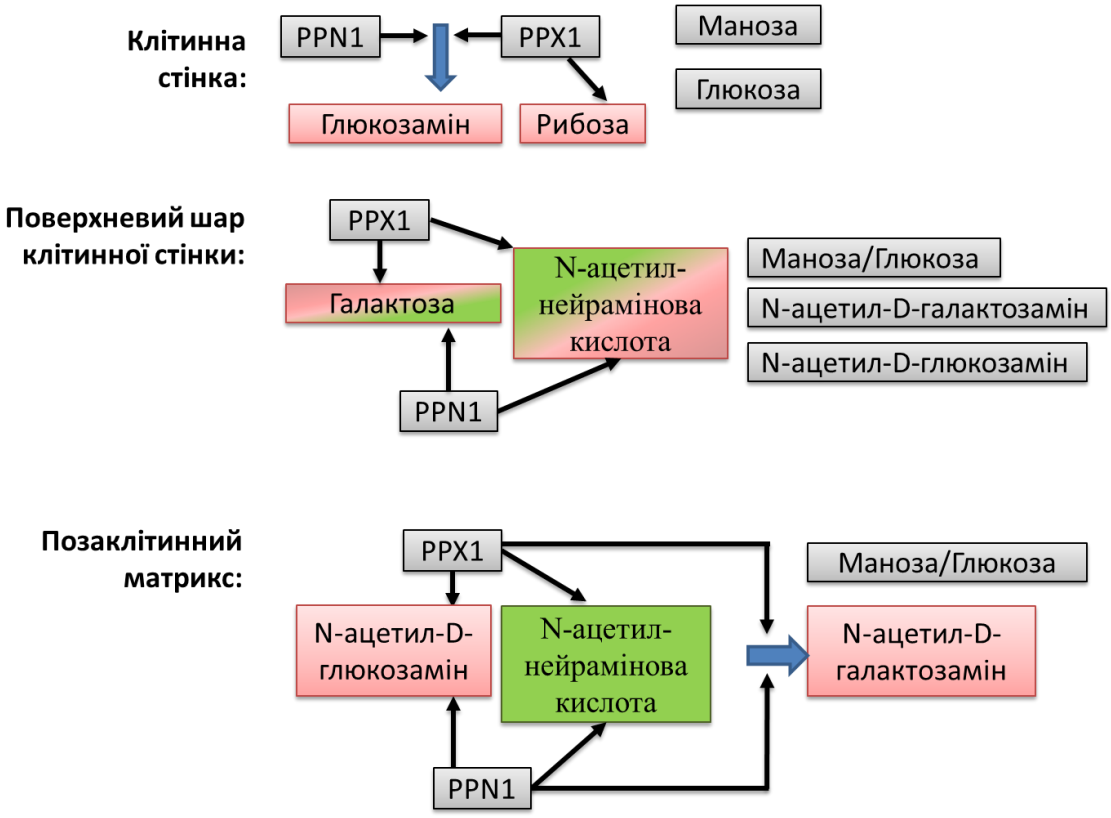


Рис. 4.9. Схема впливу полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 на синтез і вміст цукрів у клітинній стінці і позаклітинному матриксі. Червоним і зеленим кольором відмічені структурні елементи, вміст яких негативно і позитивно регулюється поліфосфатазами.

так само як й інших стресових факторів (окрім опромінювання) проявляла найбільш виразні ефекти саме на мінорні компоненти КС – GlcNAc і GalNAc.

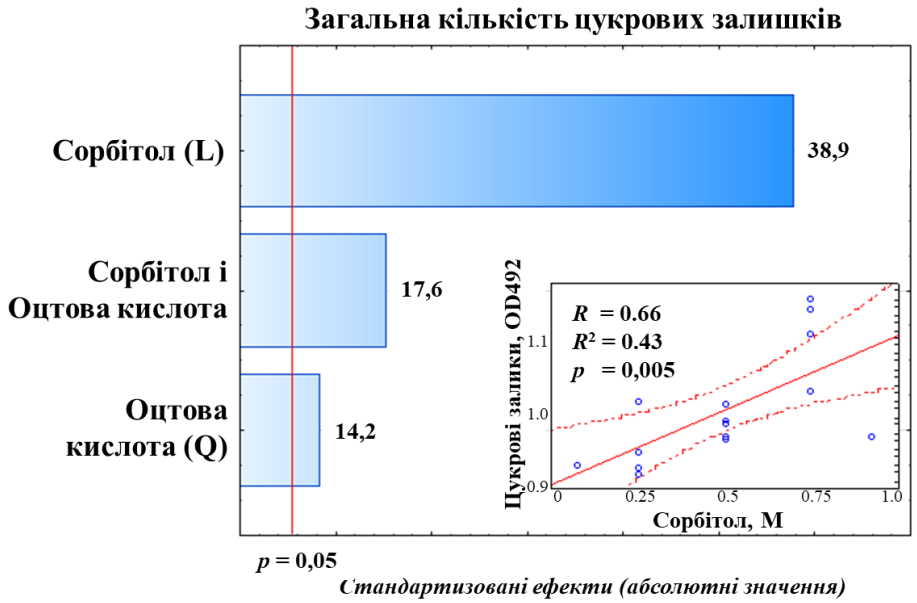


Рис. 4.10. Діаграма Парето значущості впливу стресових факторів на кількісний вміст цукрових залишків в клітинних стінках дріжджів. Вставка демонструє кореляційну залежність між концентрацією сорбітолу і вмістом цукрів. «L» і «Q» - відповідно лінійна і нелінійна залежність.

Профілі зміни GlcNAc в КС клітин батьківського штаму і клітин дефектних за PPN1 за дії стресових факторів були подібними (нелінійними і негативними, тобто пул GlcNAc нелінійним чином зменшувався із збільшенням концентрації стресу), в той час як клітини дефектні за PPX1 мали протилежні значення пулу цього цукру, який нелінійно збільшувався за дії стресів (Рис. 4.11). Клітини з подвійною мутацією мали профілі здебільшого подібні до клітин дефектних за PPN1, однак за дії оцтової кислоти пул GlcNAc в цих клітинах нелінійно зростав. А пул іншого цукрового залишку (GalNAc) нелінійно зростав за дії пероксиду гідрогену і сорбітолу в клітинах батьківського штаму і клітинах дефектних за PPN1 і в клітинах подвійного мутанта, і знижувався в клітинах дефектних за PPX1. За дії оцтової кислоти пул цього галактозаміну виявив протилежний характер змін. Усе це разом вказує на те, що як глюкозамін, так і галактозамін суттєвим чином залежить від

активності PPX1 за дії оксидативного стресу і при гіпертонічності, а при дії оцтової кислоти, ще й від активності PPN1. Тобто фермент PPN1 проявляє максимально свою активність саме за дії кислотного стресу і має другорядну роль за дії оксидативного стресу і гіпертонічності за яких ключову роль відіграє PPX1.

Передобробка клітин дріжджів РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону не мала безпосереднього впливу на вміст цукрових залишків в КС, однак впливала на динамічні ефекти (варіації пулу цукрових залишків у відповідь на дію стресових

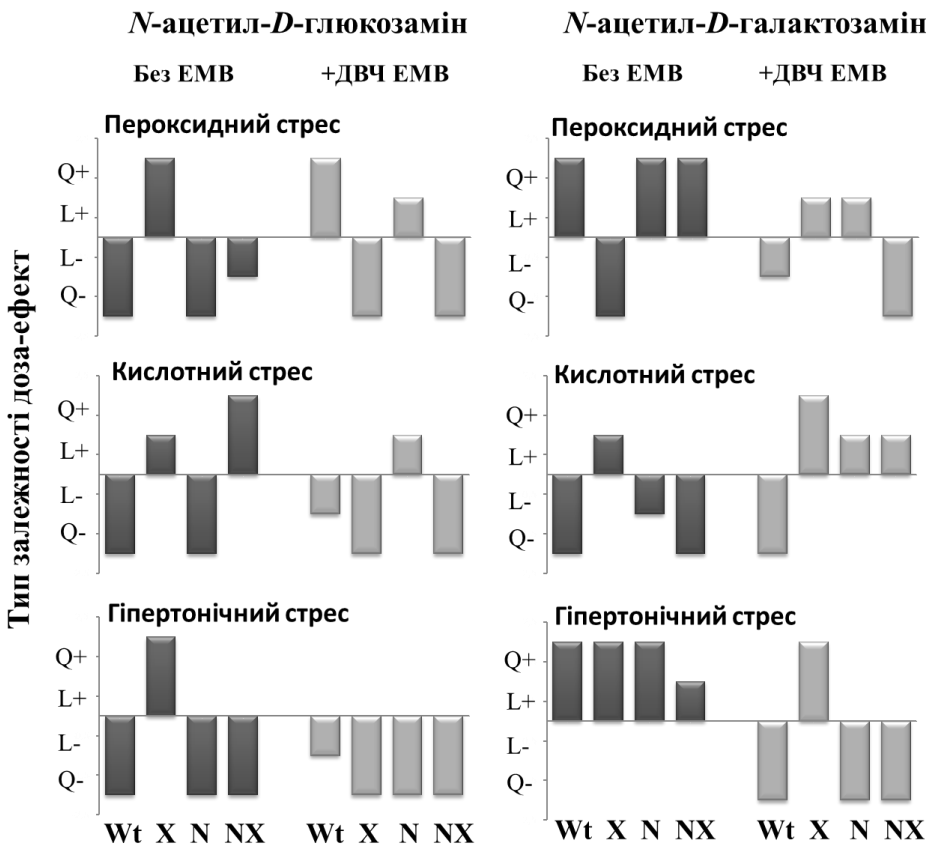


Рис. 4.11. Вплив ДВЧ-ЕМВ на характер кривих залежності доза-ефект дії факторів стресу на клітини дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1.

Примітки: «Q+» і «Q-», а також «L+» і «L-» – відповідно нелінійні (Q) і лінійні (L) залежності позитивна (+) і негативна (-). «Wt» - клітини батьківського штаму, «N» - клітини дефектні за PPN1, «X» - клітини дефектні за PPX1, «NX» - клітини з подвійною делецією обох полі(Ф)аз.

факторів) відмічені вище. Таким чином, ефект дії випромінювання виявлявся за зміною доза-залежних кривих: наприклад, в клітин батьківського штаму в результаті опромінювання пул GlcNAc не зменшувався за дії пероксиду гідрогену, а навпаки нелінійно зростав. Подібним чином знижувався пул GalNAc за дії пероксиду гідрогену й сорбітолу в той час як в нормі, за дії цих факторів, він збільшувався (Рис. 4.12). Опромінення показало важливу роль як PPN1, так і PPX1 за дії усіх досліджених факторів, що, вочевидь, пов'язано із здатністю ЕМВ ДВЧ-діапазону викликати деякі внутрішньоклітинні зміни, які запускають відповідні протидійні процеси, в яких задіяні обидві полі(Ф)ази.

Таким чином, обидва методи аналізу (ГХ/МС і метод лектинів мічених колоїдним золотом) показали, що дефектність за PPN1 і PPX1 призводить до змін у будові КС дріжджів. Встановлено, що мінорні компоненти полісахаридної матриці мають високу ступінь варіабельності і змінюються в широкому діапазоні у відповідь на вплив зовнішніх факторів. Проте їх коефіцієнти варіації були значно меншими в клітин дріжджів мутантних за полі(Ф)азами, що, ймовірно, вказує на пошкодження клітинного механізму відповіді на стрес. Найменші коефіцієнти варіації відзначені для подвійного мутанта; однак кількісні і якісні показники вмісту різних вуглеводних залишків у цього штаму були досить схожі на мутант за PPN1. Отриманий результат вказує на те, що обидві полі(Ф)ази необхідні для підтримки вуглеводних профілів і регулюють їх зміни у відповідь на дію факторів стресу.

У попередньому розділі ми показали, що клітини дріжджів дефектні за PPN1, а також клітини подвійного мутанту, мають меншу стійкість до дії пероксиду гідрогену, в той час як дефектність за PPX1 сприяла збільшенню показника життєздатності за дії вивчених стресів (Рис. 3.16). Одночасно з цим й опромінення клітин дріжджів ДВЧ-ЕМВ призводило до збільшення їх життєздатності за дії факторів стресу. Вивчення кореляційних зв'язків між вмістом цукрів і цукрових залишків в КС і ПКМ показало досить високу (до 99%) ймовірність існування зв'язку між здатністю клітин виживати за дії факторів стресу і вмістом манози/глюкози, галактозаміну і глюкозаміну

(табл. 4.4). Цікавим спостереженням є те, що рівень моноцукрів, визначений в КС за допомогою хроматографічного методу, не виявив жодної кореляційної залежності із показниками життєздатності клітин дріжджів за дії стресів, в той час, як рівні цукрових залишків у КС і ПКМ, виявлені за допомогою методу мічених лектинів, мали високі кореляційні зв'язки із рівнем життєздатності (табл. 4.4).

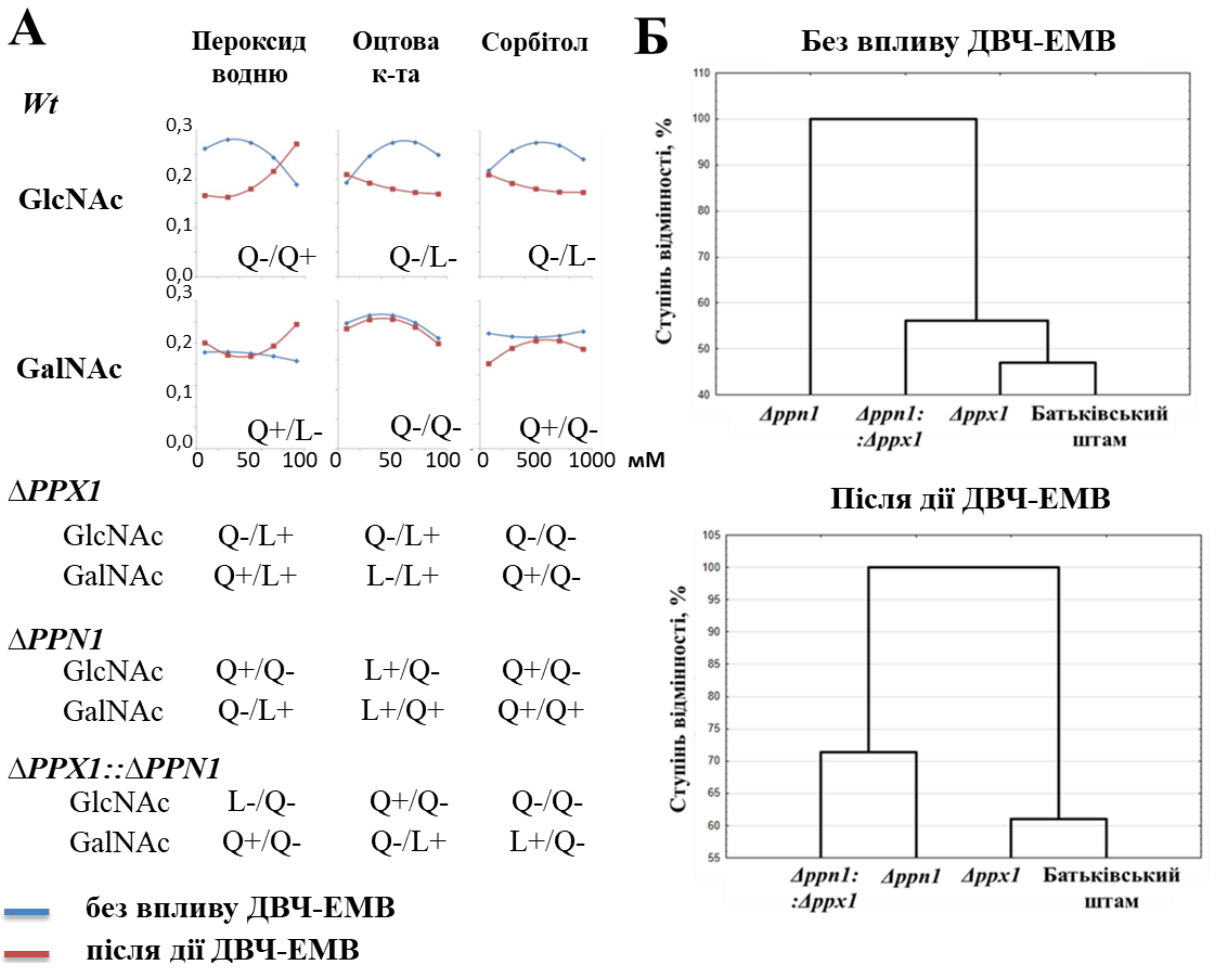


Рис. 4.12. Вплив електромагнітного випромінювання ДВЧ-діапазону (40,68 МГц, 15 Вт, 30 хв) на вміст GlcNAc і GalNAc в клітинних стінках дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1.

Примітки: (А) - таблиця ефектів. Символ «/» розділяє ефекти без обробки (зліва) і після обробки (з права) ДВЧ-ЕМВ. (Б) – Кластеризація штамів дріжджів за ступенем подібності доза-залежних кривих.

Таблиця 4.4.

Кореляційні залежності (*R*, %) між рівнем життєздатності (за КУО) і показником нанотвердості клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами (PPN1 і PPX1) за дії факторів стресу і вмістом цукрів у клітинних стінках та позаклітинному матриксі

Показник	Життєздатність, КУО				Нано-твердість
	H_2O_2, 0,3мМ	H_2O_2, 10мМ	Оцтова к-та, 150мМ	Сорбітол, 1М	
Характер кривих дозової залежності					
GlcNAc	72	74	41	91	0
	p=0,28	*p=0,26*	*p=0,58*	*p=0,09*	0
GalNAc	-86	-83	92	64	0
	p=0,14	*p=0,17*	*p=0,08*	*p=0,36*	0
Цукри клітинної стінки					
Маноза	-39	-73	-56	-52	-66
	p=0,60	*p=0,27*	*p=0,44*	*p=0,48*	*p=0,34*
Глюкоза	33	63	65	47	40
	p=0,67	*p=0,37*	*p=0,35*	*p=0,53*	*p=0,60*
Глюкозамін	19	30	-22	15	74
	p=0,81	*p=0,69*	*p=0,78*	*p=0,85*	*p=0,25*
Цукрові залишки клітинної стінки (середні значення)					
Маноза /	-93	**-95**	**-98**	**-97**	-65
Глюкоза	*p=0,07*	***p=0,05***	***p=0,02***	***p=0,03***	*p=0,34*
***α*-Маноза /**	77	79	**99**	84	37
***α*-Глюкоза**	*p=0,23*	*p=0,21*	***p=0,02***	*p=0,15*	*p=0,62*
Галактоза	-61	-85	-81	-72	-62
	p=0,38	*p=0,16*	*p=0,18*	*p=0,27*	*p=0,38*
GlcNAc	-78	-56	-38	-68	-62
	p=0,22	*p=0,44*	*p=0,62*	*p=0,32*	*p=0,38*
GalNAc	91	94	68	90	**95**
	p=0,10	*p=0,06*	*p=0,317*	*p=0,10*	***p=0,05***

Продовження таблиці 4.4.

Показник	Життєздатність, КУО				Нано-твердість
	H_2O_2, 0,3мМ	H_2O_2, 10мМ	Оцтова к-та, 150мМ	Сорбітол, 1М	
5NANA	44	55	83	56	10
	p=0,55	*p=0,44*	*p=0,17*	*p=0,44*	*p=0,89*
Цукрові залишки клітинної стінки (медіанні значення)					
Маноза /	-85	-93	**-97**	-92	-63
Глюкоза	*p=0,15*	*p=0,07*	***p=0,03***	*p=0,08*	*p=0,36*
***a*-Маноза /**	54	18	49	46	-15
***a*-Глюкоза**	*p=0,46*	*p=0,83*	*p=0,51*	*p=0,53*	*p=0,84*
Галактоза	-46	-78	-54	-56	-77
	p=0,54	*p=0,22*	*p=0,46*	*p=0,43*	*p=0,22*
GlcNAc	-90	-83	**-99**	-93	-45
	p=0,10	*p=0,16*	***p=0,01***	*p=0,07*	*p=0,55*
GalNAc	77	79	42	73	**96**
	p=0,23	*p=0,21*	*p=0,57*	*p=0,27*	***p=0,04***
5NANA	37	48	78	49	02
	p=0,63	*p=0,52*	*p=0,21*	*p=0,51*	*p=0,97*
Цукрові залишки позаклітинного матриксу					
Маноза /	94	**99**	92	**98**	79
Глюкоза	*p=0,06*	***p=0,01***	*p=0,08*	***p=0,02***	*p=0,21*
***a*-Маноза /**	-85	-88	-56	-83	**-96**
***a*-Глюкоза**	*p=0,15*	*p=0,12*	*p=0,43*	*p=0,17*	***p=0,04***
GlcNAc	68	86	48	70	**99**
	p=0,32	*p=0,14*	*p=0,52*	*p=0,29*	***p=0,01***
GalNAc	40	44	-04	34	81
	p=0,59	*p=0,56*	*p=0,95*	*p=0,66*	*p=0,19*
5NANA	-58	-77	-35	-60	**-98**
	p=0,41	*p=0,23*	*p=0,65*	*p=0,40*	***p=0,02***

Виходячи з виявлених кореляційних залежностей, ключовими, для забезпечення життєздатності, цукрами можна вважати манозу/глюкозу, глюкозамін і галактозамін: зменшення пулу D-манози/D-глюкози у КС і, вочевидь, одночасне збільшення її у ПКМ, наряду із зменшенням пулу глюкозаміну і збільшенням пулу галактозаміну у КС відповідає більшій стійкості клітин дріжджів до дії кислотного стресу, оксидативного стресу і гіпертонічного шоку (Рис. 4.13).

Водночас вміст галактозаміну в клітинній стінці, а також глюкозаміну і нейрамінової кислоти у ПКМ, визначають величину нанотвердості клітин дріжджів, яка показала високий (97,7% при $p \leq 0{,}023$) кореляційний зв'язок із життєздатністю клітин.

Роль ферментів полі(Ф)аз полягає, перш за все, у підтримці пулу глюкозаміну в клітинній стінці, адже дефектність за цими ферментами призводить до зменшення його вмісту, що, ймовірно, позитивно впливає на стійкість клітин до дії факторів стресу. По-друге, обидві полі(Ф)ази знижують

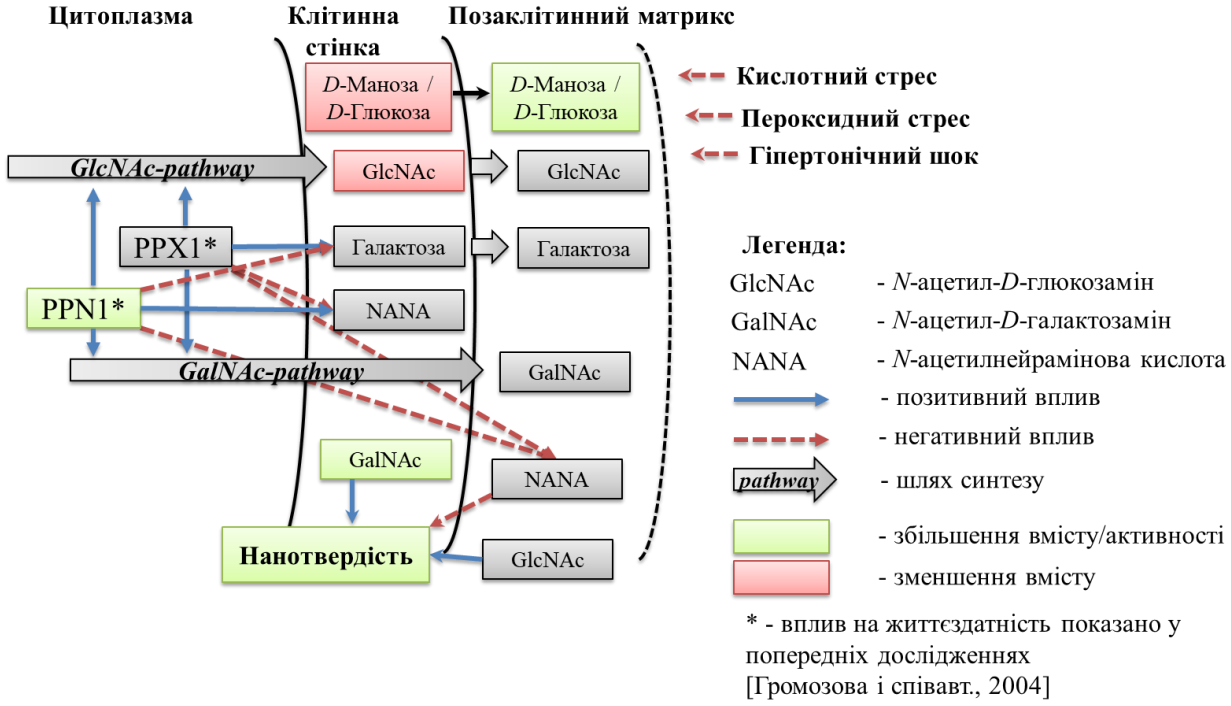


Рис. 4.13. Схема формування стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу через активність полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 і вміст цукрів в клітинних стінках і позаклітинному матриксі.

вміст нейрамінової кислоти в ПКМ, що позитивно впливає на показник нанотвердості (98% при $p = 0{,}017$), і, відповідно, при їх делеції, вміст нейрамінової кислоти у ПКМ збільшується, а вміст глюкозаміну зменшується, що разом призводить до зниження показнику нанотвердості. Таким чином, дефектність за полі(Ф)азами впливає на розподіл і вміст мінорних складових (вуглеводнів) КС і ПКМ, які виявляють високі кореляційні зв'язки із показниками життєздатності і нанотвердості клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами і їх стійкістю до дії факторів стресу, а це вказує на важливу роль полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

4.1.3. Зміни в складі білків за дії факторів стресу

4.1.3.1. Профілі загального білку клітин дріжджів і білків клітинної стінки

Аналіз електрофоретичних профілів загального клітинного білку розділеного за молекулярною вагою (в діапазоні 5-150 кДа) методом SDS-PAGE не показав відмінностей між клітинами батьківського штаму і клітинами дефектними за полі(Ф)азами. Профілі загального клітинного білку також не дозволили винайти відмінності між клітинами дефектними за полі(Ф)азами й після дії на клітини дріжджів факторів стресу. Очевидно, що фактори стресу викликають активацію синтезу одних білків (білків-стресу) й пригнічення синтезу інших, однак такі зміни не відображаються на отриманих нами білкових профілях, що вказує на досить «грубу» оцінку, яку надає такий підхід. Так само й дефектність за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1, навіть, якщо й має вплив на синтез окремих білків, то на загальних білкових профілях це не може бути об'єктивно виявлено.

Зважаючи на те, що ми виявили зміни у полісахаридному профілі КС і деякі з виявлених змін (такі як зменшення вмісту галактози) можуть опосередковано вказувати на зниження вмісту у КС мутантних штамів GPI-

білків (які асоційовані з мананом), тому ми зосередили увагу на більш детальному аналізі окремих структурних компонентів клітин дріжджів із акцентом на білках КС. GPI-білки це білки які приймають участь не лише у формуванні КС, але й забезпечують стійкість клітини до дії різноманітних чинників, наприклад хітинтрансглікозилази (Crh1/2p), приймають участь у транспорті і зв'язуванні хітину [471], а глюканозилтрансфераза (Gas1p), приймає участь не лише у побудові КС, але у формуванні клітинами відповіді на пошкодження ДНК [472]. В свою чергу білок Cwp1p, розташований у місцях брунькування, забезпечує стійкість до пропіонової кислоти [104]. Є низка білків, функція яких ще не встановлена, наприклад Ecm33p.

Поряд із GPI-білками, іншою вагомою фракцією білків КС, є білки з чутливими до лугів зв'язками (ASL-білки, від англ. «*alkali-sensitive linkage*»), які, разом із GPI-білками, також розташовані на зовнішній поверхні КС і приймають участь у адгезії, забезпеченні вірулентності, морфогенезі, формуванні біоплівки, тощо [473, 474].

В цілому фракція білків КС, яка становить близько 4% від загальної маси КС, представлена більш як 20 білками, кількісний вміст яких, суттєво варіює залежно від умов фізіолого-біохімічного характеру (фази клітинного циклу, наприклад), так і умов оточуючого середовища (кислотність, тонічність, тощо) [475]. Припускають, що білки КС формують моношар на зовнішній стороні КС, який рівномірно і досить щільно розподілений по поверхні, а тому загальна кількість білків може бути визначена виходячи із інформації щодо площі поверхні, в середньому ж кількість білків становить близько 31×10^3 молекул/мкм^2 [475].

Проведений нами порівняльний аналіз білкових профілів КС в клітин дефектних за полі(Ф)азами за фракціями білків із луго-чутливими зв'язками (ASL-білки) й чутливими до детергентів, таких як SDS (білки з дисульфідними чи нековалентними (NCL-білки, від англ. «*noncovalent linkage*») зв'язками), показав, що відсутність полі(Ф)аз призводить до підвищеного вмісту лугочутливих білків (Рис. 4.14) і білків, які мають слабкі нековалентні або

дисульфідні зв’язки (Рис. 4.15) [476]. ASL-білки переважать кількісно білки другого типу (NCL-білки) і особливо в клітинах із подвійною делецією (Рис. 4.14). Фракція ASL-білків в клітинах батьківського штаму нараховує щонайменше 13 білків із молекулярною масою 15-200 кДа, з кількісним домінуванням білків із молекулярною масою близько 55 кДа. Домінування білків із масою 50 кДа є характерним для клітин сахароміцетів [475].

Клітинні стінки Δ*ppx1*-клітин і клітин подвійного мутанта мають більшу кількість ASL-білків (Рис. 4.14), які представлені в діапазоні мас від 5 кДа до 150 кДа із превалюванням білків із молекулярною масою до 37 кДа. Клітинні

Кореляційні індекси (%) і кластерний аналіз:

Штам	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1*::*Δppx1*
Wt	-	68 *p=0,01*	52 *p=0,01*	16 *p=0,01*
Δppn1	68 *p=0,01*	-	49 *p=0,01*	3 *p=0,55*
Δppx1	52 *p=0,01*	49 *p=0,01*	-	31 *p=0,01*
Δppn1: :*Δppx1*	16 *p=0,01*	3 *p=0,55*	31 *p=0,01*	-

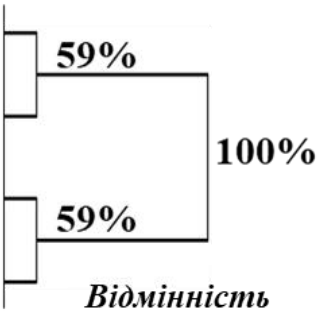
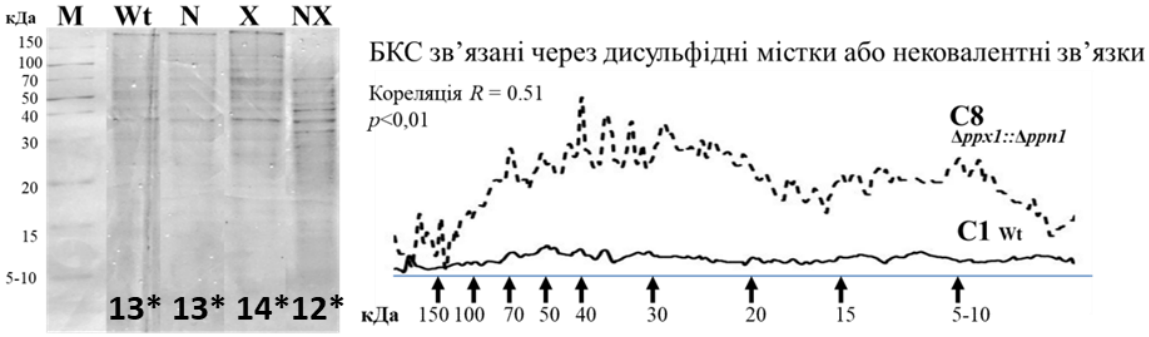


Рис. 4.14. Профілі білків із чутливими до лугів зв’язками в клітинних стінках дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Примітка: «Wt» – білки з клітин батьківського штаму, «N», «X» і «NX» – білки з клітин дефектних за полі(Ф)азами PPN1, PPX1 і клітин з подвійною делецією, відповідно. «БКС» - білки клітинних стінок. «М» – маркер молекулярної маси білків (у кДа). «*» - цифра вказує кількість полос на трекові.

стінки клітин дефектних за PPN1 мають близько 12 білків, що є кількісно близьким до клітин батьківського штаму, однак максимум припадає на білок із молекулярною масою близько 37 кДа.

Фракція NCL-білків в клітин батьківського штаму представлена 13-тьма білками з масою від 30 кДа до понад 150 кДа, які в цілому співпадають білками виділеними з КС клітин з поодинокими делеціями (Рис. 4.15). Однак, в КС клітин подвійного мутанта виявлено цілу низку білків із молекулярною масою в діапазоні від 15 кДа до 70 кДа і максимумом близько 40 кДа. В КС клітин із подвійною делецією не виявлено білків із масою близько 85, 125 і 200 кДа,



Кореляційні індекси (%) і кластерний аналіз:

Штам	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*
Wt	-	19 *p=0,01*	60 *p=0,01*	51 *p=0,01*
Δppn1	19 *p=0,01*	-	23 *p=0,01*	39 *p=0,01*
Δppx1	60 *p=0,01*	23 *p=0,01*	-	23 *p=0,01*
Δppn1: *:Δppx1*	51 *p=0,01*	39 *p=0,01*	23 *p=0,01*	-

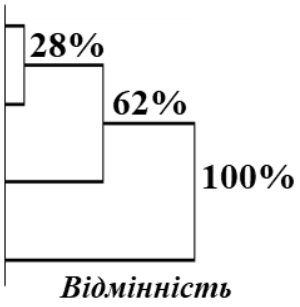


Рис. 4.15. Профілі білків із нековалентними зв'язками в клітинних стінках дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Примітка: «Wt» – білки з клітин батьківського штаму, «N», «X» і «NX» – білки з клітин дефектних за полі(Ф)азами PPN1, PPX1 і клітин з подвійною делецією, відповідно. «БКС» - білки клітинних стінок. «М» – маркер молекулярної маси білків (у кДа). «*» - цифра вказує кількість полос на трекові.

натомість є білки із масами близько 28, 35 і 45 кДа, яких немає в КС клітин інших штамів.

В цілому ж найменших відмінностей від клітин батьківського штаму набувають клітини дефектні за PPN1 (59% і 28%, щодо представленості білків ASL- і NCL-фракцій, відповідно). Проте кількісні співвідношення білків в КС цих штамів різні і ступінь подібності становить 68% для білків ASL-фракції і лише 19% для білків NCL-фракції. Білкові профілі клітин дефектних за PPX1, в тому числі клітин подвійного мутанту, були найбільш відмінними від клітин батьківського штаму. Такий результат вказує на те, що за відсутності PPN1 здебільшого відбуваються кількісні зміни серед вже наявних білків, в той час як дефектність за PPX1 призводить не лише до кількісних але й до якісних змін, тобто в структурі КС з'являються нові білки.

Проведений аналіз вказує на значну роль обох ферментів полі(Ф)аз у «наповненні» КС білками, однак, нажаль, він нічого не каже про те, які саме білки присутні в КС клітин дефектних за полі(Ф)азами. Тому, ми оцінили рівні експресії білків Flo11p і Cwp1p, які є вагомими компонентами КС [477]. Обидва білки відносяться до манопротеїнів [478] з родини GPI-білків. Flo11p – це білок з родини флокулінів (*Flo*-білки), який відповідає за формування псевдогіф, інвазійний ріст, адгезію, флокуляцію, формування біоплівки, утворення взаємозв'язків між клітинами у колоніях дріжджів [479]. Flo11p вважається основним білком, рівень експресії якого відповідає за морфотип дріжджових колоній [479]. Інший білок, Cwp1p – білок з родини *SRP1/TIP1*-білків, який разом із Cwp2p є основним манопротеїном КС, підтримує її стабільність і відіграє важливу роль у забезпеченні її проникності для різних хімічних агентів, в тому числі генотоксичних [480].

4.1.3.2. Експресія генів (*FLO11* і *CWP1*), що кодують білки клітинної стінки за дії факторів стресу

Експресія гену флокулінів FLO11

Рівні експресії гену *FLO11* (який кодує глікопротеїн розташований у клітинній стінці) показали штамоспецифічний характер і за однакових оптимальних умов культивування експресія *FLO11* у представників різних штамів сахароміцетів (дикого типу) відрізнялася майже в 8 разів. Найбільший рівень експресії був відмічений в клітинах штамів CRY ($2\text{-}\Delta\Delta C_t = 4{,}2$) і C3 ($2\text{-}\Delta\Delta C_t = 3{,}8$), а найменший – в клітинах штаму Y-517 ($2\text{-}\Delta\Delta C_t = 0{,}5$) (Рис. 4.16). Штамоспецифічність експресії *FLO*-генів є типовим явищем і високі рівні експресії відповідають більш високому вмісту відповідного білку на поверхні КС і збільшеній здатності до флокуляції, адгезії, тощо [479].

В клітинах дефектних за полі(Ф)азами рівні експресії *FLO11* були зниженими і найбільше (в 3-5 разів) пригнічення відмічене в Δ*ppn1*-клітинах,

FLO11	**Штам:**	**C3**	**C4**	**C8**	**C7**
	Генотип:	**Wt**	***Δppn1***	***Δppn1: :Δppx1***	***Δppx1***
Контроль		3,81	1,42	1,5	2,71
Пероксид гідрогену, 0,6 мМ		2,37	0,75	0,45	1,15
Оцтова кислота, 150 мМ		1,43	0,4	0,14	0,22
Сорбітол, 1 М		3,77	3	3,44	2,74
ЕМВ ДВЧ, 15Вт, 60хв		4,15	3,97	4,22	3,88
Ступінь відмінності, %			**17%**	**46%**	**100%**

Штам:	**CRY**	**CRN**	**Y-517**
Генотип:	**Wt**	***Δppn1***	**Wt**
Контроль	4,19	0,91	0,5
Пероксид гідрогену, 0,6 мМ	3,75	0,88	н/д
Оцтова кислота, 150 мМ	1,38	0,11	н/д
Сорбітол, 1 М	4,6	1,11	н/д
ЕМВ ДВЧ, 15Вт, 60хв	4,3	1,09	н/д

Рис. 4.16. Вплив стресових факторів на експресію гену *FLO11* (qRT-PCR). Наведено значення величини експресії ($2\text{-}\Delta\Delta C_t$).

при цьому цей ефект був характерним для клітин обох доступних нам штамів, які несуть відповідну дефектність (C5 і CRN), що вказує на пряму залежність між активністю ферменту PPN1 і експресією *FLO11*.

Дефектність за PPX1 також призводила до зниження активності цього гену, проте меншою мірою ніж дефектність за PPN1.

В клітинах з подвійною делецією рівень експресії *FLO11* гену був на рівні мутанта за PPN1, що, з одного боку, є додатковим свідченням на користь позитивної залежності між активністю PPN1 і експресією *FLO11*, а також, з іншого боку, вказує на відсутність, як реверсивного, так і кумулятивного ефекту делеції обох генів. Тобто за делеції PPN1, ймовірно відбуваються найбільші внутрішньоклітинні зміни (пов'язані із регуляцію експресії *FLO11*), на які дефектність за PPX1 вже не впливала.

Отриманий результат вказує на залучення обох ферментів у регуляцію синтезу *FLO11*. Зважаючи на те, що експресія генів полі(Ф)аз і *FLO11* регулюється різними операторами, то, ймовірніше за все, полі(Ф)ази опосередковано впливають на рівень експресії *FLO11*.

За дії таких стресових факторів, як оцтова кислота (150 мМ) і пероксид гідрогену (0,6 мМ) рівень експресії *FLO11* знижувався в клітинах усіх штамів незалежно від дефектності за полі(Ф)азами. Тоді як дія сорбітолу (1 М) і ЕМВ-ДВЧ (15 Вт, 60 хв.) призводили до підвищення експресії цього гену. Зменшення рівнів експресії *FLO11* за дії факторів стресу може бути пов'язано із активністю білку-регулятору транскрипції *SFL1*, який також називають білком пригнічення флокуляції і який пригнічує експресію генів біосинтезу флокулінів і активує експресію стрес-індукуємих генів за дії на клітини дріжджів факторів стресу [481]. Однак такий погляд залишає незрозумілим, чому в нашому дослідженні рівень експресії *FLO11* зростав в умовах гіпертонічності і за дії ЕМВ-ДВЧ.

На відміну від нормальних умов культивування, де клітини подвійного мутанта показали рівень експресії на рівні клітин дефектних за PPN1, за дії стресів (пероксиду гідрогену і оцтової кислоти) в клітинах подвійного мутанта рівень експресії цього гену знижувався додатково. Це вказує на кумулятивну

дію обох полі(Ф)аз на експресію *FLO11* за умов специфічного стресового навантаження. Дія ж сорбітолу і ЕМВ ДВЧ стимулювали експресію цього гену. Найбільший негативний вплив на експресію *FLO11* мала обробка клітин дріжджів оцтовою кислотою, а найменші зміни виявлені за дії пероксиду гідрогену. В цілому ж клітини подвійного мутанту повторювали зміни, які відбувалися в клітинах дефектних за PPN1, що вказує на провідну роль саме процесів зав'язаних на активності PPN1 в забезпеченні експресії *FLO11*.

Експресія гену CWP1

Рівні експресії гену *CWP1*, який кодує манопротеїн КС дріжджів, білок Cwp1, зменшуються в 1,5-2 рази клітинах дефектних за PPN1, включаючи клітини з подвійною делецією (Рис. 4.17). Дефектність за PPX1 не виявила впливу на експресію *CWP1* за нормальних умов культивування.

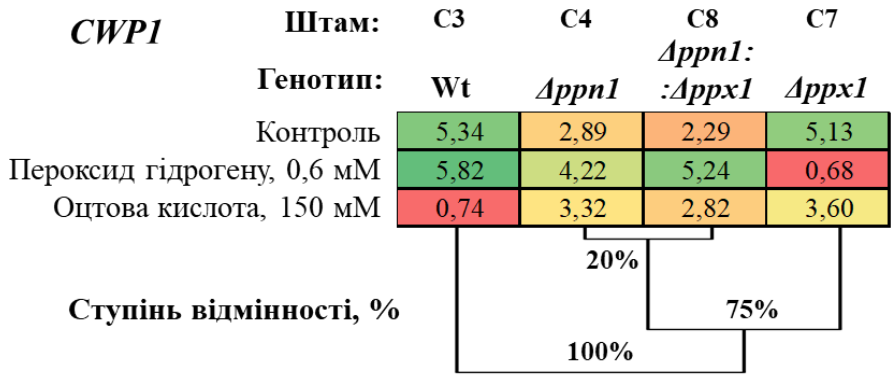


Рис. 4.17. Вплив стресових факторів на експресію гену *CWP1* (RT-PCR). Наведено напівкількісні значення величини експресії, отримані за даними денситограм при електрофоретичному розділенні продуктів ампліфікації.

За дії пероксиду гідрогену, рівень експресії *CWP1* в клітин батьківського штаму не змінювався, в той час як в клітинах дефектних за PPN1, відбувалося посилення експресії цього гену до рівню характерного для клітин батьківського штаму. Зворотній ефект спостерігали в Δ*ppx1*-клітин, в яких експресія *CWP1* знижувалася щонайменше в 5 разів.

За дії оцтової кислоти відбувалося пригнічення експресії *CWP1* в клітинах батьківського штаму і в Δ*ppx1*-клітинах, в той час як в клітинах дефектних за PPN1 (включаючи подвійний мутант) відмічена незначна стимуляція експресії

цього гену. Слід зазначити, що тривалий час вважали, що синтез *CWP1* посилюється за умов оксидативного стресу [482] однак, з часом були показані протилежні ефекти і хибність такої однобокої позиції [483], а тому експресія цього гену може як посилюватися, так і знижуватися, або ж лишатися незмінною, що, вочевидь, визначається й іншими показниками наряду із величиною pH-середовища [482].

Характер змін рівнів експресії *CWP1* в цілому співпадав із змінами рівнів експресії *FLO11*: по-перше, найбільші відмінності від клітин батьківського штаму відмічені для клітин дефектних за PPN1. По-друге, дефектність за PPX1 виявляє свою вагому роль за умов дії стресів і майже не проявляється за нормальних умов культивування. Рівні експресії *FLO11* і *CWP1* більшою мірою пригнічуються за дії оцтової кислоти, а ніж за дії пероксиду гідрогену. Однак на часі нами не виявлено достовірної кореляції між рівнями експресії цих генів за дії факторів стресу (табл. 4.5). Порівняння ж рівнів експресії з іншими визначеними показниками (моноцукровий склад КС і ПКМ, величина нанотвердості КС і стійкість клітин дріжджів до дії факторів стресу) показало

Таблиця 4.5.

Кореляція (*R*, %) між рівнями експресії генів *FLO11* і *CWP1* за дії факторів стресу

Ген		***FLO11***			
	Штам	***Wt***	**Δ*ppn1***	**Δ*ppx1***	**Δ*ppn1*::Δ*ppx1***
CWP1	***Wt***	75	71	73	61
		p=0,47	*p=0,50*	*p=0,48*	*p=0,58*
	Δ*ppn1*	-43	-48	-45	-59
		p=0,72	*p=0,67*	*p=0,70*	*p=0,59*
	Δ*ppx1*	45	50	47	61
		p=0,70	*p=0,66*	*p=0,68*	*p=0,58*
	Δ*ppn1*::Δ*ppx1*	-29	-34	-31	-46
		p=0,82	*p=0,78*	*p=0,79*	*p=0,69*

високу кореляційну залежність між величиною експресії цих генів і показником нанотвердості КС клітин дріжджів (99% і 97% при $p \leq 0,03$, відповідно для *CWP1* і *FLO11*) (Таблиця 4.6). Одночасно з цим виявлено високу (97-98% при $p \leq 0,03$) кореляційну залежність з вмістом *N*-ацетилглюкозаміну в ПКМ. Окрім того рівні експресії обох генів виявили зворотну залежність із вмістом *N*-ацетилнейрамінової кислоти. А експресія *CWP1* мала обернену залежність із рівнем манози/глюкози в ПКМ, і позитивну залежність з вмістом *N*-ацетилгалактозаміну КС.

Таблиця 4.6.

Кореляційні зв'язки (*R*, %) між рівнем експресії генів *CWP1* і *FLO11* із показником нанотвердості і вмістом цукрів в клітинних стінках та позаклітинному матриксі клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1

Показник	*CWP1*		*FLO11*	
Нанотвердість	**99**	***p=0,01***	**97**	***p=0,03***
Моноцукровий склад клітинної стінки (GC/MS):				
Маноза	-60	*p=0,40*	-64	*p=0,35*
Глюкоза	36	*p=0,64*	34	*p=0,66*
Глюкозамін	68	*p=0,31*	86	*p=0,14*
Моноцукровий склад позаклітинного матриксу (лектиновий тест):				
Маноза	85	*p=0,15*	62	*p=0,37*
***a*-Маноза/a-Глюкоза**	**-99**	***p=0,01***	-89	*p=0,11*
***N*-ацетилглюкозамін**	**97**	***p=0,03***	**98**	***p=0,03***
***N*-ацетилгалактозамін**	79	*p=0,21*	87	*p=0,13*
***N*-ацетилнейрамінова кислота**	**-94**	***p=0,06***	**-100**	***p=0,01***
Моноцукровий склад клітинної стінки (лектиновий тест):				
Маноза/Глюкоза	-73	*p=0,27*	-46	*p=0,54*
a-Маноза/a-Глюкоза	45	*p=0,55*	16	*p=0,83*
Галактоза	-61	*p=0,38*	-52	*p=0,48*
***N*-ацетилглюкозамін**	-71	*p=0,28*	-50	*p=0,49*
***N*-ацетилгалактозамін**	**98**	***p=0,02***	84	*p=0,16*
***N*-ацетилнейрамінова кислота**	14	*p=0,85*	-6	*p=0,94*

Таблиця 4.7.

Кореляційні зв'язки (*R*, %) між рівнем експресії генів *CWP1* і *FLO11* із показником життєздатності (за КУО) клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1

Ген і умови, в яких визначено рівні експресії	Фактори стресу							
	Пероксид гідрогену				Оцтова к-та		Сорбітол	
	0,3мМ		10мМ		100мМ		1М	
CWP1								
Контроль	82	*p=0,18*	**90**	***p=0,10***	57	*p=0,43*	81	*p=0,18*
Пероксид гідрогену, 0,6мМ	-81	*p=0,19*	-66	*p=0,33*	**-93**	***p=0,06***	-82	*p=0,17*
Оцтова к-та, 150мМ	17	*p=0,82*	-6	*p=0,93*	44	*p=0,55*	18	*p=0,82*
FLO11								
Контроль	53	*p=0,47*	72	*p=0,27*	27	*p=0,73*	54	*p=0,45*
Пероксид гідрогену, 0,6мМ	40	*p=0,60*	53	*p=0,46*	3	*p=0,96*	37	*p=0,63*
Оцтова к-та, 150мМ	8	*p=0,91*	21	*p=0,79*	-31	*p=0,68*	4	*p=0,96*
Сорбітол, 1М	-55	*p=0,45*	-27	*p=0,72*	-67	*p=0,33*	-53	*p=0,47*

Отриманий результат вказує на чітку залежність між синтезом окремих цукрів-компонентів КС і ПКМ із синтезом білків КС (щонайменше манопротеїнів з родини GPI-білків). Однак рівні експресії цих генів мають слабко виражені кореляційні залежності із стійкістю клітин дріжджів до дії факторів стресу (Таблиця 4.7) і найбільш достовірною була негативна (-93% при $p = 0{,}06$) залежність виявлена між рівнем експресії *CWP1* і стійкістю клітин дріжджів до дії оцтової кислоти.

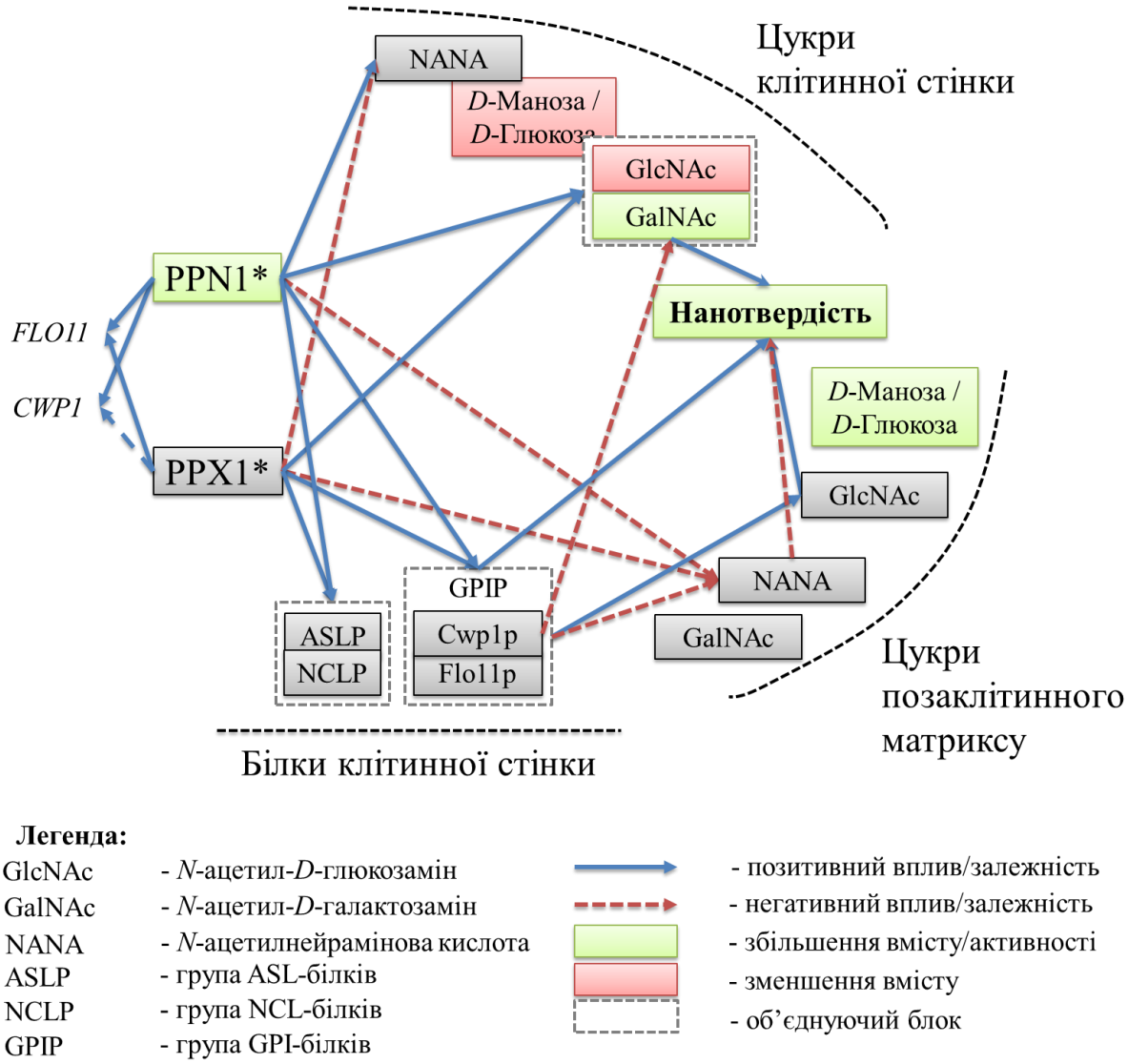
Зважаючи на те, що вміст окремих цукрів, виявляє високі кореляційні залежності із стійкістю клітин до дії факторів стресу, можна припустити, що білки (принаймні Cwp1p і Flo11p) не мають ключової ролі у забезпеченні

стійкості клітин дріжджів до факторів стресу, натомість виявлені кореляційні залежності можуть бути опосередковані одночасними змінами, які відбуваються у складі цукрів КС і ПКМ проте не враховуються в різноманітних протеомних дослідженнях.

Узагальнення розділу

Будова КС клітин дріжджів (вуглеводна і білкова компоненти) знаходиться в прямій залежності від функцій, які виконують ферменти полі(Ф)ази PPN1 і PPX1 (Рис. 4.18). Зміни, які відбуваються в клітинній стінці, за відсутності одного з цих ферментів, або ж обох, стосуються не лише кількісних, але й якісних показників, і не лише на рівні структурної організації КС, але й на рівні експресії генів, що кодують відповідні структурні елементи КС (як мінімум її білкову складову). Це очевидним чином має відображатися на тих фенотипових проявах, які пов’язані із будовою КС, наприклад, адгезія, флокуляція, біоплівкоутворення, тощо.

Виявлені високі кореляційні залежності між рівнем експресії *FLO11* і *CWP1* із вмістом окремих вуглеводних компонент КС можуть вказувати на існування прямої залежності між біосинтезом цукрів і білків, які входять до складу КС. Однак, рівні експресії вивчених генів не виказали достовірної кореляційної залежності із стійкістю клітин до дії факторів стресу, а тому лише цукри можуть вважатися одним з чинників мікробної стійкості до дії різних стресових факторів. Роль же білків в цьому випадку є, вочевидь, опосередкованою, через зміну фізико-механічних властивостей КС, а саме через збільшення показнику нанотвердості.



Легенда:

GlcNAc	- *N*-ацетил-*D*-глюкозамін		- позитивний вплив/залежність
GalNAc	- *N*-ацетил-*D*-галактозамін		- негативний вплив/залежність
NANA	- *N*-ацетилнейрамінова кислота		- збільшення вмісту/активності
ASLP	- група ASL-білків		- зменшення вмісту
NCLP	- група NCL-білків		- об'єднуючий блок
GPIP	- група GPI-білків		

Рис. 4.18. Схема зв'язків між синтезом білків клітинної стінки і вмістом цукрів в клітинних стінках і позаклітинному матриксі.

Примітка: Кольором позначені ті ланки, які відіграють роль у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

4.2. Вплив факторів стресу на склад цитоплазматичної мембрани клітин дріжджів

Поряд із КС, іншою структурною одиницею, на яку покладено цілу низку життєвоважливих функцій, включаючи бар'єрну є цитоплазматична мембрана (ЦПМ). В структурі ЦПМ знаходяться білкові транспортні і ферментні системи (наприклад хітинсинтаза і глюкансинтаза), які приймають участь у формуванні компонентів КС, передачу сигналів з зовні, формування реакції на зміну умов зовнішнього середовища, поділ клітин, полярність, тощо [484, 485]. Усі GPI-білки (включаючи досліджені нами Cwp1p і Flo11p) зчеплені через фосфоліпідні хвости із верхнім шаром ЦПМ [486]. Інші ж структурні елементи (білки із луго-чутливим зв'язками (ASL-білки), а також полісахариди (манан, глюкан, хітин)) не мають безпосередніх зв'язків із ЦПМ, а відокремлені від неї периплазматичним простором [485]. Така структурна організація робить GPI-білки єдиною зв'язуючою ланкою між поверхнею КС і ЦПМ (можливо саме тому в їх арсеналі багато функцій і особливо важливою є функція передачі сигналів зовні).

Як і КС, ЦПМ є дуже лабільною і активно реагує на зміни у оточуючому середовищі. Якщо, КС здебільшого асоціюється з пасивним захистом, каркасним елементом, тощо, то ЦПМ вважається елементом активного захисту. Основними структурними елементами ЦПМ є ліпіди, стероли і білки. В нашій роботі було досліджено склад жирних кислот клітинних мембран і вміст стеролів в аспекті формування клітинами дефектними за ферментами полі(Ф)азами відповіді на дію факторів стресу.

4.2.1. Вплив факторів стресу на склад жирних кислот

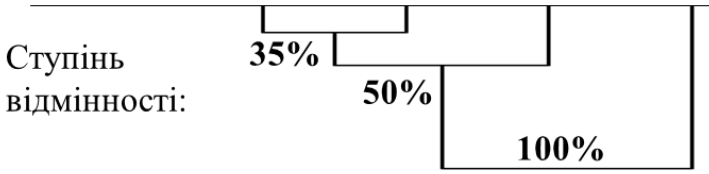
4.2.1.1. Профілі жирних кислот клітин дріжджів

Аналіз жирних кислот (ЖК) виділених з клітин різних штамів дріжджів показав наявність двох насичених ЖК (пальмітинова C16:0 і стеаринова C18:0), а також двох мононенасичених ЖК (пальмітолеїнова *cis*-Δ^9 C16:1 і олеїнова *cis*-Δ^9 *C18:1*) (Рис. 4.19) [487, 488]. Ці кислоти є типовими для клітин сахароміцетів

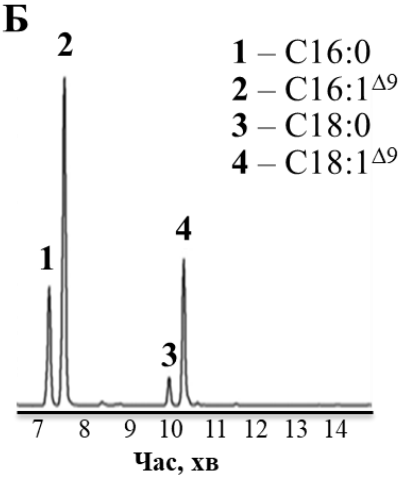
[489]. Більшість досліджених штамів дріжджів містили близько 83-85% мононенасичених ЖК, в той час як штам дикого типу Y-517 мали найменший вміст цих ЖК (74%). Однак, такі відмінності є типовим для даного виду мікроорганізмів, адже вміст ненасичених ЖК в клітинах різних штамів

А

Жирна кислота	Wt	*Δppn1*	*Δppx1: :Δppn1*	*Δppx1*
C16:0	60,4±1,1	59,3±1,8	60,1±0,9	61,1±1,3
C16:1$^{\Delta 9}$	13,4±1,0	13,8±1,0	13,1±1,2	14,3±0,5
C18:0	24,0±0,9	24,0±1,1	24,1±2,2	22,5±1,3
C18:1$^{\Delta 9}$	1,8±0,3	2,0±0,4	1,7±0,2	1,3±0,2
UFA	84,4±1,1	83,5±1,5	84,2±1,2	83,6±1,3
SFA	15,2±0,7	15,7±0,8	14,8±0,9	15,6±0,4



Б



В

Жирна кислота	Wt CRY	*Δppn1* CRN	*Δppn1* CRX	*Δppn1* CNX	Wt Y-517
C16:0	60,7±2,3	59,2±1,7	61,1±1,9	61,0±2,1	36,2±0,8
C16:1$^{\Delta 9}$	13,0±1,2	13,1±0,6	12,2±0,9	13,9±0,8	17,3±1,0
C18:0	24,5±2,2	25,3±1,1	24,7±0,9	22,9±1,0	38,1±1,3
C18:1$^{\Delta 9}$	1,4±0,1	1,6±0,3	1,6±0,1	1,8±0,3	7,3±0,5
UFA	85,2±2,1	84,5±1,5	85,8±1,5	83,9±1,8	74,3±1,1
SFA	14,4±1,0	14,9±0,5	13,8±0,7	15,8±0,7	24,6±0,8

Рис. 4.19. Вміст жирних кислот (%) в клітинах дріжджів *S. cerevisiae* дефектних за генами полі(Ф)аз PPN1 і PPX1.

Примітки: (А і В) - Середні значення ± стандартне відхилення щодо вмісту жирних кислот в різних штамів дріжджів. (Б) – Піки відповідних жирних кислот при їх хроматографічному розділенні. «UFA» і «SFA» - відповідно, ненасичені і насичені жирні кислоти.

S. cerevisiae може варіювати в досить широкому діапазоні: від 57% [490] до 83% [491]. ЖК з менш ніж 14 і понад 20-тьма атомами вуглецю, які іноді виявляються в мінорних кількостях (менше 1%), в нашому випадку виявлені не були.

Незначні відмінності між штамами дикого типу і, відповідними, делеційними мутантами не були достовірними. Однак кластерний аналіз показав певну тенденцію до збільшення вмісту C16:0, із одночасним зменшенням вмісту C18:0 і *cis*-Δ^9 C18:1, в клітинах дефектних за PPX1. При цьому клітини із подвійною делецією обох полі(Ф)аз наближаються до клітин дефектних за PPN1 і разом є найбільш близькими за профілями до клітин батьківського штаму.

Вміст ЖК і їх співвідношення є показником динамічним, який, вочевидь, залежить від стадії росту клітин, фази клітинного циклу, змін у оточуючому середовищі, тощо. Аналіз часової залежності (динаміки) змін у складі жирних кислот показав, що як загальна кількість жирних кислот в клітинах дріжджів, так і співвідношення насичених ЖК до ненасичених ЖК є величинами динамічним. Вміст жирних кислот в перерахунку на вологу вагу клітин змінювався в діапазоні від 1,0 нМ/мг до 1,6 нМ/мг вже через 60 хв від моменту перенесення клітин в гіпотонічні умови (дистильована вода). Кількість ЖК зростала і максимум (2,0 нМ/мг) спостерігали на 40-ву хв від початку експозиції (Рис. 4.20).

Співвідношення ненасичених до насичених ЖК також зростало від 2,7 до 3,3, що відповідало збільшенню на 8% фракції ненасичених ЖК по відношенню до насичених ЖК. Співвідношення C16:x до C18:x залишалося відносно стабільним із середнім значенням 1,19 ± 0,08. Однак слід зазначити, що протягом перших 30 хв інкубації це співвідношення було в межах 1,24-1,27, тоді як у наступні хвилини воно знизилось до 1,12-1,13.

Нестача в середовищі фосфору має значні наслідки на синтез ЖК і вміст їх у ЦПМ [492], однак дефектність за полі(Ф)азами і, відповідно, зміни пулу клітинних полі(Ф) не виказали достовірного впливу на ці процеси.

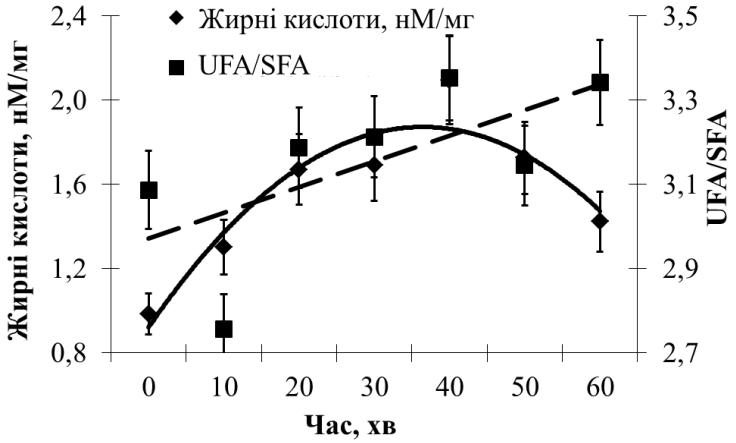


Рис. 4.20. Зміни загального вмісту жирних кислот (ромби) і співвідношення ненасичених жирних кислот до насичених жирних кислот (квадрати, UFA/SFA) в клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 в умовах гіпотонічного стресу. Показано середні значення і стандартне відхилення, а також апроксимуючі криві.

4.2.1.2. Індивідуальна дія факторів стресу на склад жирних кислот

Вплив антибіотику ністатину на склад жирних кислот

Ністатин, фунгіцидний антибіотик з групи поліенів, взаємодіє з клітинами дріжджів складним чином, який характеризується залежністю від часу та дози [493]. В основному, вважається, що молекули ністатину мають високу спорідненість до ергостеролу [494] і необоротно зв'язуються з ним вже в мембранах [495]. Хоча біосинтез ліпідів та шляхи синтезу ергостеролу в клітинах дріжджів пов’язані [496], все ж за дії ністатину синтез стеролів не ушкоджується, а лише змінюється проникність ЦПМ. Саме тому ми обрали ністатин, як фактор, який викликає критичні зміни в проникності ЦПМ, для того, щоб дослідити, яким чином це впливає на вміст жирних кислот.

В нашому дослідженні ми оцінили кількісний вихід ЖК за дії ністатину протягом 60 хв. Динаміка змін показників загального вмісту ЖК, співвідношення ненасичених ЖК (UFA) до насичених ЖК (SFA) і співвідношення C16:x до C18:x, в цілому відповідала змінам відміченим в контрольній популяції (без ністатину) (Рис. 4.21А і Б). Відмінності полягали

лише у кількості ЖК, які виділялися з клітин дріжджів, адже загальна кількість ЖК зменшувалася із збільшенням концентрації антибіотику (Рис. 4.21В). Відмічений ефект був притаманний усім виявленим ЖК, однак ненасичені ЖК пригнічувалися сильніше ніж насичені ЖК, тобто співвідношення змінювалося в сторону збільшення (на 8%) пулу насичених ЖК (Рис. 4.21Г).

Отримані дані вказують на те, що в клітинах дріжджів за дії антибіотику ністатину синтез ЖК пригнічується, але не зупиняється. Помітне зменшення пулу ненасичених ЖК із збільшенням концентрації ністатину може призводити до зменшення текучості ЦПМ [497], що може бути адаптаційною реакцією з боку клітин, направленою на протидію ефектам дії ністатину.

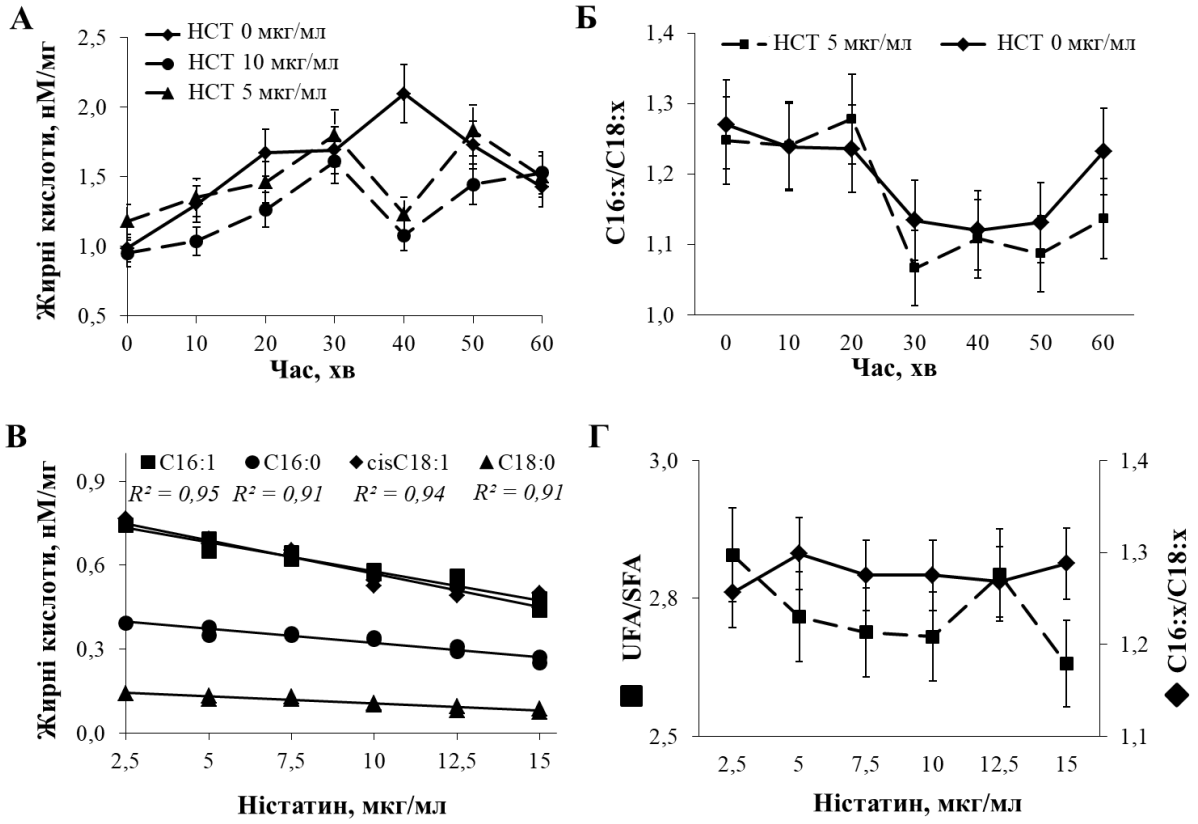


Рис. 4.21. Вплив ністатину на вміст жирних кислот (ЖК) в клітинах дріжджів. (А) – динаміка змін вмісту ЖК в клітинах протягом 60 хв впливу ністатину. (Б) – динаміка змін співвідношення С16:х до С18:х жирних кислот. (В) – вміст окремих ЖК через 10 хв дії ністатину. (Г) – співвідношення ненасичених (UFA) до насичених (SFA) жирних кислот і С16:х до С18:х через 10 хв дії ністатину.

Вплив електромагнітного випромінювання (40,68 МГц) на склад жирних кислот

Ми оцінили вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону (40,68 МГц, 30 Вт) на вміст ЖК в клітинах дріжджів, адже цей тип випромінювання, окрім того, що запускає процеси адаптивної відповіді, також збільшує проникність ЦПМ [20, 134, 420]. Клітини дріжджів піддавали дії радіочастотного електромагнітного випромінювання протягом 60 хв і перші 30 хв експозиції не виказали відмінностей за основними показниками між контрольною і дослідною групою (Рис. 4.22). Відмінності починалися з 40-вої хв, де кількість ЖК в опромінених клітинах зменшилася на 30% порівняно з контролем, однак в наступні 20 хв рівень ЖК знову збільшився і зрештою перевищив значення в котролі. При цьому співвідношення UFA/SFA та C16:x/C18:x не змінювалося за дії ЕМВ ДВЧ.

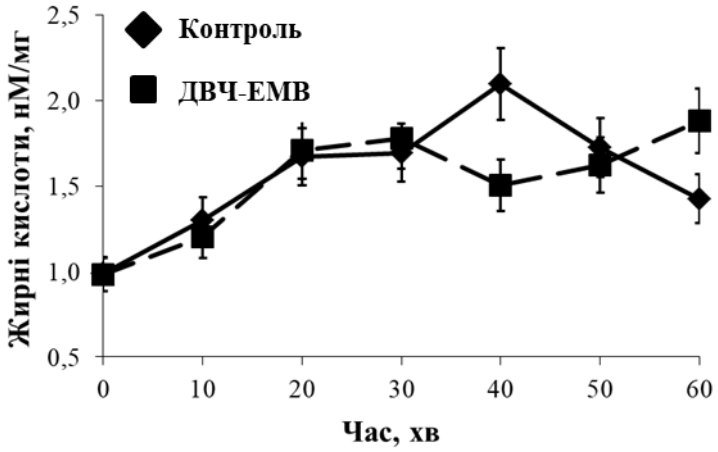


Рис. 4.22. Зміни загального вмісту жирних кислот в клітинах дріжджів за дії електромагнітного випромінювання (40,68 МГц, 30 Вт).

Отриманий результат вказує на незначні ефекти ДВЧ-ЕМВ на показник текучості ЦПМ. Зміни ж загального пулу ЖК за дії випромінювання можуть бути пов’язані із впливом на ростові процеси [179], а не на синтез ЖК як такий.

4.2.1.3. Вплив комплексу факторів стресу на склад жирних кислот

Комплексну дію зовнішніх факторів на синтез жирних кислот клітинами дріжджів вивчали за умов попередньої обробки клітин дріжджів ДВЧ-ЕМВ

(протягом 15, 30 і 45 хв) та послідуючої дії ністатину (5, 10 і 15 мкг/мл) за різної температури (28ºС, 37ºС і 46ºС). При аналізі отриманих результатів (Додаток 16) враховували наведені вище часові залежності вмісту ЖК в клітинах дріжджів. За результатом дисперсійного аналізу, комбінована обробка клітин дріжджів досліджуваними факторами призводила до збільшення виходу ЖК більше ніж на 50%. Цей ефект був пов'язаний із збільшенням пулу C16:1 і C18:x за дії опромінювання ($p \leq 0{,}034$), адже дія ністатину мала протилежний характер ($p < 0{,}012$) (Рис. 4.23). Така дія цих двох факторів добре узгоджується з індивідуальними ефектами ЕМВ та антибіотика описаними вище (Рис. 4.21 і Рис. 4.22) де було показано збільшення пулу ЖК із збільшенням експозиції ДВЧ-ЕМВ і зменшення пулу ЖК із збільшенням концентрації ністатину. Оптимальна температура для клітин дріжджів сахароміцетів – це 28ºС, і температура, як фактор стресу, за звичай призводить до збільшення текучості ЦПМ, що запускає процеси направлені на зменшення пулу ненасичених ЖК [497]. В нашому дослідженні співвідношення UFA до SFA коливалося в досить широкому діапазоні (1,7-3,2), що відображало збільшення на 13% частки UFA (від 63% до 76%). Так само змінювалося й співвідношення C16:x до C18:x ЖК від 1,12 до 2,05 в основному за рахунок збільшення долі C16:x FA (з 53% до 67%). Деякі, з відмічених змін показали залежності із дією ДВЧ-ЕМВ і ністатином, але не з температурою (Таблиця 4.8).

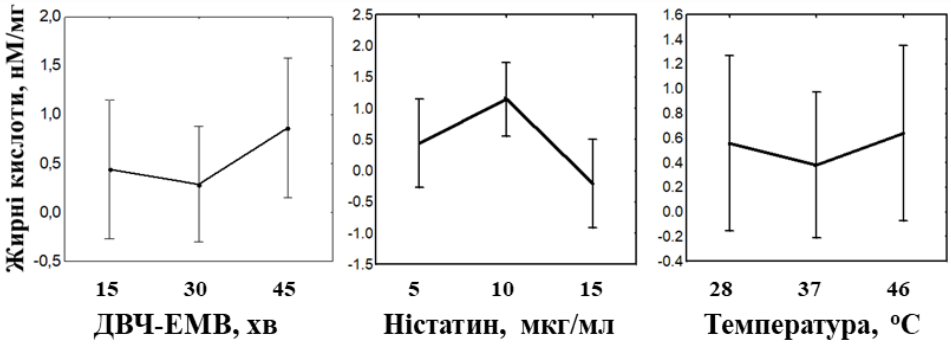


Рис. 4.23. Індивідуальні ефекти дії досліджених факторів на загальний вміст жирних кислот в клітинах дріжджів за результатом 3-х факторного експерименту за методом Бокса-Бенкена.

В свою чергу, відсутність достовірного впливу з боку температури і, одночасно, наявність достовірного ефекту з боку ДВЧ-ЕМВ, може бути ще одним доводом на користь того, що ефекти дії неіонізуючих ЕМВ мають, перш за все, нетермальний характер.

Отриманий результат вказує на те, що комплексна дія ДВЧ-ЕМВ і ністатину не залежить від температури. Однак при одночасній дії обох цих факторів, загальний вміст ЖК визначався концентрацією ністатину, а вміст С16:0 залежав від дії ДВЧ-ЕМВ. В свою чергу це вказує на те, що досліджені фактори мають різні механізми впливу на структуру і, відповідно, властивості ЦПМ.

Таблиця 4.8.

Показники вмісту жирних кислот, які виказали чутливість до дії факторів стресу за результатом 3-х факторного експерименту за методом Бокса-Бенкена

Фактори	С16:0, %	Жирні кислоти, нМ/мг
ДВЧ-ЕМВ, хв	-L* ($p \leq 0{,}03$)	н/в
Ністатин, мкг/мл	-L ($p \leq 0{,}07$)	Q** ($p < 0.01$)
Температура, ^{o}C	н/в***	н/в

** «-L» - негативний лінійний ефект; ** «Q» - нелінійний позитивний ефект; *** «н/в» - не виявлено впливу.*

Таким чином, відмічені зміни можуть впливати на стан ЦПМ, а саме на її текучість. Зміни ж ступеню текучості мембрани є первинним сигналом, який запускає процес адаптивної відповіді на рівні метаболізму жирних кислот [498–500]. Підвищення рівню ненасичених ЖК та зниження вмісту С16:0, наприклад, захищає клітини дріжджів від дії етанолу [499]. Виходячи з результатів власних досліджень, ми припускаємо, що ці ж показники можуть бути пов'язані з підвищеною стійкістю клітин дріжджів до антибіотиків поліенового та азолового ряду, що було відмічене у гіпотонічному середовищі та під впливом ДВЧ-ЕМВ [134].

Якщо казати про механізм, завдяки якому зміни у складі ЖК ЦПМ можуть сприяти підвищенню стійкості клітин до дії різних факторів стресу, то тут слід наголосити на ролі редокс-потенціалу, як основному внутрішньоклітинному чинникові, від якого залежить ефективність дії на клітину різних хімічних сполук (антибіотиків, токсинів, тощо), в тому числі й фізичних чинників (неіонізуюче і іонізуюче ЕМВ) [186, 501–503]. Внутрішньоклітинний окисний баланс відіграє чи не найважливішу роль в метаболізмі клітинних ліпідів, а також більшості інших структурних і функціональних одиниць клітин, синтезі ДНК, експресії генів, тощо [504]. Результати представлені в попередніх розділах вказують на те, що ДВЧ-ЕМВ впливає на редокс-потенціал, адже викликає зміни в активності ферментів дегідрогеназного комплексу (Рис. 3.19), яку визначали за допомогою трифенілтетразолію хлориду, який є одночасно й редокс-індикатором [134, 419]. Ефекти дії випромінювання, а також інших факторів стресу (кислотний, оксидативний і гіпертонічність) більшою мірою виявляють себе на клітинах дефектних за полі(Ф)азами, а тому й зміни, у будові ліпідної компоненти ЦПМ в таких клітин мають бути більш виразними. Однак, нажаль, цей аспект залишається досі не вивченим і є предметом наших подальших досліджень.

Вміст ЖК в клітинах дріжджів виявляє високі кореляційні залежності із життєздатністю клітин дріжджів за дії факторів стресу (Таблиця 4.9). Стійкість до пероксиду гідрогену, корелює із вмістом С16:х ЖК, а стійкість до оцтової кислоти і сорбітолу має обернену залежність із вмістом С18:х.

Жирні кислоти не виказують кореляційних зв’язків із показником нанотвердості, однак мають чисельні залежності із вмістом окремих цукрів в КС і ПКМ (Додаток 17). Так, маноза/глюкоза, галактоза і *N*-ацетилглюкозамін виявляють пряму залежність із вмістом С18 ЖК (86% – 99% при $p = 0{,}01$ – $p = 0{,}14$) і обернену залежність із вмістом С16 ЖК (-87% – -99% при $p = 0{,}01$ – $p = 0{,}14$). Окрім того виявлено досить високу (91%-94%, при $p = 0{,}06$ – $p = 0{,}09$) обернену залежність між вмістом *N*-ацетилнейрамінової кислоти і С18:1.

Таблиця 4.9.

Кореляція (*R*, %) між вмістом жирних кислот в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 і показниками їх стійкості до дії факторів стресу. «UFA» і «SFA» - сумарний вміст, відповідно, ненасичених і насичених жирних кислот

Фактор стресу	C16:0	C16:1$^{\Delta 9}$	C18:0	C18:1$^{\Delta 9}$	UFA	SFA
Пероксид гідрогену, 0,3мМ	69 *p=0,31*	89 *p=0,10*	-89 *p=0,10*	-67 *p=0,33*	-43 *p=0,57*	67 *p=0,33*
Пероксид гідрогену, 10мМ	91 *p=0,09*	65 *p=0,34*	-84 *p=0,15*	-80 *p=0,19*	-06 *p=0,93*	32 *p=0,68*
Оцтова кислота, 100мМ	83 *p=0,17*	80 *p=0,19*	**-99** ***p=0,01***	-93 *p=0,07*	-42 *p=0,57*	40 *p=0,60*
Сорбітол, 1М	79 *p=0,21*	85 *p=0,15*	-93 *p=0,07*	-77 *p=0,22*	-36 *p=0,64*	56 *p=0,44*

Такі високі кореляційні індекси між вмістом ЖК в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами і їх стійкістю до факторів стресу, а також із будовою КС й експресією генів, вказують на тісний зв'язок між структурною організацією КС і вмістом ЖК в клітинах дріжджів. Згідно результатам кореляційного аналізу вагоме значення для забезпечення стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу, перш за все, має вміст окремих жирних кислот, а не їх групи, як то насичені чи ненасичені. По-друге, вагоме значення мають зовсім незначні (до 8%) зміни кількісного вмісту окремих ЖК.

4.2.2. Вплив факторів стресу на вміст стеролів в клітинах дріжджів

4.2.2.1. Профілі стеролів клітин дріжджів

Поряд із жирними кислотами, основними структурними елементами клітинних мембран є стероли. Основним представником в мембранах дріжджів

є ергостерол, який забезпечує міцність мембрани і знижує її текучість і проникність для різних інших сполук, він приймає участь у передачі сигналів, процесах проліферації, але й окрім іншого відіграє значну роль у адаптації клітин дріжджів і їх стійкості до дії факторів стресу [505]. Шлях біосинтезу ергостеролу є енергозатратним і потребує 24 молекули АТФ і 16 молекул НАДФН, включає майже два десятки основних етапів перетворення і потребує експресії більше двох десятків генів [505, 506].

Основний відсоток від загального пулу стеролів, визначених в клітинах дріжджів, становив ергостерол. Вміст цієї сполуки в клітинах батьківського штаму (*Wt*) становив 61,8% (Таблиця 4.10). В клітинах дефектних за полі(Ф)азами вміст ергостеролу зростав і досягав максимуму (72%) в Δ*ppx1*-клітинах. Загальний профіль стеролів показав, що клітини дефектні за PPN1 мають найменшу ступінь відмінності від клітин батьківського штаму (33% і 68% за кількісним і відсотковим вмістом, відповідно). Клітини ж дефектні за PPX1 були найбільш відмінними від клітин батьківського штаму і Δ*ppn1*-клітин.

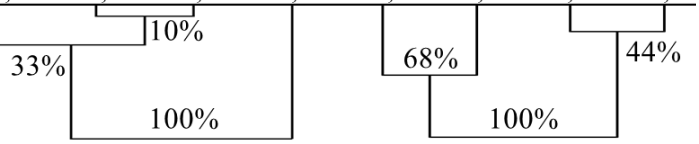
Основна відмінність Δ*ppn1*-клітин полягала у високому вмісті сполуки Silane,[[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-, який у 4 рази був вищим, ніж в клітинах батьківського штаму (4,8% проти 1,1%, відповідно) і в 8-10 разів вищий, ніж в клітинах інших мутантів (Таблиця 4.10). Ця сполука є структурно близькою до зимостеролу і використовується в композиціях для лікування раку та інших супутніх захворювань [507]. Накопичення цієї сполуки може вказувати на уповільнення процесів її перетворення на шляху синтезу ергостеролу, що вказує на порушення, але не блокування цього метаболічного шляху, адже синтез ергостеролу не припиняється і його вміст в Δ*ppn1*-клітинах відповідає рівню в *Wt*-клітинах. Зважаючи на такий значний результат, ми перевірили вміст цієї сполуки в Δ*ppn1*-клітинах іншого штаму (CRN) де виявили ще більшу різницю із клітинами відповідного батьківського штаму (CRY): 0,8% проти 0,01%, відповідно. Це вказує на те, що фермент PPN1

Таблиця 4.10.

Вміст стеролів в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1. Результати аналізу методом GC-MS.

(Кольором виділено максимальні величини для кожної окремої сполуки)

t_R, хв	Назва сполуки	QD, %	Вміст сполуки, мкг/мг				Вміст сполуки, %			
			Wt	*Δppn1*	*Δppn1::Δppx1*	*Δppx1*	*Wt*	*Δppn1*	*Δppn1::Δppx1*	*Δppx1*
11,4	Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-cholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	99	1,86	1,92	2,09	2,87	8,6	7,5	8,0	7,4
11,9	**Ergosterol; Silane, (ergosta-5,7,22-trien-3.beta.-yloxy)trimethyl-**	**99**	**13,29**	**16,86**	**17,76**	**27,83**	**61,8**	**65,7**	**67,9**	**71,8**
12,3	Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	99	0,24	1,22	0,15	0,17	1,1	4,8	0,6	0,4
12,6	Ergostatetraenol, trimethylsilyl	97	0,10	0,11	0,06	0,04	0,4	0,4	0,2	0,1
12,8	Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	86	1,10	1,00	0,97	1,22	5,1	3,9	3,7	3,1
13,4	Silane, trimethyl[[(3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-4-methylcholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]-	56	2,26	2,58	2,65	3,78	10,5	10,1	10,1	9,8
13,9	5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-	99	0,26	0,28	0,18	0,43	1,2	1,1	0,7	1,1
14,5	Lanosterol; Silane, [[(3.beta.)-lanosta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	99	1,19	0,58	1,12	1,26	5,5	2,3	4,3	3,3
15,2	Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-4,4-dimethylcholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	98	0,21	0,11	0,18	0,13	1,0	0,4	0,7	0,3
	Сума		20,5	24,7	25,1	37,7	95,3	96,1	96,2	97,4
Ступінь відмінності:										



приймає участь у процесах хімічного перетворення принаймні деяких попередників ергостеролу.

Вміст інших сполук в Δ*ppn1*-клітинах в цілому зменшувався порівняно із *Wt*-клітинами і особливо це стосувалося двократного зменшення вмісту ланостеролу (2,3% проти 5,5%) і Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-4,4-dimethylcholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl- (0,4% проти 1,0%).

Дефектність за PPX1, характеризувалася нижчим відсотковим вмістом визначених стеролів із одночасним збільшенням вмісту ергостеролу на 10%. Такий результат вказує на активацію біосинтезу ергостеролу, що

підтверджується показниками кількісного аналізу, який демонструє фактично двократне збільшенням ергостеролу в Δ*ppx1*-клітинах (28 мкг/мг, проти 13 мкг/мг в *Wt*-клітин).

При подвійній мутації також відмічене зниження відсоткового вмісту більшості стеролів, що вказує на інтенсифікацію процесу біосинтезу ергостеролу, однак фактичні цифри кажуть про реверсивний характер подвійної мутації і за профілем кількісного вмісту стеролів клітини подвійного мутанта наближаються до Δ*ppn1*-клітин.

4.2.2.2. Вплив факторів стресу на склад стеролів клітин дріжджів

Дія таких факторів стресу як оцтова кислота, пероксид гідрогену і доксорубіцин (доксорубіцин було вивчено як фактор генотоксичної дії, для оцінки зв'язку між генотоксичністю і синтезом стеролів) знижують вміст ергостеролу в *Wt*-клітинах (Рис. 4.25). Натомість ДВЧ-ЕМВ не виказало достовірного впливу але мало виражений стимулюючий ефект при експозиції понад 10 хв. Оцтова кислота, доксорубіцин і опромінювання протягом 60 хв зменшували вміст ергостеролу в Δ*ppn1*-клітинах, а в Δ*ppx1*-клітинах такий ефект мав лише пероксид гідрогену, а оцтова кислота і доксорубіцин призводили до достовірного зростання рівню ергостеролу в цих клітинах. Клітини подвійного мутанту за характером реакцій на дію факторів стресу були більш схожими на Δ*ppn1*-клітини і в цілому виказували реверсивний фенотип.

Кореляційний аналіз показав, що рівень життєздатності клітин дефектних за полі(Ф)азами виявляє достовірну залежність із кількісним вмістом окремих стеролів (Таблиця 4.11). Рівень ергостеролу виявив високу кореляційну залежність (93% при $p = 0{,}07$) лише із стійкістю клітин дріжджів до дії оцтової кислоти. В той час як вміст двох інших стеролів (Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl- і 5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-) показав достовірно високі кореляційні індекси із стійкістю клітин дріжджів до всіх досліджених факторів стресу.

Таблиця 4.11.

Кореляційні індекси (*R*, %) між рівнем життєздатності клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 за дії факторів стресу і вмістом окремих стеролів

Стерол	Життєздатність (за КУО)			
	H_2O_2, 0,3мМ	**H_2O_2, 10мМ**	**ЛУК, 100мМ**	**Сорбітол, 1М**
Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-cholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	74 *p=0,26*	73 *p=0,27*	**97** ***p=0,03***	81 *p=0,19*
Ergosterol	69 *p=0,31*	62 *p=0,38*	93 *p=0,07*	74 *p=0,25*
Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	-16 *p=0,83*	-54 *p=0,46*	-41 *p=0,58*	-30 *p=0,69*
Ergostatetraenol	-33 *p=0,67*	-52 *p=0,47*	-74 *p=0,26*	-46 *p=0,53*
Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	**97** ***p=0,03***	**99** ***p=0,01***	90 *p=0,10*	**99** ***p=0,01***
Silane, trimethyl [[(3.beta.,4.alpha., 5.alpha.)-4-methylcholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]-	73 *p=0,27*	66 *p=0,34*	**95** ***p=0,05***	78 *p=0,22*
5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-	**97** ***p=0,03***	83 *p=0,17*	90 *p=0,10*	**96** ***p=0,04***
Lanosterol	37 *p=0,63*	71 *p=0,29*	55 *p=0,45*	49 *p=0,51*
Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-4,4-dimethylcholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	-27 *p=0,72*	9 *p=0,91*	-32 *p=0,67*	-21 *p=0,79*

На відміну від індивідуальної дії окремих факторів, вивчення дії комплексу факторів стресу (за планом Бокса-Бенкена для чотирьох факторів) показало, що пероксид гідрогену та оцтова кислота викликають лінійне дозо-залежне зменшення вмісту стеролів в усіх штамів дріжджів. Цілком ймовірно, що такий ефект міг би бути пов'язаний із загибеллю клітин, однак пряма кореляційна залежність між вмістом визначених сполук і показником життєздатності клітин дріжджів за дії різних факторів стресу була виявлена лише для сквалену, який є проміжною ланкою в синтезі стеролів, проте й така залежність була характерною лише для Δ*ppx1*-клітин і клітин подвійного мутанта (Рис. 4.24).

В багатофакторному експерименті, клітини батьківського штаму мали найбільшу чутливість до дії оцтової кислоти, тоді як Δ*ppx1*-клітини були найбільш чутливими до дії пероксиду гідрогену. В обох випадках це співпадало із ефектами індивідуальної дії досліджуваних факторів на вміст ергостеролу (Рис. 4.25). Кількісні зміни вмісту стеролів в Δ*ppn1*-клітинах не виявили достовірної залежності із рівнями стресових факторів. А вміст стеролів в клітинах подвійного мутанту знижувався (за кількома винятками) за дії оцтової кислоти та пероксиду гідрогену.

Отриманий результат, вказує на те, що навіть за одночасної дії кількох факторів, вміст стеролів в клітинах дріжджів визначається дією лише одного фактору з комплексу. В свою чергу, те, до якого саме фактору клітини дріжджів матимуть найбільшу чутливість, знаходиться в прямій залежності від полі(Ф)аз

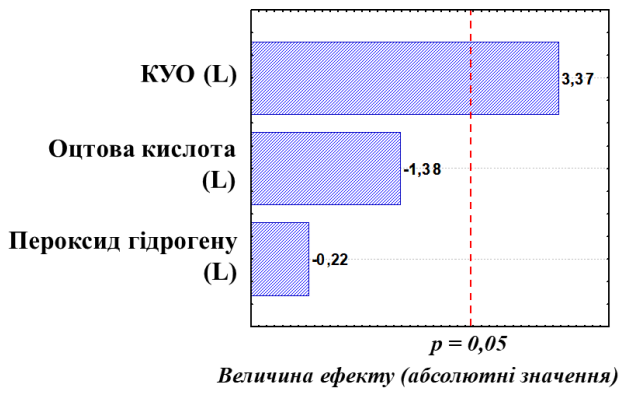


Рис. 4.24. Діаграма Парето впливу факторів стресу на вміст сквалену в клітинах *S. cerevisiae* дефектних за PPX1. Клітини дріжджів обробляли водними розчинами оцтової кислоти та пероксиду гідрогену (в концентраціях 0,01-100 мМ).

PPN1 і PPX1. Дефектність за полі(Ф)азами не перешкоджає, а, ймовірно, стимулює біосинтез стеролів в клітинах дріжджів, що впливає на кількісні характеристики і властивості мембран, а це, в свою чергу, виявляє високі кореляційні залежності із стійкістю/чутливістю клітин дріжджів до дії факторів стресу. Кожна з полі(Ф)аз має свій індивідуальний вплив на етапи синтезу

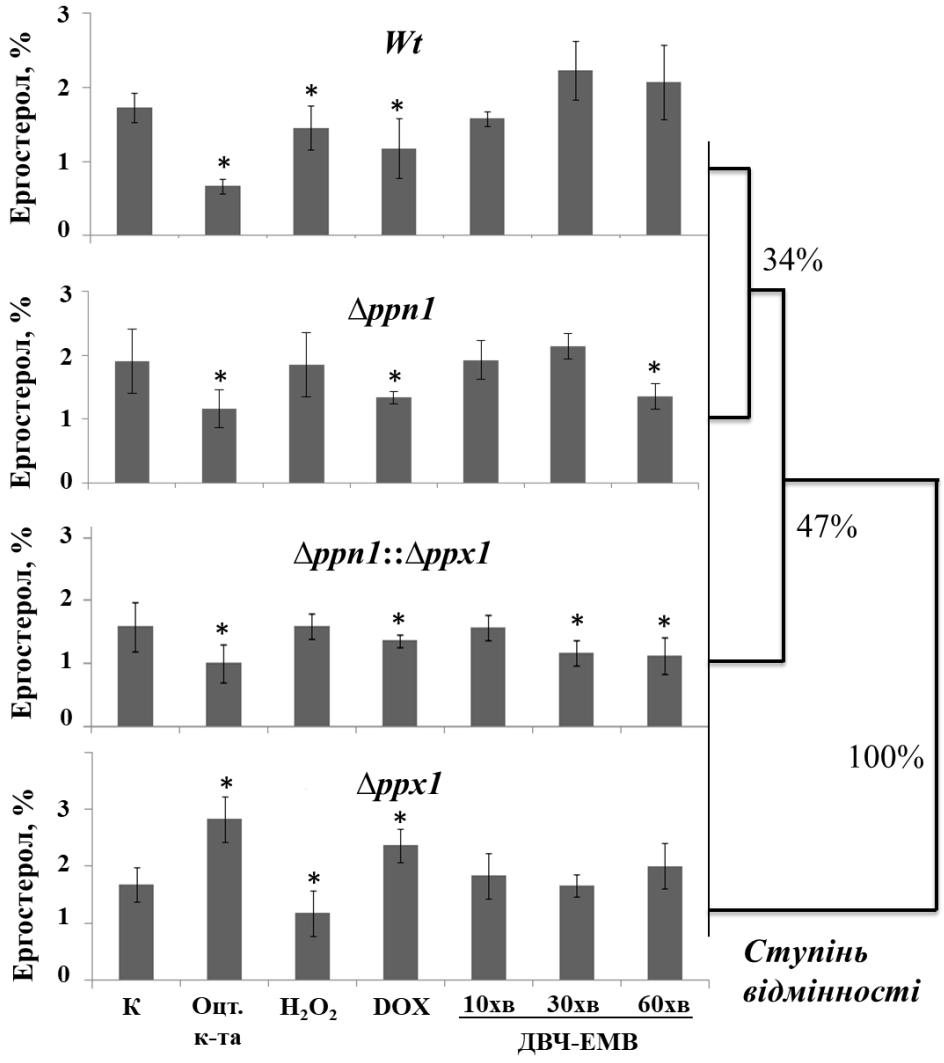


Рис. 4.25. Вміст ергостеролу (у %) в клітинах дріжджів *S. cerevisiae* дефектних за генами полі(Ф)аз *PPN1* і *PPX1* за дії факторів стресу. «К» - контроль. «Оцт.к-та» - за дії оцтової кислоти (0,1М). «H_2O_2» - за дії пероксиду гідрогену (0,3мМ). «DOX» - за дії доксорубіцину (35мкг/мл). «ДВЧ-ЕМВ» - за дії ультрависокочастотного електромагнітного випромінювання (40,68 МГц, 15 Вт) із тривалістю експозиції 10 хв, 30 хв і 60 хв, відповідно.

стеролів, однак деякі з ланок синтезу стеролів здебільшого реагують на дефектність за обома ферментами одночасно (як наприклад відсотковий вміст 5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-, який змінюється лише в клітинах із подвійною делецією (Таблиця 4.10)), а це означає, що функції ферментів полі(Ф)аз можуть, хоча б частково, але взаємно компенсуватися.

4.2.3. Вплив електромагнітного випромінювання (40,68 МГц) на експресію генів біосинтезу жирних кислот

Дефектність за полі(Ф)азами мала незначний вплив на вміст жирних кислот в клітинах дріжджів. Однак, навіть такі незначні зміни мають вагоме значення для забезпечення стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу. На противагу цьому, зміни у складі стеролів були досить суттєвими (статистично достовірними) і так само проявляють високі кореляційні залежності із стійкістю клітин дріжджів до дії факторів стресу. Вплив оцтової кислоти, пероксиду гідрогену, сорбітолу і навіть доксорубіцину очевидним чином мають викликати зміни у складі цих клітинних компонентів і ефекти їх дії легко прослідкувати за рівнем життєздатності клітин дріжджів, тощо. Проте наразі мало що відомо про механізми дії неіонізуючого електромагнітного випромінювання на клітини живих організмів і шляхи стимулювання ними процесів адаптивної відповіді. ДВЧ-ЕМВ не показало достовірного впливу на вміст жирних кислот в клітинах дріжджів і виказувало дещо протилежні за характером ефекти на вміст ергостеролу в *Wt*-клітинах і клітинах дефектних за полі(Ф)азами. Тому ми вивчили здатність ДВЧ-ЕМВ впливати на процеси біосинтезу жирних кислот на рівні експресії відповідних генів.

Біосинтез жирних кислот пов'язаний біохімічними шляхами із синтезом стеролів і при порушенні біосинтезу стеролів відбуваються зміни й в експресії генів, що відповідають за синтез жирних кислот (*ELO1, OLE1* і *FAS1)* [508, 509]. Чи є такий зв'язок прямим наслідком порушення біосинтезу стеролів, чи опосередкований іншими внутрішньоклітинними процесами, залишається невідомим. Ген *OLE1* кодує дельта(9)-десатуразу жирних кислот, яка є

необхідною для синтезу мононенасичених жирних кислот і для нормального розподілу мітохондрій при клітинному поділі [326]. Делеція даного гену призводить до зменшення накопичення олеїнової і пальмітолеїнової кислот і при цьому збільшується чутливість до похідних сквалестатину і хлориду цинку [510]. Натомість при надекспресії відмічене підвищення пулу ненасичених жирних кислот і одночасне збільшення стійкості до етанолу [511].

Ген *ELO1* кодує елонгазу I, яка подовжує карбокисльні кінці ненасичених C12-C16 жирних кислот з утворенням C16-C18 жирних кислот. При зниженні експресії даного гену підвищується чутливість до різних факторів стресу (температурного шоку, метилметансульфонату, етанолу, тощо) [512, 513]. При надекспресії стимулюються ферментативні процеси [514] і підвищується стійкість до етанолу [512].

Ген *FAS1* кодує бета-субодиницю синтетази жирних кислот, яка входить до комплексу, що забезпечує синтез довголанцюгових насичених жирних кислот. При пригніченні його активності відбувається зменшення накопичення стеридів [515], які є продуктами реакції естерифікації між 3-гідроксильною групою ергостеролу з карбоксильною групою будь-якої карбонової кислоти. При надекспресії відбувається накопичення жирних кислот середньої довжини ланцюга (C6 – C12) [516].

Рівні експресії *OLE1*, *ELO1* і *FAS1* є приблизно однаковими в клітинах різних штамів за оптимальних умов культивування, що, можливо, пояснює незначні відмінності між вмістом жирних кислот в цих клітинах (Рис. 4.26). Опромінювання клітин дріжджів ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 30 Вт, 60 хв) викликало майже двократне зниження рівню експресії гену *OLE1*, який кодує десатуразу жирних кислот і не впливало на рівень експресії інших двох генів (*ELO1* і *FAS1*). Незважаючи на таке суттєве зниження активності десатурази, профілі жирних кислот в клітинах дріжджів змінюються несуттєво. Зниження експресії гену *OLE1* за дії ДВЧ-ЕМВ також не не корелює із рівнем ергостеролу в клітинах дріжджів за дії жодного із стресів, а тому очевидно, що принаймні на цьому етапі процеси синтезу ЖК і стеролів не мають зв’язку.

Зміни в активності *OLE1* мали слабко виражену залежність із дефектністю клітин дріжджів за полі(Ф)азами, як в нормі, так і за дії ДВЧ-ЕМВ, а тому, вочевидь полі(Ф)ази не впливають на активність цих генів.

	OLE1		***ELO1***		***FAS1***	
	Контроль	ДВЧ-ЕМВ	Контроль	ДВЧ-ЕМВ	Контроль	ДВЧ-ЕМВ
Wt	1,78	0,85	1,45	1,32	2,99	3,29
Δppn1	1,88	1,04	1,31	1,43	2,83	3,14
Δppx1	1,72	1,08	1,44	1,66	2,78	2,60
Δppn1::Δppx1	1,72	0,82	1,35	1,44	3,10	2,90

Рис. 4.26. Вплив випромінювання ультрависокочастотного діапазону (40,68МГц, 30 Вт, 60 хв) на експресію генів *OLE1*, *ELO1*, *FAS1* (qRT-PCR). Наведено значення величини експресії ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Ген *FAS1* хоча й відноситься до "*housekeeping*" генів, синтез яких вважається конститутивним [517], однак він може бути активований, наприклад, дією інозитол/холін-активуємого фактору транскрипції Ino2p-Ino4p [518], або пригнічений, наприклад, при порушенні біосинтезу стеролів [508]. Надекспресія *FAS1* не впливає на синтез стеролів [509]. Зважаючи на ці дані зменшення рівня експресії *FAS1* може слугувати індикатором порушення біосинтезу стеролів, наприклад за дії антибіотиків азолового ряду [508]. Однак в нашому дослідженні експресія цього гену не змінювалася, а це доводить наше припущення, що зміни у кількісному вмісті ергостеролу, відмічені за дії ДВЧ-ЕМВ, відбуваються в рамках гомеостатичного потенціалу клітин.

Отриманий результат вказує на те, що процеси адаптивної відповіді, які запускаються в клітинах дріжджів після дії ДВЧ-ЕМВ можуть бути опосередковані зміною експресії деяких з генів, що відповідають за синтез ЖК (як мінімум гену *OLE1*). Це має незначний вплив на склад ЖК і не корелює із вмістом стеролів, але, як було показано вище, може виявитися ключовим для збільшення життєздатності клітин дріжджів за дії інших факторів стресу. Значне зменшення активності *OLE1* (яка є необхідною для синтезу насичених

ЖК) за дії ДВЧ-ЕМВ є дещо неочікуваним і не може бути наразі пояснене, адже дія ДВЧ-ЕМВ одночасно викликає зменшення пулу ненасичених ЖК (С16:0), в той час як вміст насичених ЖК (С16:1 і С18:1) збільшується.

Наступним вагомим результатом є відсутність змін активності *FAS1*, що вказує на індукцію адаптивних процесів в клітинах дріжджів на дію ДВЧ-ЕМВ не пов'язану із порушенням метаболічних процесів біосинтезу стеролів.

Узагальнення розділу

Отримані дані вказують на те, що вагому роль у забезпеченні стійкості клітин дріжджів відіграють не загальні показники, а вміст індивідуальних компонентів. Синтез жирних кислот і стеролів знаходиться під контролем великої кількості ферментативних і генетичних процесів, і деякі з них є спільними для обох біохімічних шляхів, що видно з кореляційних індексів між вмістом одних і других в клітинах дріжджів (Таблиця 4.12). Результати проведених досліджень вказують на те, що ферменти полі(Ф)ази також залучені до цього процесу і впливають як на вміст ЖК, так і на вміст стеролів. Дія стресових факторів призводить до незначних змін у складі ЖК і суттєво впливає на вміст стеролів, однак відмічені зміни не мають достовірної кореляції із показниками життєздатності, а тому, вочевидь, лише початкові концентрації цих сполук (на момент дії стресу) мають значення для виживання клітин, а все інше є наслідком адаптивних і репаративних процесів направлених на відновлення функціональної активності в змінених умовах.

Дефектність за PPX1 виявляє тенденцію до збільшення вмісту С16:0, із одночасним зменшенням вмісту С18:0 і С18:1 (Рис. 4.27). Одночасно з цим, менший вміст С18:0 відповідає більш високому вмісту стеролів (Рис. 4.27) і добре корелює із збільшенням стійкості клітин дріжджів до дії різних стресів і особливим чином стійкістю до кислотного стресу (Таблиця 4.9), яка є характерною для Δ*ppx1*-клітин (Рис. 3.16). Очевидно, що обидва показники (зменшення вмісту С18:0 і одночасне збільшення вмісту стеролів) є вагомими

Таблиця 4.12.

Кореляційні індекси (*R*, %) між вмістом жирних кислот і стеролів в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1

Стерол	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	UFA	SFA
1. Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-choles ta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	77 *p=0,23*	74 *p=0,26*	**-96** ***p=0,04***	-94 *p=0,06*	-47 *p=0,53*	31 *p=0,69*
2. Ergosterol	64 *p=0,36*	77 *p=0,23*	-94 *p=0,06*	-86 *p=0,17*	-61 *p=0,39*	39 *p=0,61*
3. Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	-82 *p=0,18*	19 *p=0,81*	32 *p=0,69*	70 *p=0,30*	-61 *p=0,38*	62 *p=0,37*
4. Ergostatetraenol	-79 *p=0,21*	-23 *p=0,77*	67 *p=0,33*	92 *p=0,08*	0 *p=0,99*	28 *p=0,72*
5. Silane, [[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	85 *p=0,15*	77 *p=0,23*	-90 *p=0,10*	-79 *p=0,21*	-23 *p=0,77*	46 *p=0,53*
6. Silane, trimethyl [[(3.beta., 4.alpha., 5.alpha.)-4-methyl cholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]-	66 *p=0,34*	80 *p=0,20*	**-96** ***p=0,04***	-87 *p=0,13*	-60 *p=0,40*	41 *p=0,58*
7. 5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-	61 *p=0,39*	**96** ***p=0,04***	-93 *p=0,07*	-68 *p=0,32*	-60 *p=0,39*	74 *p=0,26*
8. Lanosterol	92 *p=0,08*	-1 *p=0,99*	-46 *p=0,54*	-77 *p=0,23*	52 *p=0,47*	-45 *p=0,55*
9. Silane, [[(3.beta.,5.alpha.)-4,4-dimethylcholesta-8,24-dien-3-yl]oxy]trimethyl-	26 *p=0,74*	-68 *p=0,32*	40 *p=0,59*	6 *p=0,94*	**98** ***p=0,02***	-73 *p=0,26*

чинниками для забезпечення стійкості клітин до дії низки стресів. Поряд з цим, більший вміст C16:0 і C16:1 має значення для забезпечення стійкості клітин

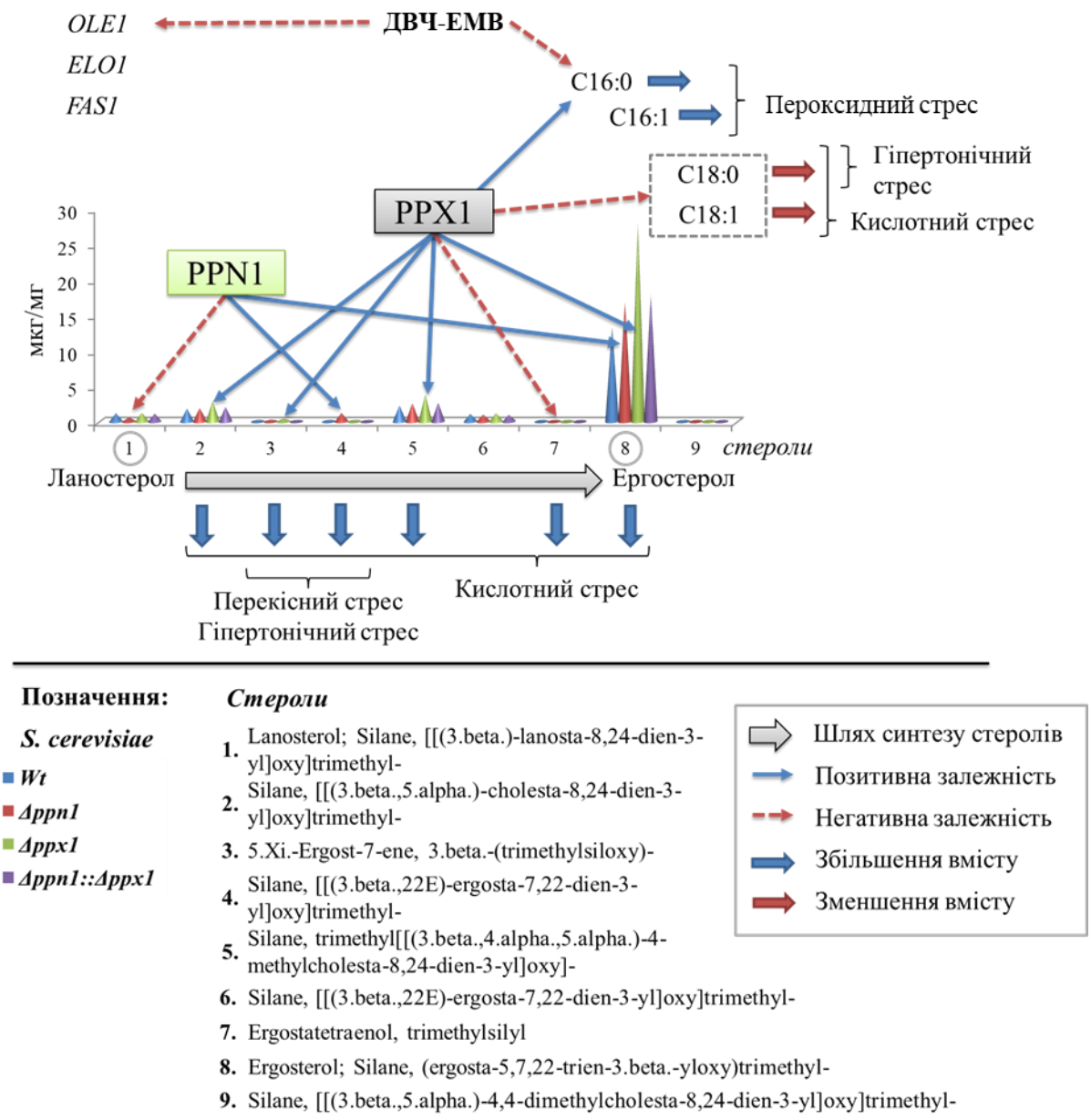


Рис. 4.27. Схема впливу полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 на стійкість клітин дріжджів до дії факторів стресу через синтез жирних кислот і стеролів.

дріжджів до дії оксидативного стресу і, вочевидь, гіпертонічності (Таблиця 4.9). Вміст цих двох ЖК має достовірні позитивні кореляційні залежності лише із вмістом ланостеролу і 5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)-, відповідно (Таблиця 4.12). Однак, з цих двох стеролів, лише збільшення вмісту 5.Xi.-Ergost-7-ene, 3.beta.-(trimethylsiloxy)- має позитивний вплив на показник життєздатності.

Дефектність за PPN1 не виявляє достовірного впливу на вміст жирних кислот, однак впливає на рівень окремих стеролів на етапі синтезу ергостеролу.

Незважаючи на вагомість змін, які виникають в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азою PPX1, дефектність за обома полі(Ф)азами проявляє реверсивний фенотип: клітини з подвійною делецією більш подібні за визначеними показниками на клітини дефектні за PPN1. Тобто усі ефекти, які має дефектність за PPX1 на синтез жирних кислот і стеролів, нівелюються додатковою дефектністю за PPN1. А це означає, що функціональна активність PPX1 може перебувати під контролем (пригнічується) PPN1.

Основні положення розділу опубліковано у наукових працях [20, 419, 420, 464, 467-469, 476, 477, 487, 488, 493, 534]

РОЗДІЛ 5.
СТАБІЛЬНІСТЬ ГЕНОМУ І ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ-МАРКЕРІВ СТРЕСУ В КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ

5.1. Цілісність структури ДНК за дії факторів стресу

Стабільність генетичного апарату є запорукою нормального функціонування клітини. Молекули ДНК і РНК є чутливими до дії низки факторів стресу, які викликають їхню деградацію шляхом прямої або ж опосередкованої дії. Одним з показників стабільності геному є збереження цілісності ДНК. Так, серед відомих фізичних чинників, які викликають деградацію ДНК є УФ-випромінювання, серед хімічних чинників – пероксиди, активні форми кисню, вільні радикали, тощо. Відновлення цілісної структури ДНК вимагає залучення значних енергетичних затрат пов’язаних із активацією відповідних репараційних процесів: синтез ферментів й різноманітних проміжних молекул і структурних елементів, залучених до відтворення первинної структури ДНК. Ферменти полі(Ф)ази задіяні в процеси енергетичного обміну, а тому постає питання, а чи задіяні вони, або ж полі(Ф) у процеси геномної стабільності.

Ми вивчили здатність оцтової кислоти і пероксиду гідрогену індукувати деградацію ДНК в клітинах дріжджів. Концентрації сполук і умови культивування були використані такі, що мають, відповідно до даних літератури, викликати апоптотичну загибель клітин дріжджів. Одним з проявів апоптозу є деградація/фрагментація ДНК. Однак, дія цих факторів в діапазоні концентрацій від 20 мМ до 100 мМ здебільшого не виявляла вплив на стабільність ДНК (Рис. 5.1А) і ознаки її деградації були виявлені лише в поодиноких випадках (Рис. 5.1Б). Залежність процесу деградації від дефектності за полі(Ф)азами також виявлена не була, адже в тих поодиноких випадках, коли деградацію ДНК все ж відмічали, вона була характерною для всіх штамів, незалежно від дефектності за полі(Ф)азами і характеризувалася зникненням довголанцюгових фрагментів ДНК (понад 2000 п.н.) і руйнуванням

фрагментів меншої довжини. Ефект мав дозову залежність і посилювався із збільшенням концентрації використаних сполук. Важливо, деградація ДНК не відображалася на показнику життєздатності клітин дріжджів, а це може бути свідченням того, що клітини за таких умов дії факторів стресу перебувають на етапі ранішнього апоптозу [519], який, як відомо, є оберненим при нівелюванні дії стресового фактору. В нашому випадку з-за суто методичних особливостей могло мати місце реверсивне відновлення стабільності ДНК, адже клітини відмивали від факторів стресу перед виділенням тотальної ДНК і перед висівом на поживні середовища.

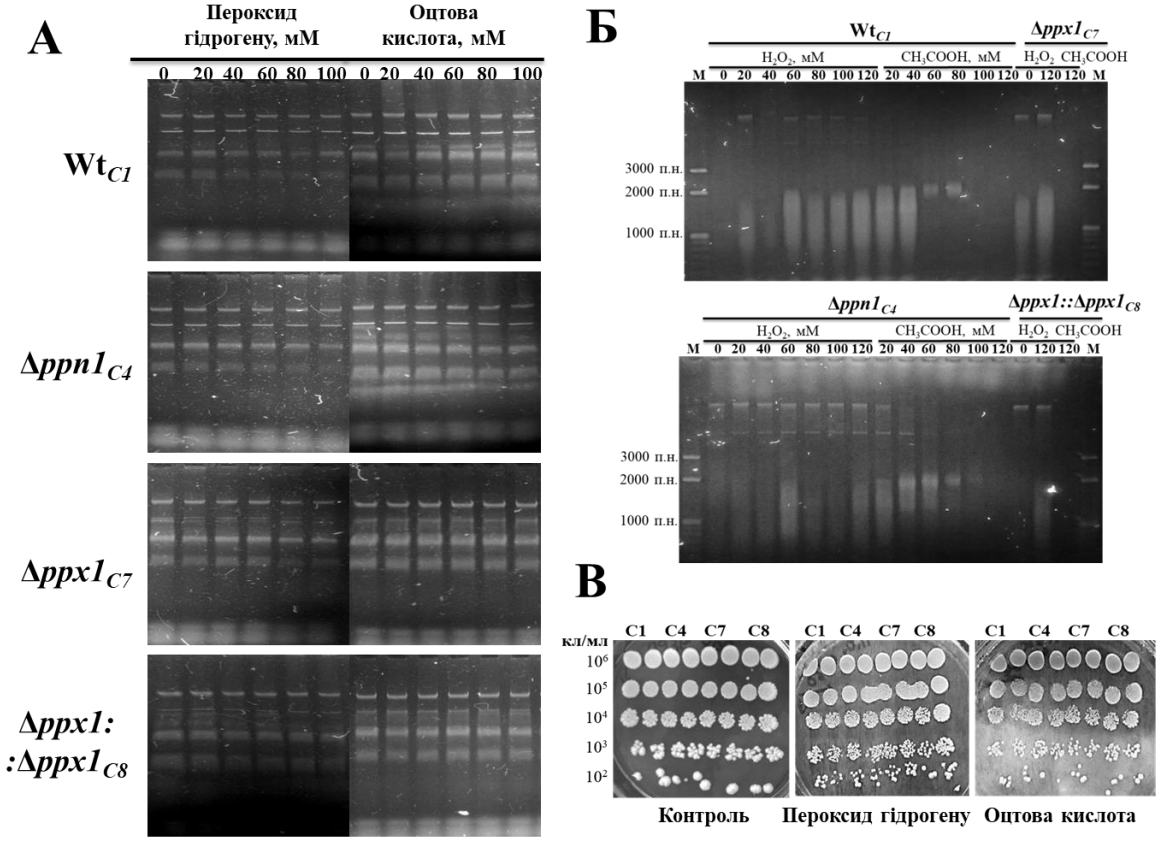


Рис. 5.1. Профілі тотальної ДНК і показник життєздатності (КУО) клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами за дії пероксиду гідрогену і оцтової кислоти. Ідентичні серії досліджень, в яких (А) не виявлено і (Б) виявлено вплив оксидативного і кислотного факторів стресу на цілісність геномної ДНК дріжджів. (В) – життєздатність клітин дріжджів за дії оксидативного і кислотного факторів стресу для серії досліджень, в яких виявлено зміни стабільності геномної ДНК (відповідає результатам наведеним на вкладці Б).

Тим не менш, отриманий результат вказує на те, що дефектність за полі(Ф)азами не збільшує ймовірність деградації ДНК, а можливо навіть послаблює її, адже в клітинах дефектних за полі(Ф)азами високомолекулярні фрагменти ДНК зберігалися навіть за дії 120 мМ пероксиду гідрогену, в той час, як в клітинах батьківського штаму їх напівкількісний вміст (оцінений за інтенсивністю полос на електрофоретичних треках) зменшувався і ці фрагменти зникали при концентрації пероксиду гідрогену від 40 мМ (Рис. 5.1Б). Подібно чином діяла й оцтова кислоти, яка мала більший вплив на ДНК в клітинах батьківського штаму, в якого високомолекулярні продукти не фіксувалися за концентрації оцтової кислоти 20 мМ, в той час як в дефектних за полі(Ф)азами клітинах такий ефект досягався лише при концентраціях понад 60 мМ.

Зважаючи на такий результат, ми перевірили здатність пероксиду гідрогену викликати деградацію дріжджової ДНК *in vitro* (на прикладі очищеної ДНК) (Рис. 5.2). Додатково ми дослідили дію хімічного мутагену (нітрозометилсечовини) і фізичного фактору (УФ-опромінювання), як потенційних індукторів дволанцюгових розривів молекули ДНК. В результаті проведених досліджень не було виявлено впливу на стабільність ДНК за дії нітрозометилсечовини і УФ-випромінювання. Пероксид гідрогену стимулював

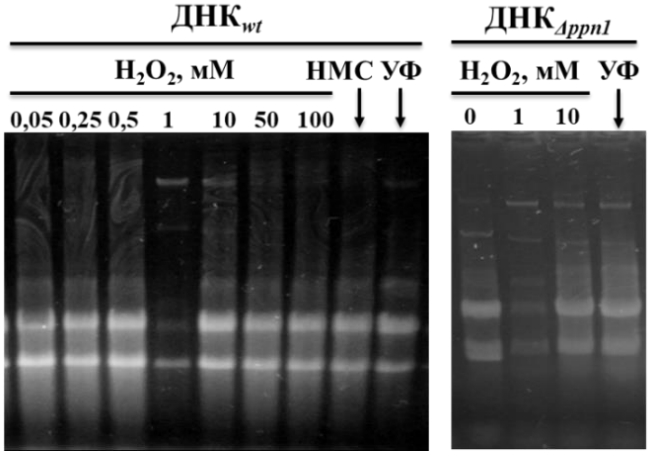


Рис. 5.2. Дія пероксиду гідрогену, нітрозометилсечовини (НМС) і ультрафіолетового випромінювання (254 нм, 60 сек) на стабільність ДНК *in vitro*. ДНК виділена з клітин дріжджів батьківського штаму (ДНК$_{wt}$) і клітин дефектних за полі(Ф)азою PPN1 (ДНК$_{\Delta ppn1}$).

деградацію ДНК, проте це мало місце в досить вузькому діапазоні концентрацій і найбільш показовою була концентрація 1 мМ, в той час, як при більших і менших концентраціях ефект сильно пригнічувався (Рис. 5.2). На відміну від описаного вище ефекту, який ми відмітили при дії пероксиду гідрогену на клітини дріжджів, де руйнувалися першочергово довгі фрагменти ДНК, в експериментах *in vitro* зникали коротколанцюгові фрагменти ДНК. Це може вказувати на реалізацію різних механізмів дії пероксидів в умовах *in vitro* і *in vivo*.

Таким чином, цілком ймовірними є дві причини відсутності дії пероксидів в більшості дослідів *in vivo*: в клітинах дріжджів дія пероксидів нівелюється цілою низкою внутрішньоклітинних факторів і така «тонка» дія пероксиду гідрогену, відмічена в дослідах *in vitro*, просто не мала змоги проявитися, або ж, як було зазначено вище, клітини встигали відновити цілісність ДНК в момент нівелювання дії фактору стресу.

5.2. Індукція одно- і дволанцюгових розривів ДНК за дії електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону

Зважаючи на неоднозначність отриманих результатів при оцінці дії стресових факторів за результатами гель-електрофорезу тотальної ДНК, ми використали інший метод оцінки мутагенного потенціалу досліджуваних факторів за допомогою генетично модифікованих тестових штамів дріжджів. Клітини кожного з тест-штамів змінюють колір колоній у відповідь на індукцію певних внутрішньоклітинних репараційних процесів, пов’язаних із відновленням цілісної структури ДНК вразі її пошкодження [379] (Додаток 6Б).

Ми зосередили свою увагу на вивченні здатності неіонізуючого електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону викликати порушення ДНК [520, 521]. Клітини тестових штамів дріжджів обробляли двома типами випромінювання: ДВЧ-ЕМВ (ультрависокочастотне електромагнітне випромінювання, метрового діапазону, потужністю 15 Вт і 30 Вт) і НзВЧ-ЕМВ (надзвичайно високочастотне електромагнітне

випромінювання, сантиметрового діапазону, потужністю 100 мкВт). Як позитивний контроль використовували експозицію УФ-випромінюванням довжиною хвилі 254 нм.

Результат аналізу показав, що ДВЧ-ЕМВ не сприяє утворенню одно- чи дволанцюгових розривів ДНК, адже кількість колоній із зміненим кольором була на рівні контролю, тобто на рівні спонтанних мутацій (Таблиця 5.1). Окрім того, передобробка клітин дріжджів ДВЧ-ЕМВ також не мала протекторної дії щодо мутагенної дії УФ-випромінювання, яке діє через активацію *RAD2*. Такий результат показує, що процес адаптивної відповіді, який запускається в клітинах дріжджів за дії ДВЧ-ЕМВ і спричиняє підвищення їх стійкості до дії хімічних чинників, вочевидь, не пов'язаний із порушенням цілісності геному, а реалізується через інші біохімічні і молекулярно-генетичні процеси [522].

Таблиця 5.1.

Кількість колоній (%) з проявленими мутаціями за дії ЕМВ 40,68МГЦ, 15 і 30Вт, 30 і 60хв

Штам	Ген-мішень	Спонтанні мутації	Індуковані ДВЧ-ЕМВ	УФ	ДВЧ-ЕМВ + УФ
Т2		0-2	0-2	0-2	0-2
ПГ-60	*Ade1-Ade2*	3-5	3-5	3-5	3-5
ПГ-61	*Rad2*	1-2	1-2	83	75
ПГ-80	*Rad54*	1-2	1-2	0	0

На відміну, від ДВЧ-ЕМВ, випромінювання сантиметрового діапазону (НзВЧ-ЕМВ) мало здатність знижувати життєздатність клітин дріжджів на 10-20%. Така ж дія відмічена і у випадку УФ-випромінювання і в середньому життєздатність клітин досліджених штамів дріжджів знижувалася на 30-70%. НзВЧ-ЕМВ викликало стимулювання експресії *ADE1-ADE2*, генів які кодують ферменти синтезу пуринових нуклеотидів, і активація яких відбувається під час

індукції мітотичної рекомбінації (Рис. 5.3). Ефект мав позитивну часову залежність, адже кількість колоній із зміною кольору зростала при більш тривалій експозиції. Також, цей тип випромінювання за короткотривалої дії (10 хв) стимулював експресію і *RAD54*, гену, який кодує ДНК-залежну АТФазу залучену до відновлення дволанцюгових розривів ДНК. Однак ефект був нестабільним і тому мав високий показник варіабельності (до 100%). Для порівняння, УФ-випромінювання стимулювало експресію лише *RAD2* і не впливало на інші генетичнісистеми репарації пошкоджень ДНК і мітотичної рекомбінації. Тобто дія НзВЧ-ЕМВ на ДНК мала більшу кількість пошкоджень навіть порівняно із дією УФ-випромінювання.

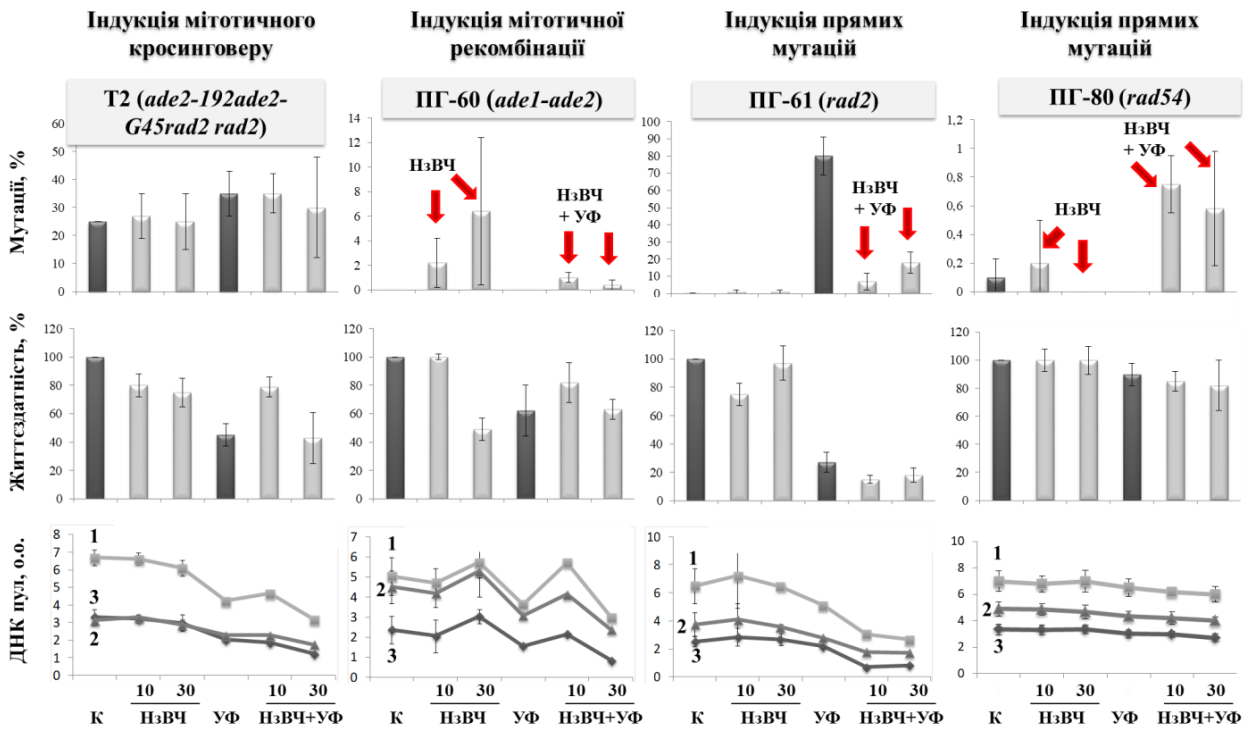


Рис. 5.3. Індукція мутагенезу в клітинах дріжджів за дії НзВЧ-ЕМВ. Зміна життєздатності клітин дріжджів і загальна кількість ДНК за основними електрофоретичними продуктами (1, 2 і 3).

Примітки: «К» - контроль, інтактні клітини. «НзВЧ 10 і 30» - відповідно, клітини опромінені НзВЧ-ЕМВ 10 хв. і 30 хв. «УФ» - клітини опромінені УФ-

випромінюванням. «НзВЧ+УФ 10 і 30» - відповідно клітини дріжджів оброблені НзВЧ 10 хі. і 30 хв із наступною дією УФ-випромінювання.

НзВЧ-ЕМВ також виявляло здатність змінювати чутливість клітин дріжджів до послідуючої дії УФ-випромінювання. Проте ефект мав певні особливості: рівень індукції мітотичної рекомбінації знижувався, в той час як рівень індукції прямих мутації (активація *RAD54*, а також *RAD2*), навпаки посилювалася.

Екстракція тотальної ДНК з клітин цих штамів дріжджів після дії на них ЕМВ УФ-діапазону і НзВЧ, як і в більшості досліджень із клітинами дріжджів дефектними за полі(Ф)азами, не дозволила виявити жодних ознак її деградації. Однак, достовірним ефектом, який ми констатували, було зменшення виходу ДНК з клітин дріжджів, як за дії УФ-випромінювання, так і, в ряді випадків, після дії НзВЧ-випромінювання. Зменшення «виходу» ДНК з клітин дріжджів добре корелювало (80%-90%) з показником життєздатності (Рис. 5.3), а тому може бути опосередкованим показником, який підтверджує гибель клітин за дії УФ- і НзВЧ-випромінювання.

Такий ефект був характерним для всіх досліджених штамів, а тому може вважатися загальнобіологічним. Однак, одночасно з цим, це вказує на досить стрімку деградацію ДНК в клітинах мертвих дріжджів, і, відповідно, бути ще одним нюансом, який може вплинути на загальну оцінку здатності факторів стресу бути індукторами геномної нестабільності за показником деградації ДНК. Тобто, деградацію ДНК можна виявити лише в тих випадках, коли клітини зберігають життєздатність і не перешли на етапи лізису, як ми це відмічали при досліджені клітин дефектних за полі(Ф)азами (Рис. 5.1Б і В). Відповідно до цього в тих випадках, коли було відмічене збільшення виходу ДНК на фоні зменшення життєздатності клітин, можна припускати, що має місце не загибель клітин як така, а блокування проліферативної активності при збереженні цілісності інших внутрішньоклітинних структур. Так, наприклад, експозиція НзВЧ-ЕМВ протягом 30 хв і 10 хв клітин дріжджів штамів ПГ-60 і ПГ-61, відповідно, призводила до помітного зменшення показника КУО, в той

час, як відносні кількісні показники виходу ДНК при цьому зростали порівняно із неопроміненими контрольними клітинами (Рис. 5.3). Тобто НзВЧ-випромінювання, вочевидь, не є летальним фактором, а швидше за все блокує проліферативні функції в клітинах дріжджів за рахунок індукції мітотичної рекомбінації, величина, якої зростає майже до 14% (від 0% у контролі) пропорційно тривалості опромінювання (див. штам ПГ-60 на Рис. 5.3). Цілком ймовірною є й здатність НзВЧ-випромінювання індукувати прямі мутації в клітинах дріжджів, однак цей ефект проявлявся лише при тривалості опромінювання 10 хв і сумарно не перевищував 0,5% від загальної кількості клітин у популяції (див. штам ПГ-80 на Рис. 5.3).

Вплив НзВЧ-ЕМВ на клітини інших штамів дріжджів (Т2 і ПГ-60) мала протекторний характер адже збільшувала стійкість клітин до послідуючої дії УФ-випромінювання: показник життєздатності цих клітин зростав порівняно із просто дією УФ-випромінювання після 10-ти хвилинної експозиції НзВЧ-ЕМВ (Рис. 5.3). Однак більш тривала дія НзВЧ-ЕМВ (30 хв) не виявляла подібного ефекту, хоча й не стимулювала інгібуючу дію УФ, як це видно для клітин штаму ПГ-61. Вочевидь, НзВЧ-випромінювання викликало такі порушення в клітинах дріжджів, які запустили репараційні процеси опосередковані активністю *ADE1-ADE2* і *RAD2* і на момент дії УФ-випромінювання клітини вже були готові до відновлення одно- чи дволанцюгових розривів ДНК і порушень пов’язаних із мітотичною рекомбінацією. Однак індукція прямих мутацій опосередкованих активністю *RAD54*, хоча й несуттєво, проте достовірно (p<0,031) зростала за дії НзВЧ-ЕМВ і посилювалася дією УФ-випромінювання. Тобто в цьому випадку ми не спостерігали протекторного ефекту від передобробки клітин за допомогою НзВЧ-ЕМВ, що, як припущення, може бути пов’язано із конкурентною активацією *RAD2* і *RAD54*.

Отримані дані свідчать про складний характер впливу неіонізуючого ЕМВ ДВЧ і НзВЧ діапазонів. ДВЧ-ЕМВ виступає індуктором геномної мінливості в клітинах дріжджів, однак ці зміни відбуваються в межах гомеостатичного пулу і не пов’язані із мутаціями, а тому можуть бути

наслідком реакції на деградацію певних білкових комплексів опосередкованих функціональною активністю Ubc6p. НзВЧ-випромінювання здатне індукувати процес мітотичної рекомбінації і має мутагенний потенціал. В той же час дія УФ-випромінювання знижує рівень мітотичної рекомбінації ймовірно за рахунок індукції прямих мутацій і запуску відповідних репараційних процесів

5.3. Роль полі(Ф)аз у прояві явища «геномної мінливості»

Одним із механізмів, який часто забезпечує зміну адаптивних властивостей організму за несприятливих умов є геномна мінливість. За допомогою коротких (ди-, три- і тетрануклеотидних) праймерів ми проаналізували чи відбуваються в геномі дріжджів зміни в результаті дефектності за полі(Ф)азами, а також у відповідь на дію стресових факторів [523, 524].

Для аналізу геному дріжджів було використано тетрануклеотидний праймер $(GACA)_4$ і праймер специфічний до гуанін-збагаченої ділянки геному ($GGG(TGGGG)_2TG$), які у попередніх дослідженнях показали себе зручними маркерами для експресної внутрішньовидової диференціації.

ПЛР-продукти ампліфікації геномної ДНК з тетрануклеотидним праймером не відрізнялися між собою в клітин дріжджів штамів С3 (*Wt*), С5 (Δ*ppn1*) і С7 (Δ*ppx1*) (Рис. 5.4). Продукти мали довжини 510 п.н., 610 п.н. і 1070 п.н. За дії стресових факторів (оксидативний стрес, гіпертонічній шок і ДВЧ-ЕМВ) ПЛР-продукти не змінювалися і загальні профілі лишалися такими ж, як в контролі.

Близьким до клітин цих трьох штамів за профілем ПЛР-продуктів були клітини штаму CRY (*Wt*), для якого відмічене утворення ПЛР-продуктів довжиною 510 п.н., 670 п.н. і 1130 п.н. (Рис. 5.4). Клітини штаму CNX (Δ*ppn1*) мали лише два спільні з клітинами батьківського штаму продукти довжиною 510 п.н. і 670 п.н., а третій ПЛР-продукт мав довжину 750 п.н. замість продукт довжиною у 1130 п.н.

Після дії стресових факторів на клітини штамів CRY і CNX були відмічені зміни профілю продуктів ампліфікації: в клітинах CRY після ампліфікації утворювалися продукт довжиною 750 п.н. і одночасно зникав

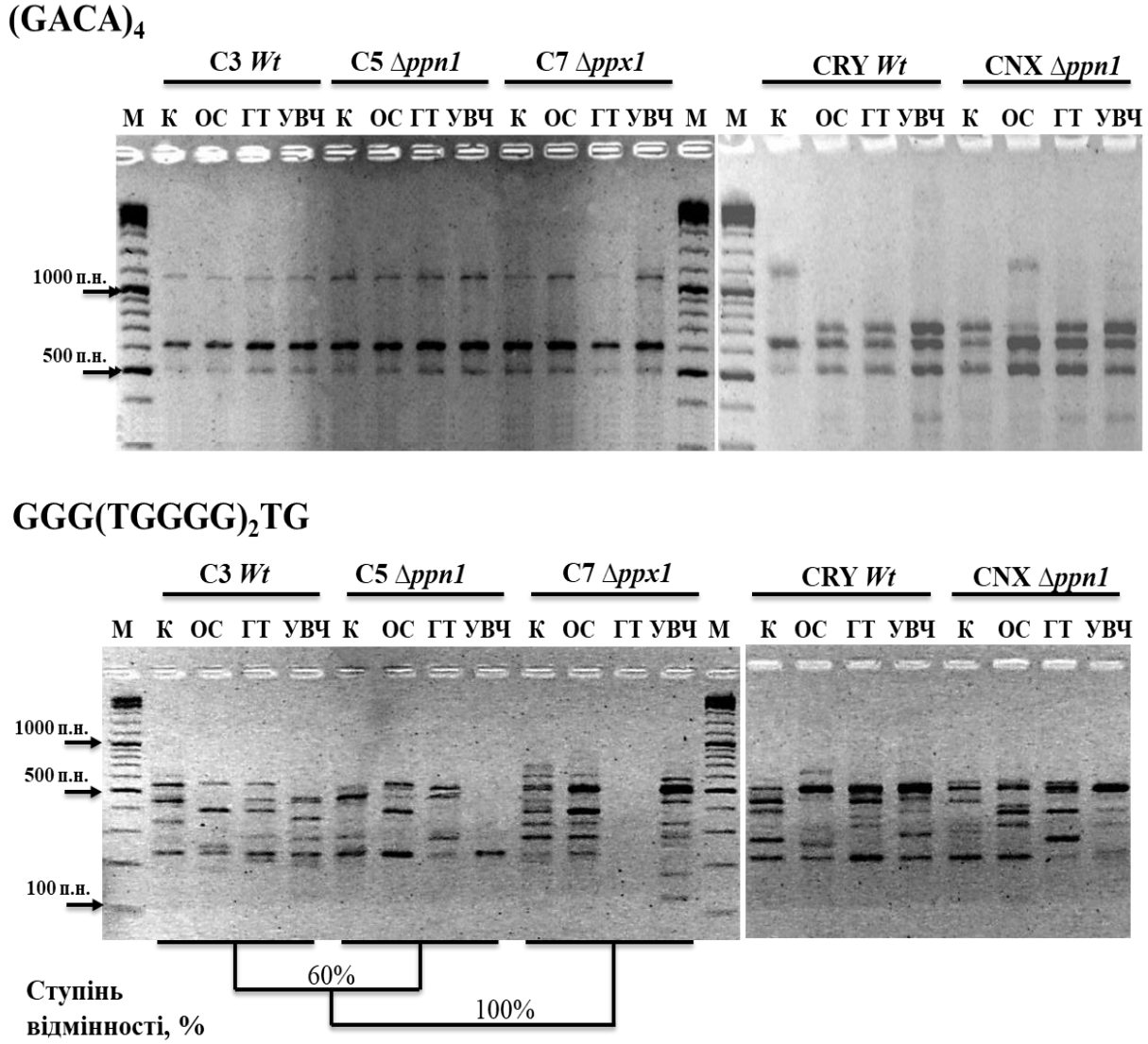


Рис. 5.4. Електрофореграми продуктів ампліфікації з праймерами до тетрануклеотидного повтору $(GACA)_4$ і до гуанін-збагаченого повтору $(GGG(TGGGG)_2TG)$. «С4», «С5», «С7», «CRY» і «CNX» – відповідно, назви штамів *S. cerevisiae*. «*Wt*», «Δ*ppn1*» і «Δ*ppx1*» - особливості генотипу, відповідно, штам дикого типу і штами з делеціями генів *PPN1* та *PPX1*. «М» – маркер молекулярної ваги; «К» - контроль; «ОС» – оксидативний стрес; «ГТ» – гіпертонічність; «ДВЧ» – електромагнітне випромінювання ультрависокочастотного діапазону (40,68 МГц).

продукт довжиною 1130 п.н. А за дії ЕМВ ДВЧ додатково утворювалися ще й продукти довжиною 380 п.н. і 350 п.н. Клітини штаму CNX також виявили геномну мінливість, адже в результаті дії стресів утворювалися додаткові продукти ампліфікації: після оксидативного стресу утворювався додатковий продукт довжиною 1130 п.н., а після гіпертонічного стресу і дії електромагнітного випромінювання утворювалися продукти довжиною 380 п.н., як і у клітин батьківського штаму.

Отримані дані дозволяють припустити, що продукти ампліфікації довжиною 510 п.н., а також 610 п.н. і 670 п.н., можуть бути віднесені до корової частини геному, адже перший з них є загальним для всіх досліджених штамів (видоспецифічний), а інші два присутні в окремих штамах (штамоспецифічний). Інші ж ПЛР-продукти (понад 1000 п.н. і коротші ніж 500 п.н.), ймовірно, можуть відноситися до варіабельної частини геному, яка може змінюватися у відповідь на геномні пертурбації або ж під дію різноманітних стресових факторів.

ПЛР-продукти ампліфікації дріжджової ДНК з іншим праймером ($GGG(TGGGG)_2TG$) дозволила диференціювати клітини досліджених штамів дріжджів за цілою низкою продуктів різної довжини в діапазоні від 200 п.н. до 600 п.н. (Рис. 5.4). Дія факторів стресу призводила до помітних змін у кількості і довжині ПЛР-продуктів. Найбільш відмінними за профілем ПЛР-продуктів від клітин батьківського штаму виявилися клітини дефектні за PPX1 (штам C7). Оцінка показника геномної мінливості (ГМ) показала, що всі фактори стресу (ДВЧ-ЕМВ, оксидативний стрес і гіпертонічність) збільшують рівень ГМ на 15-100% (Таблиця 5.2). Найбільші зміни в клітин батьківських штамів були відмічені за дії оксидативного стресу (67-70%). В той час як в дефектність за PPN1 знижувала цей показник до 50-60%, а дефектність за PPX1 – до 15%. Тобто за цим показником геном Δ*ppx1*-клітин був найменш чутливим до дії пероксиду гідрогену. Одночасно з цим, геном цих клітин був найбільш чутливим до дії гіпертонічного шоку (амплікони не утворювалися) і менш чутливими до дії ДВЧ-ЕМВ, в той час як геном Δ*ppn1*-клітин (обох досліджених

штамів дріжджів), навпаки, був найбільш чутливим до дії ДВЧ-ЕМВ (90% і 57%, відповідно для штамів С7 і CNX).

Таблиця 5.2.

Геномна мінливість клітин дріжджів за дії факторів стресу відповідно до відсотку поліморфних ампліконів відносно контролю

Штам *S. cerevisiae*	Вид стресу		
	Оксидативний стрес (0,3 мМ H_2O_2)	Гіпертонічність, 1М Сорбітол	ЕМВ 40,68МГц, 30Вт, 60хв.
С3 *Wt*	67	50	67
С5 Δ*ppn1*	50	20	90
С7 Δ*ppx1*	15	100	43
CRY *Wt*	70	57	43
CNX Δ*ppn1*	60	57	57

Аналіз геномної мінливості індукованої дією іншого типу ЕМВ частотою 1871 МГц (яке є одним із стандартів сучасного мобільного зв'язку DCS-1800), показав, що рівні мінливості геному для клітин досліджених штамів дріжджів були однаково високими і досягали 80% [521]. Оцінка відмінностей між ПЛР-продуктами контрольних і опромінених зразків показала залежність від рівня щільності потоку енергії (ЩПЕ) випромінювання, а також від тривалості експозиції (Рис. 5.5). Найбільші зміни в геномі клітин дріжджів були відмічені після 6 тижнів експозиції при найменшій з використаних ЩПЕ 0,1 Вт/м^2. Дефектність за PPN1 знижувала величину геномної мінливості в 1,3 рази (3,5 ± 0,87, проти 4,5 ± 0,75 в *Wt*-клітин). Слід зазначити, що зміни, які відбулися в геномі не відновлювалися навіть через 30 днів (що відповідає близько 300 генераціям клітин дріжджів) культивування за нормальних умов (Рис. 5.5А).

Тобто ефекти дії ЕМВ-1871 МГц були різними при різній ЩПЕ і поряд із змінами у геномі, через 2 дні опромінювання, було відмічене пригнічення

ростових процесів і зменшення виходу біомаси в *Wt*-клітин за найменших значень ЩПЕ (0,1 Вт/м^2 і 2,5 Вт/м^2) (Рис. 5.6А) [521]. Збільшення ЩПЕ до 10 Вт/м^2 мало незначний вплив на фізіологічні показники росту *Wt*-клітин штаму Y-517, а ростові процеси *Wt*-клітин іншого штаму (CRY) навпаки посилювалися. Вплив ЕМВ-1871 МГц на Δ*ppn1*-клітини викликав зниження ростових процесів на 40% за низьких значень ЩПЕ і не мав впливу при ЩПЕ 10 Вт/м^2.

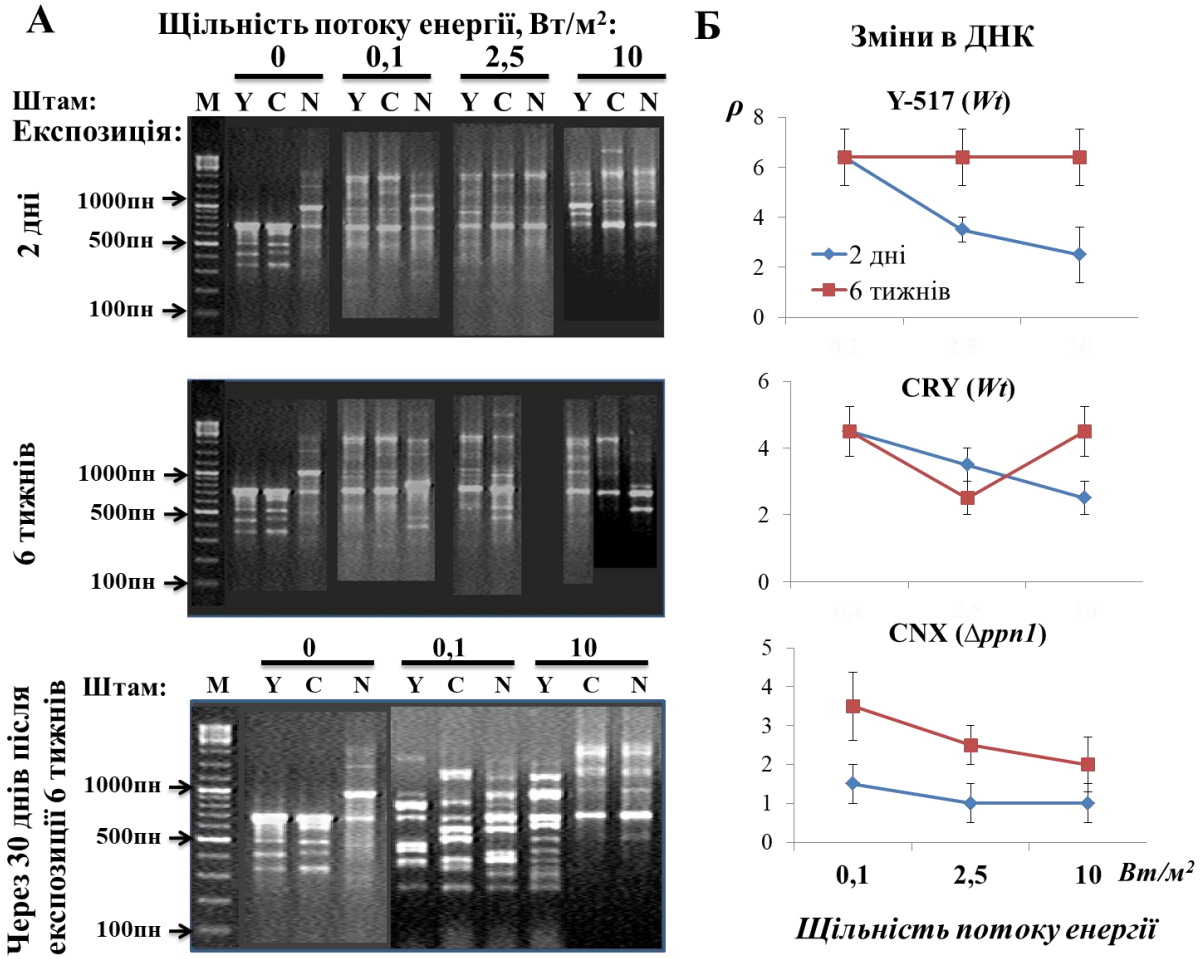


Рис. 5.5. Зміна стану ДНК дріжджів за дії ЕМВ-1871МГц. (А) – ПЛР-продукти ампліфікації геномної ДНК із тетрануклеотидним праймером $(GACA)_4$. (Б) – зміни в профілях ПЛР-продуктів (зміни ДНК) виражені через ступінь відмінності (*p*) між контрольними зразками і дослідними за методом поєднання медіан («*median-joining*»).

Примітки: «M» - маркер, «Y», «C» і «N» - відповідно назви штамів дріжджів Y-517 (*Wt*), CRY (*Wt*) і CNX (Δ*ppn1*).

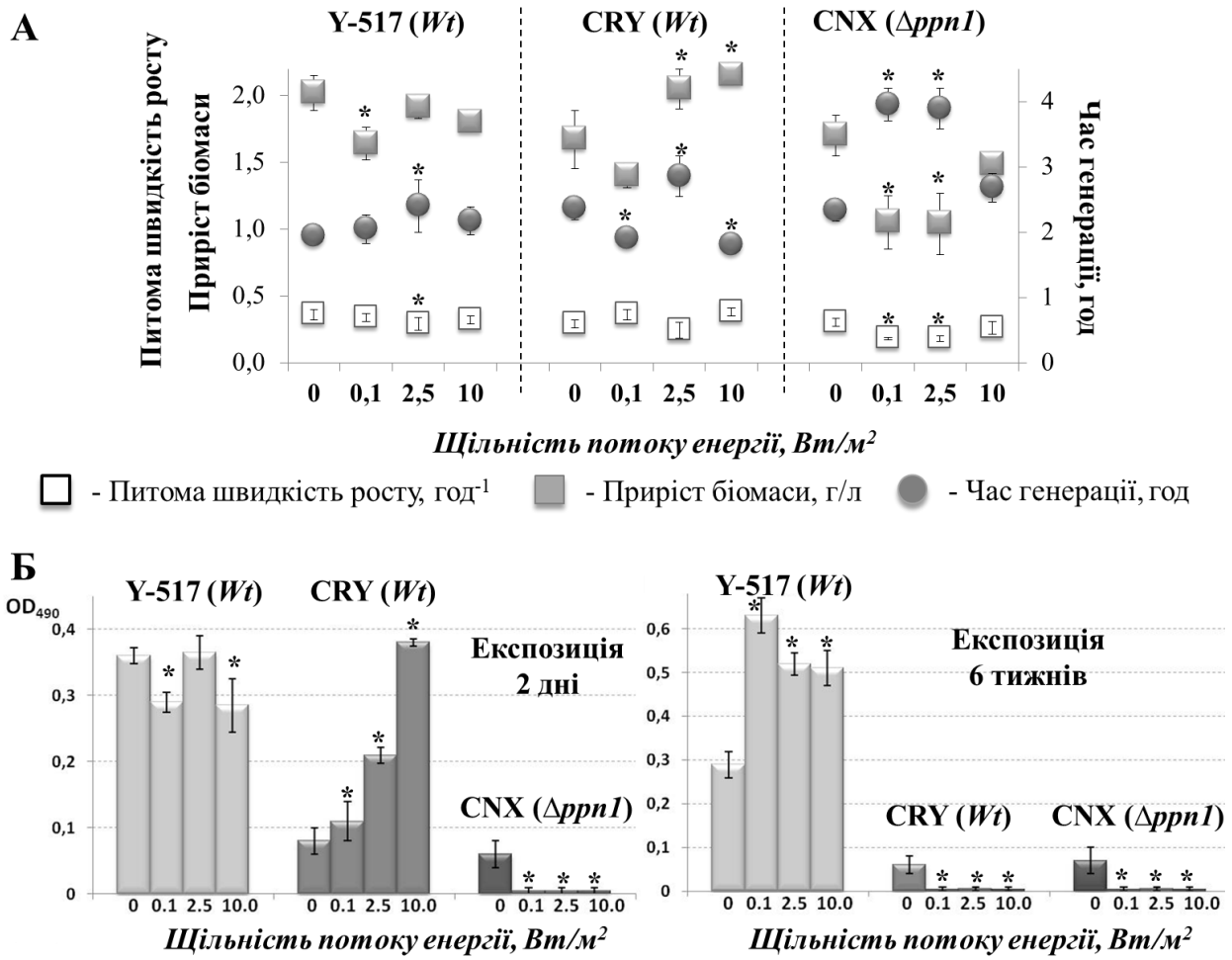


Рис. 5.6. Зміни фізіолого-біохімічних показників росту клітин дріжджів за дії ЕМВ-1871 МГц (експозиція 5 годин/день). (А) – зміна фізіологічних показників росту через 2 дні опромінювання. (Б) – зміна показнику загальної дегідрогеназної активності через 2 дні і 6 тижнів опромінювання.

Примітки: «*» - значення, які відрізняються від контролю (0 Вт/м^2) при $p \leq 0{,}05$.

Після шести тижнів опромінювання фізіологічні показники росту *Wt*-клітин збільшувалися і значно перевищували показники в контролі (клітини дріжджів без опромінення). Ефект був тим більший чим меншою була ЩПЕ (Таблиця 5.3) [521]. Збільшення метаболічного коефіцієнту (в 1,5 - 2 рази) і зниження економічного коефіцієнту на 20% (при ЩПЕ 2,5 і 10 Вт/м^2) вказує на те, що за низьких значень ЩПЕ відбувається посилення споживання глюкози і, відповідно, інтенсифікація метаболічних процесів.

Таблиця 5.3.

Фізіологічні показники росту клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 після 6-ти тижнів експозиції УВЧ-1871 МГц

(В таблиці наведено середні значення ± стандартне відхилення при n = 9)

Показник росту	Щільність потоку енергії, Вт/м^2			
	0	**0,1**	**2,5**	**10,0**
Питома швидкість росту, год$^{-1}$	0,32 ± 0,03	0,68 ± 0,05 *	0,40 ± 0,02 *	0,32 ± 0,06
Біомаса, г/л	1,51 ± 0,24	3.50 ± 0.15 *	2,58 ± 0,04 *	1,99 ± 0,10 *
Економічний коефіцієнт, *Y*	0,39 ± 0,02	0,39 ± 0,04	0,32 ± 0,04 *	0,31 ± 0,03 *
Метаболічний коефіцієнт, *q*	0,82 ± 0,04	1,74 ± 0,01 *	1,25 ± 0,03 *	1,00 ± 0,09 *
Час генерації t_d, год	2,17 ± 0,06	1,02 ± 0,10 *	1,73 ± 0,08 *	2,17 ± 0,03
Споживання глюкози, г/л за 24 год	3,9 ± 0,4	9,0 ± 0,4 *	8,0 ± 0,2 *	6,4 ± 0,5 *

** Відмічені значення відрізняються від відповідних значень у неопромінених (0 Вт/м^2) зразках при $p \leq 0,05$*

Відмічені зміни на фізіологічному рівні лише частково корелювали із активністю ферментів дегідрогеназного (ДГГ) комплексу, адже через два дні експозиції було відмічене зменшення ДГГ-активності в *Wt*-клітинах штаму Y-517 і Δ*ppn1*-клітинах (Рис. 5.6Б) і збільшення цього показнику в *Wt*-клітинах штаму CRY [521]. Для Δ*ppn1*-клітин було характерним цілковите пригнічення ДГГ-активності після дії випромінювання із ЩПЕ 0,1 - 10 Вт/м^2, яке не відновлювалося навіть через 6 тижнів експозиції.

Ми не досліджували мутагенний потенціал ЕМВ-1871 МГц (за браком можливості), але очевидно, що більш коротка експозиція пригнічує ростові процеси, в той час як із збільшенням тривалості опромінювання, відбувається

відновлення ростових процесів і навіть їх інтенсифікація. Цілком ймовірно, що відбувається адаптація клітин дріжджів до умов оточуючого середовища і це відображається як на рівні ферментативних реакцій, так і на рівні геному.

В цілому ж, вивчення геномної мінливості за дії різних факторів стресу хімічної і фізичної природи показало, що ДНК є високочутливою до дії як хімічних, так і фізичних факторів стресу, а дефектність за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 виявляє значний вплив на цей процес.

5.4. Експресія стрес-індукуємих генів

В клітинах дріжджів більше тисячі генів активно змінюють свою експресію у відповідь на дію різних стресів і близько 300 з цих генів є спільними для низки стресів. Для вивчення ролі полі(Ф)аз у формуванні клітинами дріжджів відповіді на стрес, ми відібрали 10 генів, які можуть вважатися специфічними маркерами дії стресу на той чи інший метаболічний шлях, або ж задіяні у відповіді на дію специфічного стресу (Додаток 13). Серед обраних генів *HSP12*, *GPD1* і *GRE2* активуються трьома різними метаболічними шляхами при гіперосмотичному шоці. Експресія *CWP1* і *PDR12* є pH-специфічною. *TRX2* є геном-маркером оксидативного стресу, *STI1* – ген-маркер теплового шоку, а *PHO84*, це ген, який кодує білок-транспортер неорганічних фосфатів і індукується за дії радіочастотного електромагнітного випромінювання. *RNR3* – ген-маркер геномної нестабільності, а *GSY2* – ген-маркер загального стресового впливу на геном. Рівні експресії оцінювали відносно «*housekeeping*»-генів (*ACT1, ALG9* і *SEC21*), які не змінюють рівнів своєї експресії в клітинах дріжджів за дії більшості з вивчених факторів стресу.

Аналіз рівнів експресії стрес-індукуємих генів в клітинах дріжджів *Wt*-штаму показав, що за оптимальних умов культивування низькі рівні активності відносно «*housekeeping*»-генів були притаманні генам *STI1*, *HSP12*, *GSY2*, *PDR12* і *GPD1*, експресія ж *CWP1*, *GRE2* та *PHO84* була найвищою (Рис. 5.7А). Відмічені рівні активності генів, у даному випадку, є фізіологічною нормою і

вказують на активність відповідних метаболічних шляхів задіяних у процесах ката- і анаболізму.

Дефектність за полі(Ф)азами має суттєвий вплив на загальний профіль експресії вивчених генів. Найменші відмінності (на рівні 62%) від *Wt*-клітин

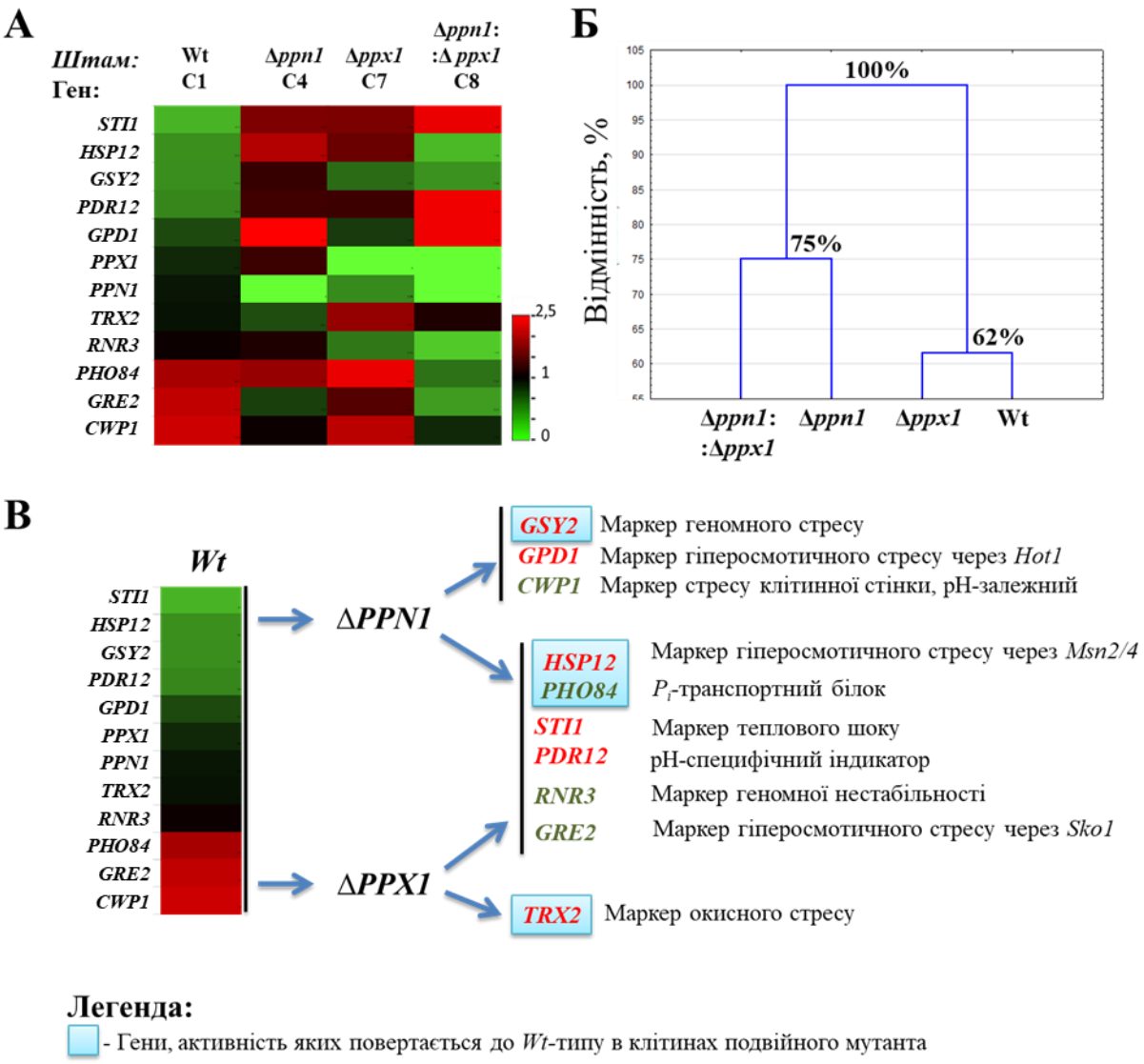


Рис. 5.7. Експресія генів-маркерів стресів в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1. (А) – величини експресії генів відносно *housekeeping-генів* (*SEC21*, *ALG9*, *ACT1*). (Б) – кластеризація штамів за рівнями експресії генів. (В) – схема впливу дефектності за полі(Ф)азами на експресію стрес-індукуємих генів.

Позначки: червоним і зеленим шрифтом відмічено гени, рівень експресії яких, відповідно, збільшується і зменшується.

мали Δ*ppx1*-клітини, в той час як дефектність за PPN1 спричиняла найбільші зміни, що було характерним і для клітин подвійного мутанта (Рис. 5.7Б). Спільною для всіх дефектних штамів була активація білку кошаперону Hsp90p (*STI1*) і двох білків плазматичної мембрани: білку Hsp12p (*HSP12*), який залучений до підтримки цілісності структури мембрани, і білку-переноснику АТФ-зв'язуючої касети (ATP-binding cassette (ABC) transporter), який також є pH-специфічним індикатором (*PDR12*). Одночасне зниження активності ряду інших генів, які мали середні і найвищі показники експресії в клітинах батьківського штаму (*TRX2*, *RNR3*, *PHO84*, *GRE2* і *CWP1*), вказують на зміну орієнтації метаболізму на відновлення структури і цілісності клітин на рівні будови ЦПМ і нівелювання негативної дії з боку *альфа*-амілоїдних білків, токсичність яких якраз і нівелюється білком Hsp90p, а також змінами у структурі ЦПМ. Разом з тим дефектність за PPX1 викликає збільшення активності *TRX2*, який кодує цитоплазматичний ізофермент тіоредоксину і є необхідним для забезпечення транспортних функцій апарату Гольджі і успадкування вакуолей. Для клітин дефектних за PPN1 було відмічене збільшення активності інших двох генів: *GSY2*, який кодує глікогенсинтазу, яка активується за ліміту глюкози і азоту, і *GPD1*, який кодує НАД-залежну гліцерол-3-фосфат дегідрогеназу, ключовий фермент для синтезу гліцеролу. Активація експресії обох цих генів може вказувати як на проблеми із перетворенням поживних речовин в Δ*ppn1*-клітинах, так і на реплікативний стрес. Ми оцінили здатність клітин дефектних за полі(Ф)азами споживати глюкозу і не виявили достовірних змін за цим показником між *Wt*-клітинами і клітинами дефектними за полі(Ф)азами за оптимальних умов культивування (Рис. 5.8). Близькою до достовірної відмінність була відмічена для Δ*ppx1*-клітин за умови попередньої дії на них ДВЧ-ЕМВ ($p \leq 0{,}059$), і певна тенденція прослідковується й за дії пероксиду гідрогену ($p \leq 0{,}22$): в обох випадках відмічене збільшення кількості спожитої глюкози і, одночасно, спожитого фосфору ($p \leq 0{,}01$ і $p \leq 0{,}11$ для ефектів дії ДВЧ-ЕМВ і пероксиду гідрогену, відповідно), на одиницю біомаси. Зважаючи на це, можна припустити, що

активація *GSY2* і *GPD1*, відмічена в Δ*ppn1*-клітинах не пов'язана із порушенням споживання субстрату. Так само ймовірний реплікативний стрес, вочевидь не є причиною активації цих генів, адже очевидно, що поділ клітин не пошкоджено і приріст біомаси у рідкому поживному середовищі (Рис. 5.8), так само як і розмір колоній на агаризованому поживному середовищі (Рис. 3.17) для Δ*ppn1*-клітин не відрізняються від значень у клітин батьківського штаму.

Дія факторів стресу (пероксид гідрогену і оцтова кислота) викликають зміну профілів експресії, яка має штамоспецифічні особливості (Рис. 5.9). Дія пероксиду гідрогену викликала індукцію експресії генів обох полі(Ф)аз *PPN1* і *PPX1*, а також генів *PDR12* і *GSY2*. За дії оцтової кислоти в цих клітинах відбувалося посилення експресії *PPX1*, в той час як рівень експресії *PPN1* залишався на рівні контролю. Окрім того, дія оцтової кислоти стимулювала

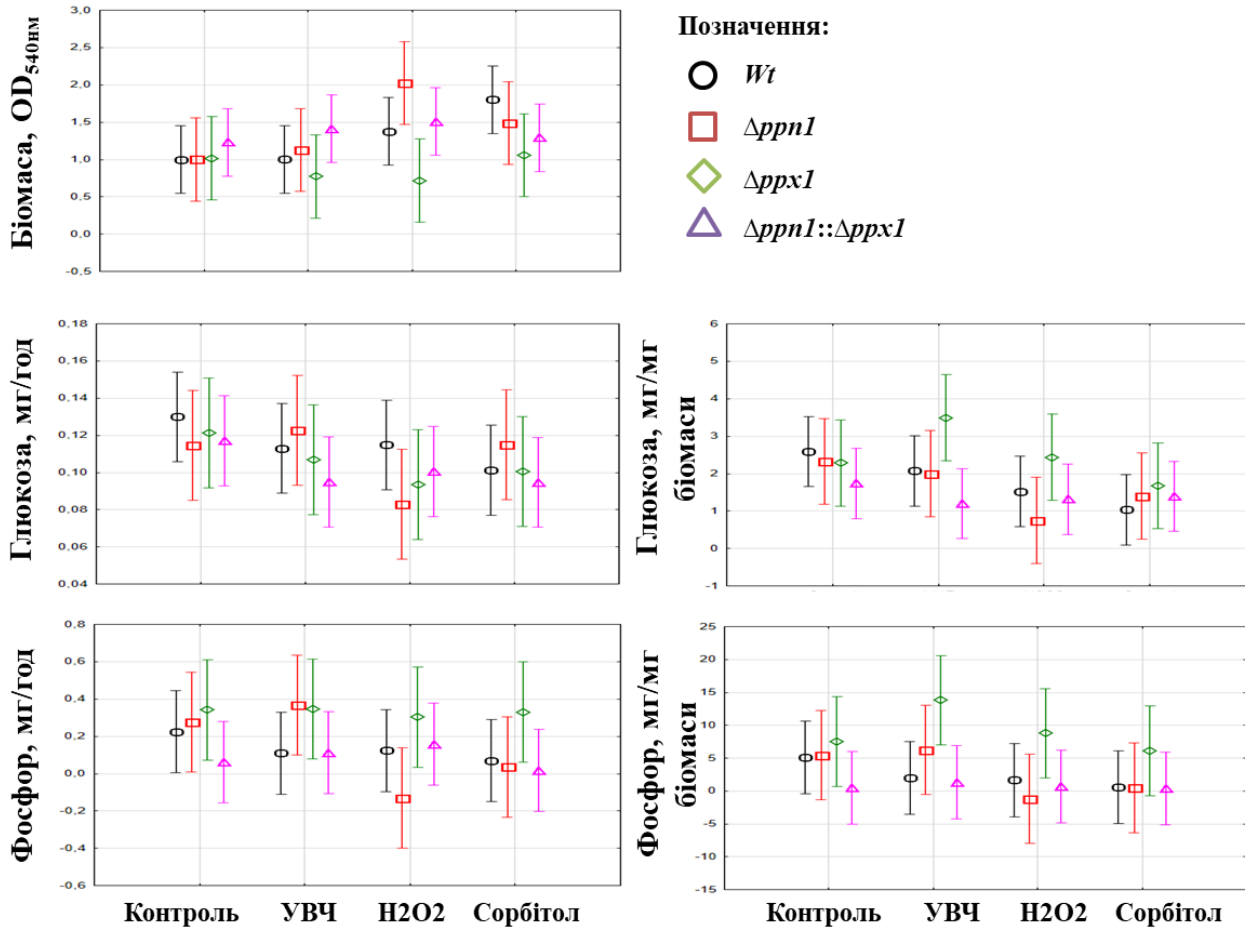


Рис. 5.8. Вплив факторів стресу на показники споживання глюкози і фосфору клітинами дріжджів дефектними за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1.

експресію *RNR3* і *PDR12*. Підвищена експресія PDR12 сприяє стійкості до слабких кислот, що може вказувати на порушення внутрішньоклітинного pH за дії цих факторів в *Wt*-клітинах. Підвищення ж експресії *GSY2* підвищує стійкість клітин до хімічних чинників і може вказувати на порушення процесів живлення і реплікативний стрес. Зважаючи на те, що рівень споживання субстрату *Wt*-клітинами за дії пероксиду гідрогену не змінюється (Рис. 5.8) але ми відмічаємо зниження рівню життєздатності цих клітини (Рис. 3.15), то очевидним є реплікативний стрес, як причина збільшення активності цього гену. Збільшення експресії *RNR3* (рибонуклеотид-дифосфат редуктаза, ферменту який приймає участь у синтезі dNTP), також може бути свідченням на користь порушення цілісності ДНК і запуск процесів її відновлення.

Порівняно із *Wt*-клітинами, в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами за дії пероксиду гідрогену було відмічене збільшену експресію *HSP12*, *PHO84*, *STI1* і *RNR3*, а в Δ*ppx1*-клітинах ще й *GDP1* і *GRE2* (Рис. 5.10). За дії ж кислотного стресу дефектність за полі(Ф)азами посилювала експресію *GSY2* і *STI1*, а в Δ*ppx1*-клітинах ще й гену *HSP12* (Рис. 5.10).

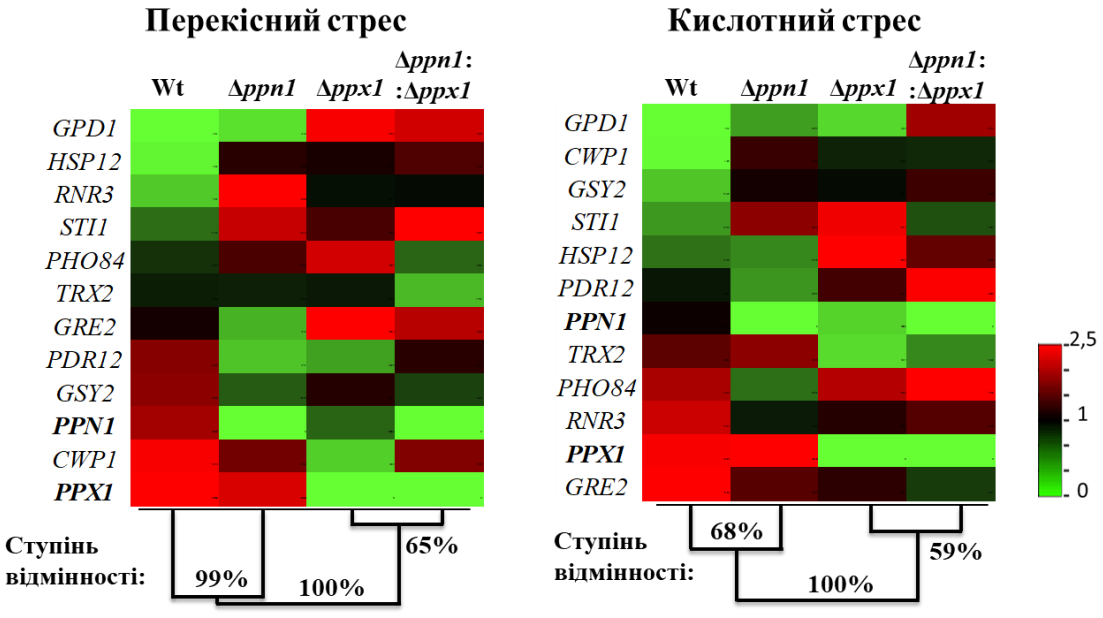


Рис. 5.9. Профілі експресії генів в клітинах дріжджів за дії факторів стресу (10 мМ пероксид гідрогену (оксидативний стрес) і 150 мМ оцтова кислота (кислотний стрес)) відносно референс-генів.

Активація генів-маркерів гіперосмотичного стресу (*HSP12*, *GDP1* і *GRE2*) може вказувати на порушення цілісності ЦПМ і КС. Посилення експресії *STI1*, в свою чергу, вказує на порушення у синтезі білків. А експресія *RNR3* вказує на

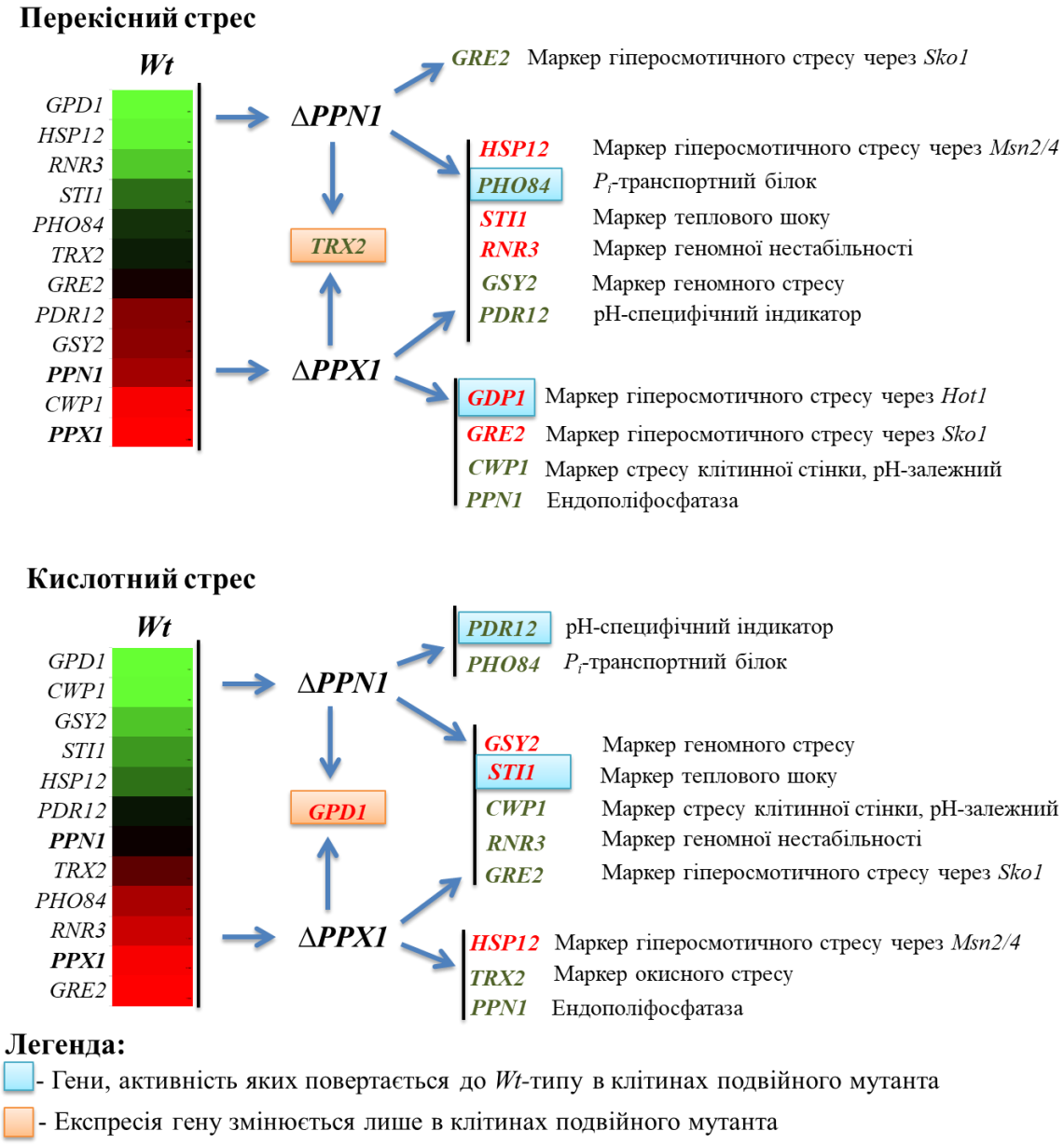


Рис. 5.10. Рівні експресії стрес-індукуємих генів в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 за дії 10 мМ пероксиду гідрогену (оксидативний стрес) і 150 мМ оцтової кислоти (кислотний стрес)) відносно референс-генів.

Позначки: червоним і зеленим шрифтом відмічено гени, рівень експресії яких, відповідно, збільшується і зменшується.

порушення цілісності геному. Тому, як і в *Wt*-клітинах, в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами відбувається індукція генів, які відповідають за відновлення цілісності ДНК. Однак, на відміну від *Wt*-клітин, дефектність за полі(Ф)азами викликає індукцію генів гіпертонічного стресу, що вказує на порушення цілісності КС і ЦПМ в цих клітинах.

Паттерни експресії змінюються за дії стресових чинників. Ендополі(Ф)аза (PPN1) виявила менший вплив на профіль експресії генів, порівняно із екзополі(Ф)азою (PPX1) (Рис. 5.9). Однак обидві полі(Ф)ази приймають участь у підтримці внутрішньоклітинного pH, тонічності, а також задіяні у формуванні клітинної відповіді при реплікативному стресі. Тим не менш генетичні шляхи формування відповіді на стреси в клітинах дефектних за полі(Ф)азами очевидно змінені. Адже, згідно отриманих нами даних, в клітинах батьківського штаму дія досліджених стресів вимагає експресії обох полі(Ф)аз, а також генів, продукти яких відповідають за систему pH-регуляції (*PDR12*), формування відповіді на оксидативний і реплікативний стрес (*TRX2*, *GSY2*, *RNR3*), а також система виживання при лімітуванні за поживними речовинами (*GSY2*) (Рис. 5.9). В клітинах дефектних за полі(Ф)азою PPN1 до цього набору генетичних факторів долучається система відновлення цілісності КС (*CWP1*), а в клітинах дефектних за полі(Ф)азою PPX1 – система регуляції гіперосмотичного шоку. І, відповідно, обидві ці системи активуються в клітинах із подвійною мутацією.

5.5. Вплив електромагнітного випромінювання (40,68 МГц) на експресію *UBC6*

З метою оцінити рівень пошкодження білків в клітинах дріжджів за дії стресових факторів, нами було оцінено показник експресії гену *UBC6*, який кодує убіквітин-зв'язуючий фермент і є невід'ємним елементом при формуванні комплексу убіквітин-білок, та сприяє усуненню аномальних і пошкоджених білків з ядра та цитоплазми, а також бере участь у процесах деградації білків, асоційованих з ендоплазматичним ретикулумом [525].

Показано, що експресія *UBC6* відбувається в клітинах дріжджів навіть за оптимальних умов культивування. Це узгоджується з функціональною роллю цього ферменту. Експресія цього ферменту в клітинах дріжджів штаму CRY була в 1,7 рази вищою за рівень експресії цього ж гену в клітинах Y-517, що ймовірно вказує на існування фізіологічного діапазону, в якому може змінюватися експресія даного гену. Проте, в опромінених клітинах експресія цього гену зростала в 1,5 і 2,1 рази порівняно із контролем в клітинах обох штамів (Таблиця 5.4).

Таблиця 5.4.

Вплив випромінювання ЕМВ 40,68МГц, 15 Вт, 60 хв. на експресію гену *UBC6* (методом RT-PCR)

Штам *S. cerevisiae*	Експозиція ЕМВ, хв	Концентрація амплікону, нг	Відмінності в експресії
Y-517 *Wt*	0	79,8 ± 1,12	1,5 ± 0,01
	60	118,0 ± 2,39	
CRY *Wt*	0	48,1 ± 0,13	2,1 ± 0,02
	60	102,1 ± 1,35	

Збільшення експресії *UBC6* може вказувати на підвищення пулу дефектних білків в клітинах дріжджів опромінених ДВЧ-ЕМВ, що в свою чергу може вказувати на цитотоксичну дію даного типу ЕМВ. Однак, одночасно з цим, надекспресія *UBC6* сприяє збільшенню стійкості клітин дріжджів до теплового шоку, оксидативного стресу і в цілому до хімічних сполук. А це може бути поясненням посилення стійкості клітин дріжджів до дії ряду хімічних факторів, яке має процедура опромінення клітин дріжджів за дії ДВЧ-ЕМВ до моменту дії інших факторів стресу. Також посилення експресії *UBC6* може бути одним із елементів адаптивної відповіді.

Таким чином, радіочастотне ЕМВ ДВЧ-діапазону не впливало на показник життєздатності клітин дріжджів, проте викликало явище геномної

мінливості і стимулювало експресію *UBC6*. Зважаючи на те, що геномна мінливість в даному випадку не пов’язана із змінами у життєздатності клітин дріжджів, можна зробити висновок, що всі зміни, які відбуваються в клітинах дріжджів за дії цього фактору не виходять за межі адаптаційного потенціалу організму.

Узагальнення розділу

Дефектність за полі(Ф)азами, так само як і дія стресових факторів, збільшує показник геномної нестабільності, однак рівень експресії *RNR3*, гену-маркеру геномної нестабільності, в клітинах делеційних мутантів знижений. Одночасно з цим, в Δ*ppn1*-клітинах відмічене підвищення експресії *GSY2*, що вказує на загальний геномний стрес. Такий результат вказує на існування різних способів індукції явища геномної нестабільності, а це, в свою чергу, вказує на те, що явище геномної нестабільності, так само як і синтез компонентів КС, ЦПМ, тощо, не визначаються активністю окремого гену, а є результатом комплексної дії кількох генетичних і, відповідно, фізіолого-біохімічних факторів (Рис. 5.11).

Дія стресових факторів, в тому числі й ЕМВ ДВЧ-, УВЧ- і НзВЧ-діапазонів, призводить до збільшення рівню геномної мінливості. Однак, на відміну від інших факторів стресу, ДВЧ-ЕМВ не мало мутагенної дії і не зменшувало показники життєздатності клітин дріжджів. Тому очевидно, що процес геномної нестабільності не є причиною зменшення рівнів життєздатності за дії факторів стресу, таких як оцтова кислота й пероксид гідрогену. Дія ДВЧ-ЕМВ призводила до активації експресії *UBC6*, що вказує на посилення механізмів деградації дефектних білків, а це може бути однією з причин збільшеної стійкості опромінених ДВЧ-ЕМВ клітин дріжджів до послідуючої дії хімічних чинників. В свою чергу відсутність мутагенної дії з боку ДВЧ-ЕМВ (на відміну від іншого типу випромінювання НзВЧ-діапазону) і одночасно відсутність протекторної дії щодо послідуючого впливу УФ-випромінювання, вказує на те, що за дії ДВЧ-ЕМВ в клітинах дріжджів не

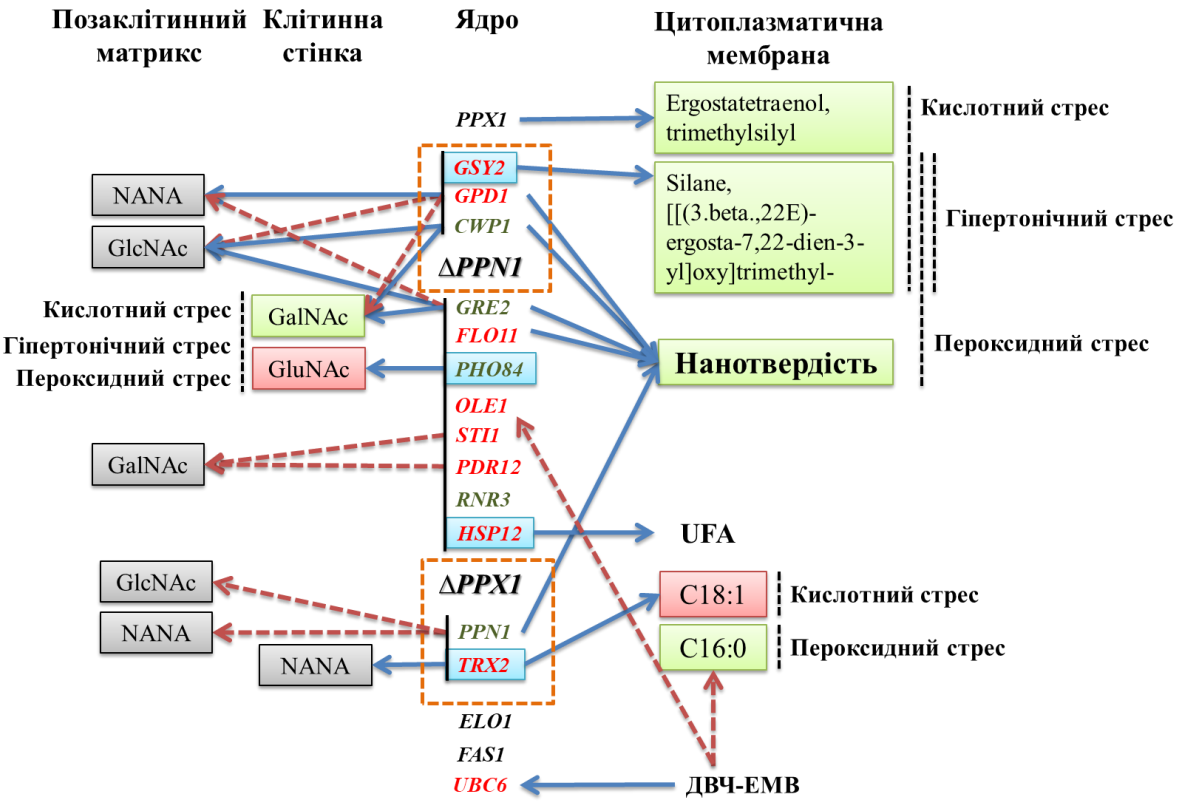


Рис. 5.11. Генетичні шляхи формування відповіді на стреси клітинами дріжджів дефектними за полі(Ф)азами.

відбувається запуск репараційних процесів для відновлення структури ДНК, які могли б посприяти збільшенню стійкості клітин дріжджів до дії УФ-випромінювання. Тому стає очевидним, що ДВЧ-ЕМВ не впливає на цілісність структури ДНК, а має вплив на процеси протікання біохімічних реакцій, ймовірно за рахунок пошкоджень конформації білків-ферментів. Такі пошкодження не є летальними, адже активують в клітинах відповідні процеси експресії білків *de novo* і включають механізми ліквідації пошкоджених білків. Усе це разом сприяє збільшенню стійкості клітин дріжджів до дії інших факторів стресу, таких як кислотний і оксидативний стреси, а також до антибіотиків [14].

Порівняння ефектів дії ДВЧ-ЕМВ з частотою 40,68 МГц із іншими типами неіонізуючого радіочастотного випромінювання показало, що ефект дії ДВЧ-ЕМВ є специфічним, притаманним лише даному типу випромінювання, адже збільшення частоти випромінювання до 1871 МГц і 30 ГГц викликало

пригнічення росту і ферментативної активності клітин дріжджів, а також мало мутагенну дію.

Ферменти полі(Ф)ази приймають активну участь в процесах протидії факторам стресу, адже забезпечують стабільність структури КС і ЦПМ, синтез білків і стеролів. Дефектність за цими ферментами вимагає активації генів, які відповідають за стійкість до гіпертонічних умов, відновлення цілісності геному і протидії оксидативному стресу (Рис. 5.7В). Аналіз кореляційних залежностей між рівнями експресії відповідних генів й іншими фізіологічними і біохімічними показниками визначеними для клітин дріжджів показав існування зв'язку (понад 96% при $p < 0,04$) між показником нанотвердості клітин дріжджів і експресією *PPN1*, *GPD1*, *GRE2* і *CWP1*. Окрім того активність *FLO11* мала високий ступінь кореляції з експресією *PPN1* і *GRE2* (понад 97% при $p < 0,03$). Вміст цукрів в КС і ПКМ виявляв високу кореляційну залежність із експресією цілого ряду генів, в той час як вміст окремих жирних кислот і окремих стеролів достовірно корелював із експресією *HSP12* і *TRX2*, і *GSY2* і *PPX1*, відповідно. З літератури добре відомо про існування зв'язку між активністю *GSY2* і синтезом стеролів [526], в той же час є свідчення й того, що синтез стеролів може бути пов'язаний із синтезом полі(Ф) [527]. TRX2p є ключовим ферментом, який впливає на етапи біосинтезу жирних кислот [528], в той же час рівень експресії *HSP12*, може мати, опосередковано, високий кореляційний індекс, адже зміни у складі жирних кислот, які відбуваються за дії стресів мають вплив й на активність *HSP12* [529]. Таким чином отримані нами дані добре узгоджуються з даними літератури і доповнюють їх новими генетичними зв'язками.

Основні положення розділу опубліковано у наукових працях [519-522, 534]

РОЗДІЛ 6.

ФЕНОТИПОВІ ЕФЕКТИ ДІЇ ФАКТОРІВ СТРЕСУ НА КЛІТИНИ ДРІЖДЖІВ

6.1. Вплив факторів стресу на чутливість клітин дріжджів до антибіотиків

Здатність мікроорганізмів пристосовуватися до умов оточуючого середовища є ключовим аспектом, який забезпечує їх життєздатність. Стійкість мікроорганізмів до хімічних чинників, і особливо різноманітних антибіотиків є однією з найбільших проблем, які постали на сьогодні перед наукою і медициною. Використання антибіотичних сполук в наукових дослідження має дві основні мети (медичну і біологічну), по-перше, вивчення впливу антибіотичних сполук на мікроорганізми дозволяє створювати нові підходи для посилення дії антибіотиків і уникнення явища антибіотикорезистентності. З іншого ж боку, зміна протимікробної активності будь-яких хімічних агентів з добре відомим механізмом дії може дозволити більш глибоко зрозуміти, які саме зміни на рівні клітин відбуваються за дії досліджуваних чинників. В своєму дослідженні ми зосередили увагу саме на другому аспекті для деталізації механізмів дії факторів стресу на клітини дріжджів. Ми використали антибіотики поліенового і азолового ряду, механізм дії яких реалізується через зміну структури ЦПМ і блокування синтезу ергостеролу. В наших дослідженнях ми показали, що як структура ЦПМ загалом, так і синтез стеролів, зокрема, мають високу чутливість до дії факторів стресу і опосередковані активністю ферментів полі(Ф)аз. Тому доцільно дослідити які з досліджених факторів стресу здатні викликати зміни в чутливості клітин дріжджів до антибіотиків і чи можуть полі(Ф)ази виступати факторами антибіотикорезистентності.

Чутливість мікроорганізмів, в тому числі й клітин дріжджів, до антибіотиків має штамові особливості [530]. Клітини дикого типу можуть суттєво відрізнятися за даним показником, а тому доцільно розглядати вплив

певних генетичних мутацій лише у порівнянні з вихідним батьківським штамом. Загальною рисою для всіх досліджених штамів дріжджів дикого типу була їх стійкість до ітраконазолу (Рис. 6.1). Більшість штамів були стійкими до амфотерицину В (за винятком клітин штаму Y-517), а клітини штаму CRY виявили стійкість ще й до флуконазолу.

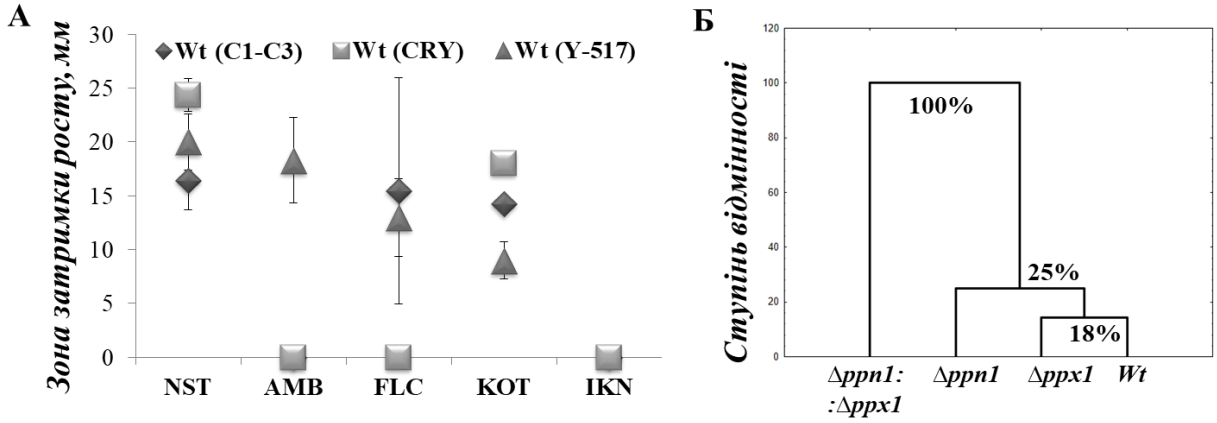


Рис. 6.1. Штамові відмінності у чутливості клітин дріжджів дикого типу (*Wt*) до антибіотиків поліенового і азолового ряду. (Б) – ступінь відмінності у чутливості клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами до антибіотиків.

Основним механізмом дії всіх антибіотиків азолового ряду (флуконазол, клотримазол і ітраконазол) вважається їхня здатність пригнічувати активність цитохром Р450, а саме ланостерол 14 α-деметилази (відомої також як *CYP51*), одного з ключових ферментів, який кодується в клітинах дріжджів геном *ERG11*, на шляху синтезу ергостеролу [531]. З трьох антибіотиків, специфічних до *CYP51*, тільки один (клотримазол) виявився активним проти клітин всіх досліджених штамів дріжджів, інший (флуконазол) був активним проти клітин більшості з досліджених штамів, а ітраконазол (який має найбільшу специфічність саме до *CYP51* [531]) взагалі виявився неактивним. Такі відмінності в ефективності дії цих антимікотиків, можуть бути пов’язані із відмінностями у конформації активного сайту зв’язування апопротеїну (апоферменту), який є вкрай варіабельним і відрізняється в різних видів живих організмів [532], але, вочевидь, це характерно й для штамового рівня.

Відмінності у чутливості до антибіотиків поліенового ряду (ністатину і амфотерицину В) можуть бути пов'язані із відмінностями у здатності молекул цих сполук зв'язуватися з мішенями в ЦПМ . Молекула ністатину, хоча й має лише незначні відмінності від молекули амфотерицину В, при цьому є значно більш токсичною.

Дефектність за полі(Ф)азами мала незначний вплив на чутливість клітин дріжджів до антибіотиків, але посилюється в клітинах подвійного мутанта, для якого відмічене близьке до достовірного збільшення чутливості до ністатину і клотримазолу (p = 0,09) і достовірне зменшення чутливості до флуконазолу (p < 0,01) (Рис. 6.2). Одночасне збільшення чутливості до клотримазолу і зменшення її до флуконазолу може вказувати на конформаційні зміни, які відбуваються в будові *CYP51* за відсутності обох полі(Ф)аз.

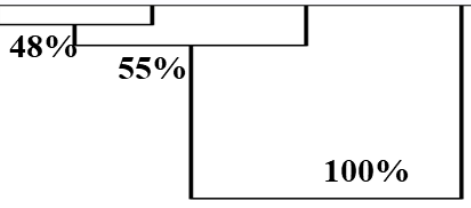
Ефекти дії факторів стресу не мали глобального характеру, а значним чином залежали від штамів [430, 432]. Так чутливість Wt-клітин штамів С1-С3 до ністатину не змінювалася, в той час як чутливість Wt-клітин іншого штаму (CRY) достовірно зменшувалася після дії пероксиду гідрогену (p = *0,023*) і ДВЧ-ЕМВ (p = 0,037) (Рис. 6.2). Відповідно й дефектність за полі(Ф)азами мала штамоспецифічний характер і дія факторів стресу на Δ*ppn1*-клітини штамів С4 і С5 не мала впливу на їх чутливість до антибіотиків, в той час як дія факторів стресу на Δ*ppn1*-клітини штаму CNX змінювала чутливість цих клітин до флуконазолу і ітраконазолу (Рис. 6.2). В цілому ж ефекти дії факторів стресу на Δ*ppn1*-клітини мали найменші (48%) відмінності від Wt-клітин, в той час як ефекти клітин із подвійною мутацією були найбільшими.

Кислотний стрес (дія 150 мМ оцтової кислоти) викликав зменшення стійкості клітин штамів С1-С10 до амфотерицину В, однак цей ефект не був підтверджений на клітинах інших штамів CRY і CNX (Рис. 6.2). Також цей фактор стресу знижував стійкість Δ*ppx1*-клітин до ністатину (p = 0,005), і стійкість клітин подвійного мутанта до флуконазолу (p = 0,029).

Вплив оксидативного стресу знижував стійкість клітин подвійного мутанта до клотримазолу (p < 0,001) і виказав тенденцію до збільшення його

Антибіотик / Фактор стресу	Зона затримки росту, мм					
	C1-C3	C4-C5	C6-C7	C8-C10	CRY	CNX
Ністатин	*Wt*	*Δppn1*	*Δppx1*	*Δppn1::Δppx1*	*Wt*	*Δppn1*
Контроль	16±3	16±2	15±1	19±4****	24±2	19±2
Оцтова кислота, 150мМ	16±2	16±0	22±0***	17±1	н/в	н/в
Пероксид гідрогену, 0,3mM	18±5	18±6	17±4	16±3****	18±2***	17±3
Сорбітол, 1М	15±3	15±3	15±3	17±3	21±5	24±3****
ДВЧ- ЕМВ (40,68МГц)	17±5	15±4	18±3	19±4	17±5***	18±3
Амфотерицин В						
Контроль	0	0	0	0	0	0
Оцтова кислота, 150мМ	10±1	10±1	10±2	10±1	0	0
Пероксид гідрогену, 0,3mM	0	0	0	0	0	0
Сорбітол, 1М	0	0	0	0	0	0
ДВЧ- ЕМВ (40,68МГц)	0	0	0	0	0	0
Флуконазол						
Контроль	15±11	14±11	17±3	6±9**	0	23±1
Оцтова кислота, 150мМ	18±0	16±0	17±0	17±2	н/в	н/в
Пероксид гідрогену, 0,3mM	12±7	6±7	9±7	7±8	0	34±3*
Сорбітол, 1М	9±7	9±7	11±9	8±10	14±2*	29±2*
ДВЧ- ЕМВ (40,68МГц)	11±6	9±7	5±7****	1±4**	0	20±1**
Клотримазол						
Контроль	14±1	13±1	15±5	18±3****	18±1	21±1
Оцтова кислота, 150мМ	16±0	16±0	16±0	15±0	н/в	н/в
Пероксид гідрогену, 0,3mM	10±7	13±6	10±8	7±6	10±1*	17±6****
Сорбітол, 1М	16±2	17±3	17±2	10±6***	12±1*	21±1
ДВЧ- ЕМВ (40,68МГц)	7±5	12±2***	10±3	7±9	10±1*	19±2
Ітраконазол						
Контроль	0	0	0	0	0	0
Оцтова кислота, 150мМ	0	0	0	0	н/в	н/в
Перекіс водню, 0,3mM	0	0	0	0	0	11±1*
Сорбітол, 1М	0	0	0	0	0	8±1*
ДВЧ- ЕМВ (40,68МГц)	0	0	0	0	0	0

Ступінь відмінності:



Примітка:
**** - p < 0,001***
***** - p < 0,01***
****** - p < 0,05***
******* - p < 0,10***

Рис. 6.2. Вплив факторів стресу на чутливість клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 до антибіотиків.

стійкості до ністатину (p = 0,063). Тенденція щодо збільшення стійкості до флуконазолу була відмічена й для Δ*ppn1*-клітин і Δ*ppx1*-клітин (p = 0,10, p = 0,08, відповідно). Здатність пероксиду гідрогену збільшувати стійкість клітин дріжджів до дії антибіотиків лише частково підтверджується даними отриманими для іншої групи штамів CRY і CNX, для яких відмічене зменшення чутливості до ністатину і клотримазолу, але збільшення чутливості до флуконазолу і ітраконазолу.

Гіпертонічність (дія 1М сорбітолу) збільшувала стійкість *Wt*-клітин до флуконазолу (p = 0,052) і клітин подвійного мутанта до клотримазолу (p = 0,001). Але також цей чинник збільшував чутливість клітин інших двох штамів CRY і CNX до ністатину, флуконазолу і ітраконазолу.

Передобробка клітин дріжджів ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц) мала здатність збільшувати стійкість клітин дріжджів до флуконазолу і ітраконазолу [533]. При цьому такий ефект був характерним для клітин всіх досліджених штамів дріжджів, що може вказувати на існування якогось універсального механізму дії випромінювання на антибіотикорезистентність клітин дріжджів, який очевидним чином відрізняється від механізму дії інших факторів стресу.

Інший тип випромінювання НзВЧ-діапазону (частотою 1871 МГц, експозиція 2 дні і 6 тижнів), не випливало на чутливість клітин дріжджів до поліенових антибіотиків, однак зменшувало чутливість клітин штаму Y-517 до

Таблиця 6.1.

Вплив електромагнітного випромінювання частотою 1871 МГц на чутливість клітин дріжджів до фунгіцидних антибіотиків

ЩПЕ, Вт/м²	Експозиція 2 дні					Експозиція 6 тижнів				
	NST	AMB	FLC	KOT	IKN	NST	AMB	FLC	KOT	IKN
0	20±3	0	18±4	13±4	9±2	21±4	0	18±3	14±3	11±2
0,1	19±2	0	10±4**	14±1	9±1	16±4	0	9±4**	14±3	10±3
2,5	20±3	0	10±6**	12±0	10±2	19±1	0	0*	11±6	0*
10	16±3	0	0*	14±1	0*	17±4	0	0*	19±5***	0*

***Примітка**: «ЩПЕ» - щільність потоку енергії електромагнітного випромінювання;*
** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,10$.*

азолів (флуконазолу і ітраконазолу) (Таблиця 6.1) [521]. Винятком став клотримазол, до якого чутливість клітин дріжджів в цілому не змінювалася, а після 6 тижнів опромінювання виказала тенденцію (p = 0,059) до збільшення за максимального навантаження з боку НзВЧ-ЕМВ. Слід зазначити, що ефекти дії НзВЧ були оберненими, адже зникали після 30 діб (300 поколінь) культивування за оптимальних умов [521].

В загальному плані дія кислотного стресу мала найменші (71%) відмінності від контролю (за оптимальних умов культивування) і здебільшого викликала збільшення чутливості клітин дріжджів до антибіотиків (Рис. 6.3). Така закономірність була характерною для всіх досліджених штамів дріжджів. Ефекти дії оксидативного стресу і ЕМВ (ДВЧ і НзВЧ діапазонів) були схожі між собою і відрізнялися від дії кислотного стресу направленістю дії: вони знижували чутливість клітин дріжджів до антибіотиків, тобто стимулювали

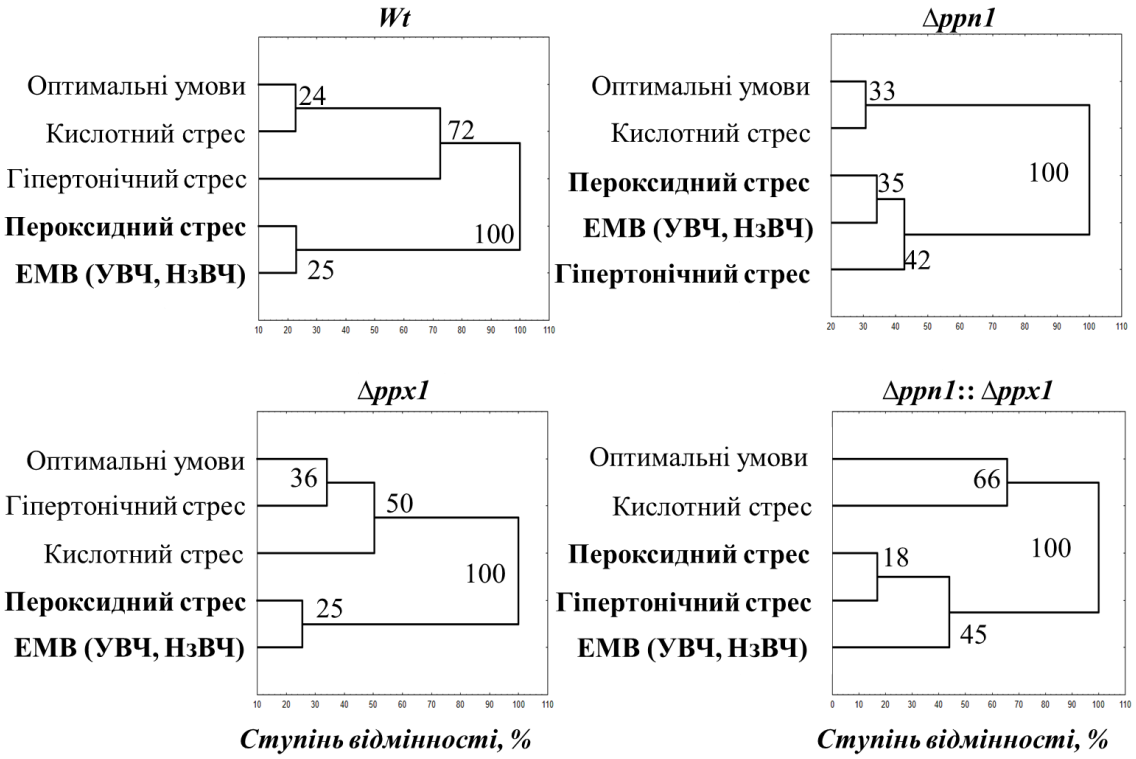


Рис. 6.3. Кластеризація факторів стресу за ефектами дії на стійкість клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1 до антибіотиків. Фактори виділені «жирним» стимулюють стійкість клітин дріжджів до антибіотиків.

явище антибіотикорезистентності. Гіпертонічність не мала стабільного ефекту і посилювала чутливість клітин до клотримазолу і одночасно знижувала їх чутливість до флуконазолу. Цей фактор виявляв певну залежність від дефектності за полі(Ф)азами.

Такий результат може вказувати на подібність механізмів дії пероксиду гідрогену і ЕМВ, що співпадає і підтверджується результатами вивчення фенотипових індексів і механізмів генної взаємодії (Розділ 1, Рис. 3.19).

Антибіотики також можна розглядати як фактор хімічного стресу, однак чутливість/стійкість клітин дріжджів до антибіотиків не має відношення (достовірних кореляційних залежностей) із показниками життєздатності клітин дріжджів за дії вивчених факторів стресу. Тобто здатність клітин дріжджів виживати за дії інших фізико-хімічних чинників не корелює із здатністю цих клітин виживати за дії вивчених антибіотиків. А значить механізми стійкості в даному випадку не перетинаються.

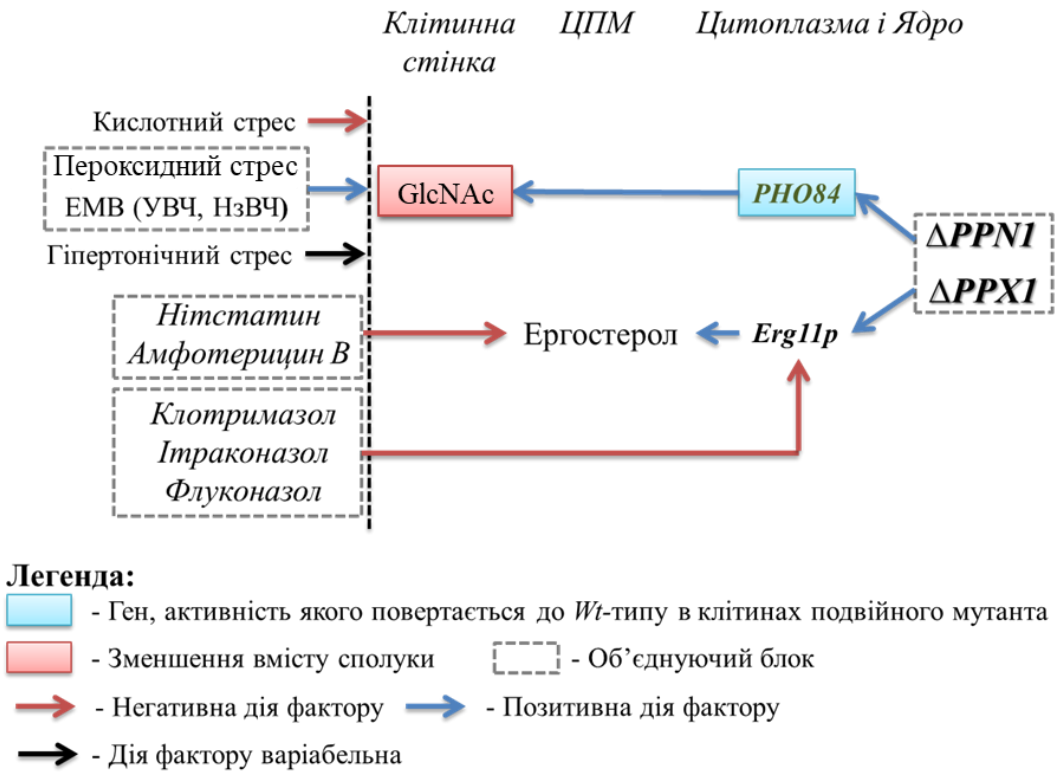
Показники стійкості клітин дріжджів до ністатину, клотримазолу і флуконазолу показали високі кореляційні залежності із вмістом *N*-ацетилглюкозаміном (GlcNAc) в КС дріжджів (95%-97% при $p < 0,05$). Такі ж високі кореляційні залежності були виявлені з рівнем експресії *PHO84*: негативна залежність із чутливістю до ністатину і позитивна залежність із чутливістю до флуконазолу (-99% і 99% при $p < 0,01$). Зважаючи на те, що інших кореляційних залежностей, ані з синтезом стеролів, а ні з вмістом жирних кислот, тощо, виявлено не було, ці кореляційні залежності можна було б віднести до випадкових. Однак, на сьогодні існують докази того, що як вміст GlcNAc, так і активність *PHO84*, обидва корелюють із стійкістю клітин до різних антибіотиків, що може відбуватися завдяки формуванню фізичної перешкоди з боку GlcNAc для ряду антибіотиків [534], і зумовлено залученням Pho84p як сенсора і сигнальну молекулу у фосфат-асоційовану активацію цАМФ-залежної протеїнкінази [535].

Узагальнення розділу

Процес формування клітинами мікроорганізмів стійкості до антибіотиків є однією з найбільших невирішених проблем сьогодення. Цей багатогранний процес, механізм якого досі до кінця не зрозумілий адже визначається цілою низкою різних внутрішньоклітинних і позаклітинних чинників. Тим не менше, зміну екологічного стану навколишнього середовища викликану антропогенним втручанням, вважають однією з можливих причин, які запускають внутрішньоклітинні адаптаційні механізми, які й призводять до збільшення стійкості до антибіотиків.

Проведені дослідження показали, що такі фактори стресу як оксидативний стрес і електромагнітне випромінювання радіочастотного діапазону (ДВЧ і НзВЧ), а в деяких випадках і гіпертонічність, дійсно можуть виступати факторами формування антибіотикорезистентності [520, 521]. Це підтверджує отримані нами раніше дані щодо здатності радіочастотного ЕМВ стимулювати стійкість клітин дріжджів до антибіотиків [134]. На противагу цим факторам, кислотний стрес, навпаки, сприяв зниженню стійкості клітин дріжджів до антибіотиків. Стійкість до антибіотиків азолового ряду реалізується через конформаційні зміни основної мішені для антибіотиків – ферменту ланостерол-14-*α*-деметилази (*CYP51*), або ж посилення експресії *ERG11*, гену, який кодує цей фермент. Обидва ці варіанти здатні викликати стійкість до азолових антибіотиків в цілому, однак, ми відмітили, що ефекти дії досліджених факторів стресу відрізняються для різних азолових антибіотиків, а тому припускаємо, що основним механізмом дії факторів стресу є саме конформаційні зміни мішені (Рис. 6.4). Це ж стосується й контролю з боку полі(Ф)аз (PPN1 і PPX1), адже дефектність за обома полі(Ф)азами зменшує чутливість клітин дріжджів до флуконазолу, але при цьому дещо збільшує чутливість клітин до клотримазолу.

Наряду із конформацією *CYP51*, іншими внутрішньоклітинними чинниками мікробної стійкості до антибіотиків можуть бути GlcNAc КС, а



Легенда:

- Ген, активність якого повертається до *Wt*-типу в клітинах подвійного мутанта
- Зменшення вмісту сполуки
- Об'єднуючий блок
- Негативна дія фактору
- Позитивна дія фактору
- Дія фактору варіабельна

Рис. 6.4. Схема формування стійкості клітин дріжджів до антибіотиків поліенового і азолового ряду опосередкована дією факторів стресу і активністю полі(Ф)аз PPN1 і PPX1.

також рівень експресії *PHO84*, ген, який кодує P_i-транспортний білок. Обидва ці показники пов'язані між собою і виявляють високі кореляційні залежності із стійкістю клітин дріжджів до дії факторів стресу в цілому (Рис. 5.11). Зменшення вмісту GlcNAc в КС є позитивним чинником для збільшення стійкості клітин дріжджів до дії вивчених стресів і антибіотиків. Натомість збільшення експресії *PHO84* має негативний вплив на стійкість до флуконазолу, і позитивний щодо стійкості до ністатину. Для *PHO84* відомо, що він активується за дії радіочастотного електромагнітного випромінювання, а це, в свою чергу, є додатковим свідченням про можливу причинну роль саме неіонізуючого електромагнітного випромінювання антропогенного походження (випромінювання засобів мобільного зв'язку, теле- і радіомереж, тощо) у посиленні явища антибіотикорезистентності, яке відмічається в останні кілька десятків років, а також вказує на роль фосфорного метаболізму у формуванні мікробної стійкості до антибіотиків.

6.2. Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на адгезивні властивості клітин дріжджів

Однією з функціональних властивостей живих організмів є здатність до прикріплення до поверхонь різної природи (біотичних і абіотичних). В основі цього механізму можуть лежати суто фізико-хімічні (зумовлені силами Лондона, Ван-Дер Ваальса (гідрофобними силами) і електростатичними силами [6, 12-17]), а також біологічні властивості самих клітин (біологічні фактори адгезії, тощо), а тому досить багато біологічних і небіологічних чинників можуть вплинути на цей процес. Здатність до прикріплення є відображенням цілої низки властивостей притаманних не лише КС (пасивна адгезія), але й внутрішньоклітинній організації, коли клітина формує специфічні фактори адгезії (активна адгезія). Ми дослідили яким чином неіонізуючі електромагнітні випромінювання радіочастотного діапазону впливатимуть на адгезивні властивості клітин дріжджів і яку роль відіграють у цьому процесі ферменти фосфорного метаболізму полі(Ф)ази [536–538]. Вивчення проводили на прикладі Ni-Cr та Co-Cr сплавів металів, які широко використовуються в стоматології для приготування зубних штифтів.

Адгезія клітин дріжджів до поверхні стоматологічних сплавів за дії ДВЧ-ЕМВ

Клітини дріжджів утворювали щільні, іноді багатошарові, угруповання на поверхні сплавів металів (рис. 6.5). Кількість прикріплених клітин на одиницю поверхні суттєво змінювалася в залежності від типу сплаву металу і методу його

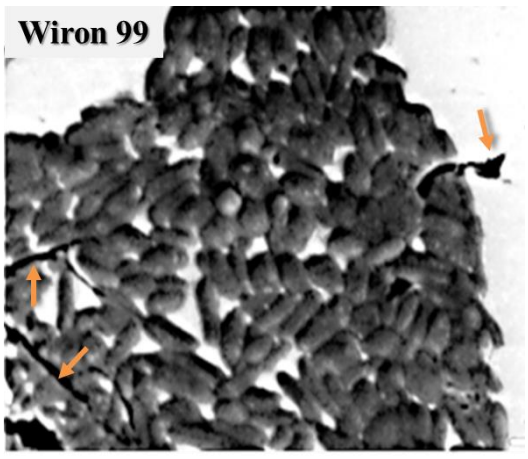


Рис. 6.5. Адгезія клітин дріжджів до поверхні сплаву Wiron 99 (скануюча електронна мікроскопія, зб. ×2000). Примітка: стрілочками показані дефекти на поверхні сплаву.

литва (Рис. 6.6А). В деяких випадках контакт клітин дріжджів із досліджуваними сплавами призводив до стимуляції їх росту, що було зафіксовано по показниках оптичної щільності суспензії клітин і збільшенню в

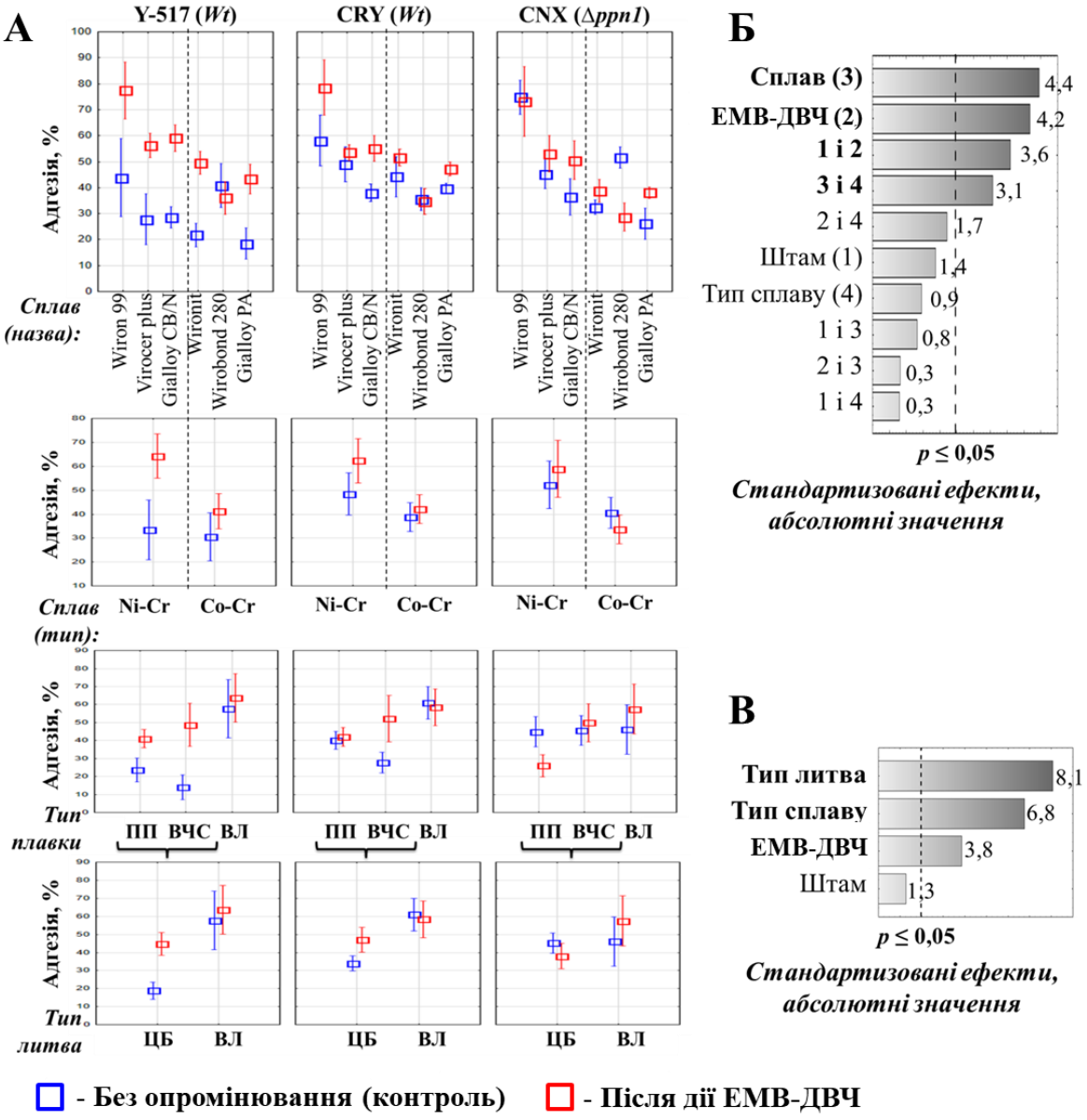


Рис. 6.6. Вплив ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 15Вт, 30 хв) на адгезію клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів Y-517, CRY і CNX до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів. (А) – відсоток адгезії залежно від типу сплаву і способу його приготування (плавки і литва). (Б і В) – Діаграми Парето, на яких показано величину ефекту і значущість впливу досліджених факторів на показник адгезії. *Примітка:* «ПП» - плавка полум'ям, «ВЧС» - високочастотний струм, «ЦБ» і «ВЛ» - центробіжне і вакуумне литво.

1,5-3 рази діаметру колоній сформованих на агаризованому поживному середовищі. Такий ефект був зафіксований для клітин штаму Y-517 після їх взаємодії із нікель-хромовим сплавом Wiron 99 приготованим методом плавлення у відкритому полум'ї, і з кобальт-хромовими сплавами Wirobond 280 і Gialloy PA приготованими методом індукційного плавлення, а також для клітин штаму CNX при їх контакті зі сплавом Gialloy PA приготованим методом вакуумного литва. Тобто ефект не мав глобального характеру і був суто штамоспецифічним.

Ступінь адгезії клітин дріжджів до нікель-хромових сплавів був дещо вищим порівняно із кобальт-хромовими сплавами, однак різниця була статистично недостовірною. Індивідуальні характеристики сплавів були найбільш вагомим чинником, який визначав показник адгезії і найбільша величина адгезії була відзначена для Wiron 99 – нікель-хромового сплаву, а найменша – для Gialloy PA – кобальт-хромового сплаву (Рис. 6.6A).

До індивідуальних особливостей сплавів можна віднести такі показники як нерівність поверхні (шорсткість), заряд на поверхні, гідрофобність, компонентний склад, тощо. За літературними даними шорсткість поверхні є першочерговим чинником, який визначає величину адгезії мікроорганізмів на поверхні. Однак, аналіз поверхні сплавів показав, що шорсткість поверхні в цілому однакова і не перевищує 6 нм (Рис. 6.7A), а тому це дозволяє одразу ж виключити цей показник і не пов'язувати отримані результати з нерівностями на поверхні сплавів.

6.2.1. Поверхневий потенціал сплавів металів

Поверхневий потенціал сплаву впливає на однорідність мікроадгезивних властивостей поверхні. Навіть якісно відполіровані поверхні зразків сплавів мають суттєві флуктуації поверхневого потенціалу (Рис. 6.7A). Рельєф поверхні сплаву не виявляв збігів з цими флуктуаціями, адже в основному неоднорідність потенціалу виявлялася навколо дефектів у порушеному приповерхневому шарі таких як, наприклад, заполіровані подряпини.

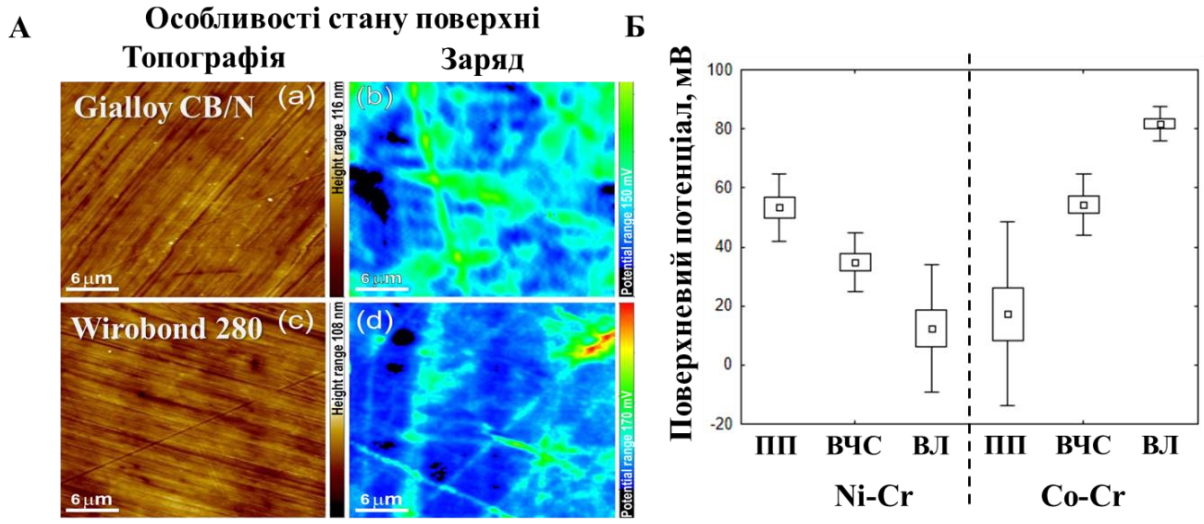


Рис. 6.7. Особливості поверхні нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів (a) і (c), і відповідні їм карти флуктуацій величини поверхневого потенціалу (b) і (d). (Б) – Середній показник коливання поверхневого потенціалу сплавів.

Примітка: сплави Gialloy CB/N і Wirobond 280 приготовані методом центробіжного литва і індукційного плавлення. Особливості будови поверхні сплавів отримані за допомогою атомно-силової мікроскопії. Неоднорідність поверхні в середньому 5,3 нм. «ПП» - плавка полум'ям, «ВЧС» - високочастотний струм, «ВЛ» - вакуумне литво.

Незважаючи на те, що сліди великих подряпин у рельєфі не простежувалися, все ж ділянки поверхні, порушені абразивом великих розмірів на етапах полірування мали суттєвий внесок у локальний потенціал поверхні. Абсолютні величини значень поверхневого потенціалу сплавів оцінених Кельвін-зонд мікроскопією на повітрі з використанням PtIr зонду становили близько 300 мВ для нікель-хромових сплавів та порядку 450 мВ для кобальт-хромових сплавів. Ці величини виявилися близькими до розрахункових для чистого нікелю та кобальту (280 мВ та 549 мВ, відповідно).

Значення потенціалу коливалися в різних діапазонах для різних зразків і в основному носили спорадичний характер, що зумовлено високою локальністю вимірювань і неоднорідністю поверхневого розподілу дефектів в

матеріалі. Тим не менше, можна припустити, що така неоднорідність (коливання значень поверхневого потенціалу в широкому діапазоні) насправді може сприяти адгезії клітин дріжджів до поверхні сплаву адже забезпечує широкий діапазон величин заряду для формування фізичного контакту між поверхнею і клітиною. Для адгезії ж необхідно, щоб різниця між зарядом клітини і зарядом поверхні була якнайбільшою і не обов'язково протилежною, адже адгезія відбувається навіть якщо мікроорганізм і поверхня для адгезії мають однаково позитивний чи негативний заряд [539]. Так, зокрема, для сплаву Gialloy CB/N найменші зміни поверхневого потенціалу виявлені для зразків відлитих методом вакуумного литва: від 0 мВ до 20 мВ. При центробіжному литві потенціал збільшувався і досягав значень 50-60 мВ. Для кобальт-хромового сплаву Gialloy PA найменші флуктуації потенціалу відмічалися у зразків, відлитих методом центробіжного литва і плавленням полум'ям 0-30 мВ. Для зразків, відлитих методом високочастотного плавлення і вакуумним литвом значення досягали, відповідно, 60 мВ і 80 мВ. Для сплаву Wirobond 280 відлитого методом вакуумного литва, амплітуда змін локального поверхневого потенціалу досягала 80 мВ і величина адгезії клітин дріжджів штаму Y-517 становила 86%.

Таким чином, діапазон коливань потенціалу на поверхні сплавів, приготованих методом вакуумного литва, вищий для нікель-хромових сплавів, у порівнянні із зразками сплавів, відлитих методами центробіжного литва. Однак для кобальт-хромових сплавів, тенденція була оберненою, а тому показник потенціалу на поверхні сплаву, а також показник варіювання цього потенціалу, не можуть бути поясненням виявлених величин адгезії.

6.2.2. Гідрофобні властивості поверхні нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів металів

Іншим вагомим показником, який може впливати на величину адгезії клітин дріжджів до абіотичних поверхонь є показник гідрофобності (змочування) поверхні. Це один із найвагоміших чинників, який визначає

біоадгезивні властивості. Показник гідрофобності, який визначався за краєвим кутом краплі на поверхні відповідного сплаву, суттєво відрізнявся в залежності від способу литва. Хоча для більшості досліджених зразків сплавів значення краєвого кута (середні значення краєвого кута для краплі, яка прийшла в стан термодинамічної рівноваги протягом 600-800 сек) було досить близькими і знаходилося в діапазоні 75°-80° (Рис. 6.8Б). В цілому ж нікель-хромові сплави демонстрували тенденцію до кращого змочування, тобто мали менші значення краєвого кута, порівняно із кобальт-хромовими сплавами. Окрім того незалежно від хімічного складу, сплави приготовані методом вакуумного литва також демонстрували зменшення кута змочування. Загалом, найнижчий показник кута змочування поверхні був виявлений для сплаву Gialloy CB/N (51°-57°), відлитого вакуумним литвом, а найвищий кут змочування – для сплаву Wironit, відлитого методом центробіжного литва з плавленням сплаву високочастотним струмом (80°-88°).

Показник змочування поверхні сплавів виявляв досить добру кореляцію із величинами адгезії відміченими для клітин дріжджів. Наприклад, зменшення краєвого кута на 12-16% характерне для зразка кобальт-хромового сплаву

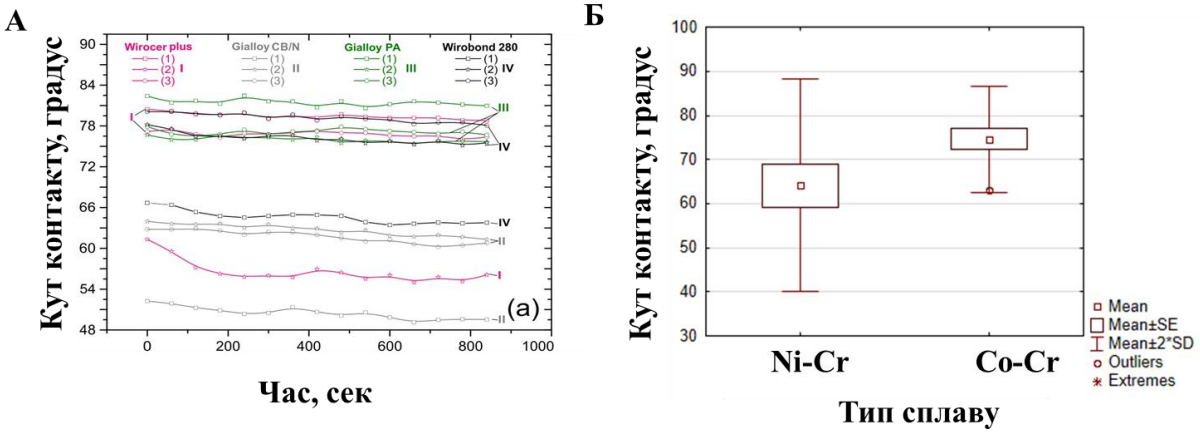


Рис. 6.8. Гідрофобність поверхні нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів відповідно до величини кута контакту краплини дистильованої води із поверхнею сплаву: (А) – зміна кута контакту із часом для різних сплавів, (Б) – усереднені значення кута контакту для нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів.

Wirobond 280 отриманого методом вакуумного литва, в порівнянні із зразками відлитими центробіжним способом, може відповідати збільшенню показника адгезії клітин штамів Y-517 більше як на 50%. Однак, зважаючи на те, що показник змочування поверхні не єдиний чинник, який здатен впливати на здатність клітин дріжджів до адгезії, тож така закономірність не була універсальною.

6.2.3. Мікроадгезивні сили, як фактор змочування поверхні сплавів

Модельні дослідження із використанням силіконової мікросфери діаметром 1 мкм на прикладі нікель-хромового сплаву Gialloy CB/N та кобальт-хромового сплаву Wirobond 280 показали зв'язок між показником краєвого кута змочування та величиною адгезивних сил, що діють на мікрорівні. Адгезія кремнієвої сфери до цих видів сплавів, виготовлених методом центробіжного литва знаходилася в порівняно близьких значеннях, і в середньому складала

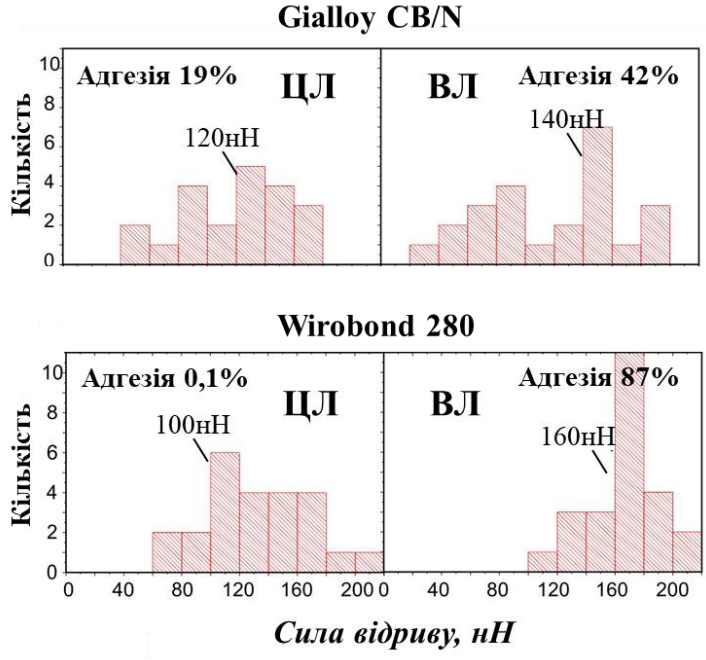


Рис. 6.9. Вимірювання сили відриву кремнієвої мікросфери (діаметр 1 мкм) від поверхні металу. Гістограми показують розподіл визначених сил при повторних вимірюваннях. Примітка: «ЦЛ» і «ВЛ» - відповідно, центробіжне і вакуумне литво. Наведено показник адгезії (у %) клітин дріжджів штаму Y-517 до поверхні відповідного сплаву.

140 нН, в той час, як для сплавів, відлитих методом вакуумного литва даний показник досягав 150 нН для Gialloy CB/N і 170 нН для Wirobond 280 (Рис. 6.9). Малі значення краєвих кутів відповідали великим значенням силових взаємодій, тобто значній адгезивній взаємодії. Ці дані добре узгоджуються із показниками адгезії клітин дріжджів (на гістограмах наведено відповідні значення адгезії для клітин штаму Y-517) (Рис. 6.9). Так краєвий кут сплаву Wirobond 280, отриманого методом вакуумного литва, складав 63,4°, максимум мікроадгезивних сил знаходився в положенні 170 нН, а адгезія дріжджів штаму Y-517 сягала значення 86%. Тобто малі кути змочування та великі значення мікроадгезивних сил відповідали високій біоадгезії клітин дріжджів.

Однак така залежність була виявлена не для всіх досліджених зразків сплавів та не для всіх штамів дріжджів (*результат не наведено*). Гістограми не завжди мали чітко виражений максимум, що каже про значну неоднорідність адгезивних властивостей поверхні сплавів на мікрорівні, що у випадку вивчення адгезії клітин дріжджів може бути виявлено за величною показника варіювання.

Отримані результати вказують на подібність між динамікою сили адгезії характерної для кремнієвої сфери і показником адгезії клітин дріжджів. При адгезії клітин дріжджів до поверхні сплавів металів важливу роль відіграють як фізичні закони, так і біологічні чинники, що впливають одночасно на фізико-хімічний стан поверхні сплавів металів і властивості КС мікроорганізмів.

6.2.4. Елементний склад сплавів як фактор адгезії

Оцінка величини адгезії клітин дріжджів по відношенню до вмісту мажорних компонентів сплавів (нікелю, кобальту і хрому), показала обернену залежність із вмістом хрому: адгезія клітин суттєво знижується із збільшенням вмісту хрому і фактично не залежить від вмісту нікелю і кобальту (Рис. 6.10). Слід зазначити, що для клітин дріжджів вирощених за оптимальних умов, основне значення мав абсолютний вміст хрому, а не його співвідношення із вмістом Ni і Co. Однак, це було порушене після обробки клітин дріжджів ДВЧ-

ЕМВ, адгезія яких визначалася співвідношенням всіх трьох мажорних компонентів (Рис. 6.13), хоча саме вміст Ni і Co мав позитивний вплив на показник адгезії опромінених клітин до сплавів металів, тобто із збільшенням вмісту цих елементів показник адгезії збільшувався навіть за найвищих концентрацій хрому в сплаві (Рис. 6.10).

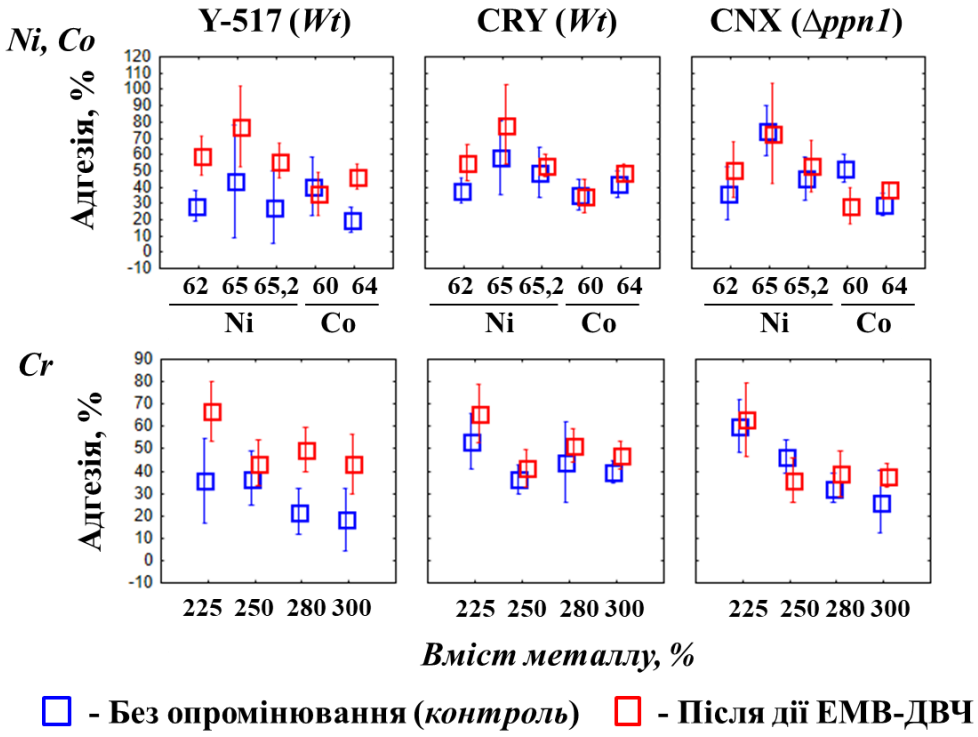


Рис. 6.10. Залежність адгезії опромінених і неопромінених ДВЧ-ЕМВ клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів Y-517, CRY і CNX до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів із різним вмістом основних компонентів (нікель, кобальт і хром).

Окрім мажорних компонентів, нікель-хромові і кобальт-хромові сплави містять також, в різній кількості, й мінорі елементи, такі як Nb, Fe, W, Mo, Si, C, Mn, і Ga (кількісний вміст див. у Додаток 10). Аналіз щодо можливої ролі мінорних компонентів у забезпеченні адгезивних властивостей клітин дріжджів показав, що в складі нікель-хромових сплавів основним фактором адгезії може виступати нубідій ($F = 9{,}4$ і $p = 0{,}002$), збільшення вмісту якого посилює показник адгезії клітин дріжджів (Рис. 6.11) і ефект дії якого переважає негативний вплив з боку хрому ($F = 9{,}0$ і $p = 0{,}003$) (Рис. 6.13). Інший мінорний

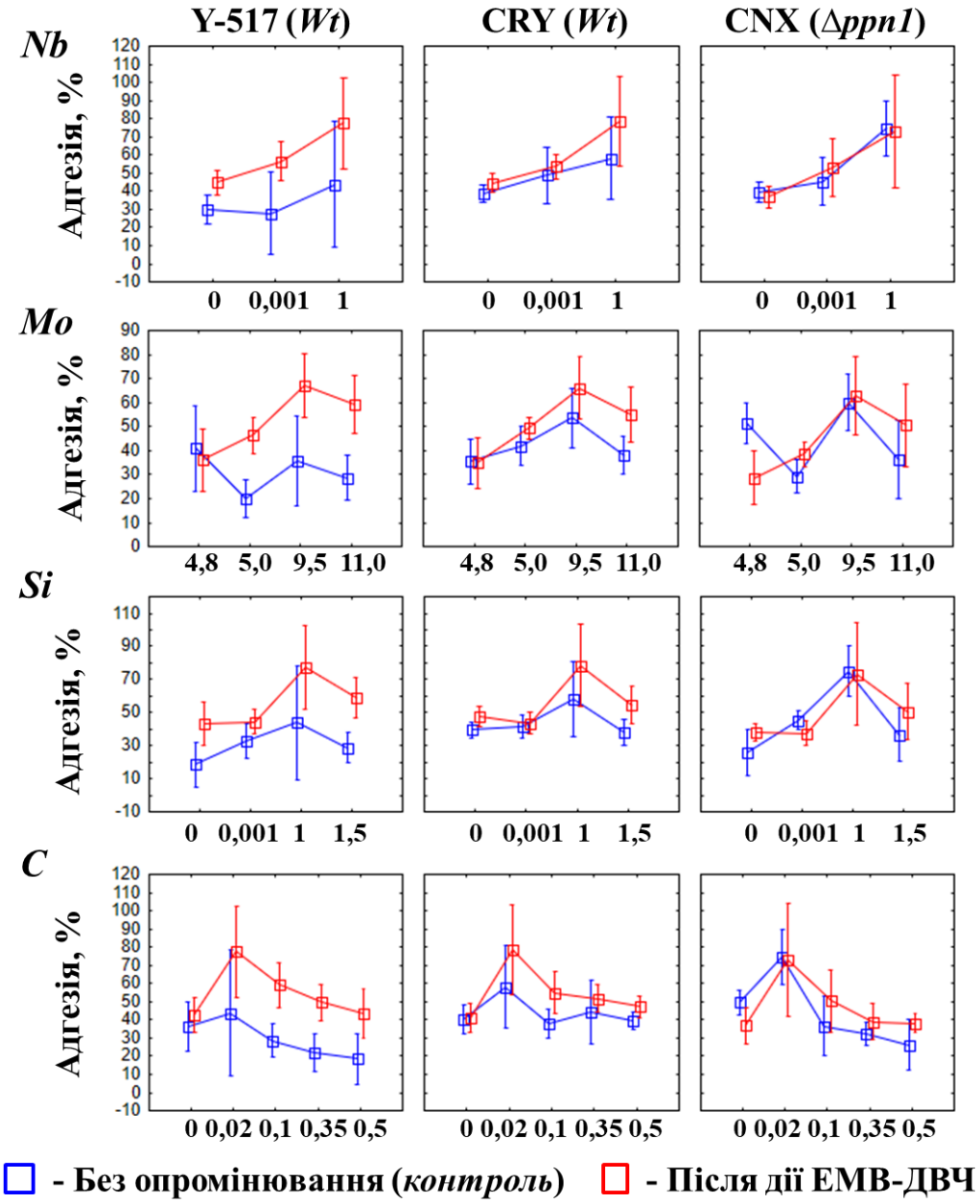


Рис. 6.11. Залежність адгезії опромінених і неопромінених ДВЧ-ЕМВ клітин дріжджів до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів із різним вмістом мінорних компонентів (*Nb* - нубідій, *Mo* - молібден, *Si* - кремній, *C* - вуглець).

елемент, молібден, має статистичну вагу лише для клітин опромінених ДВЧ-ЕМВ і, так само, як і нубідій, сприяє збільшенню адгезії опромінених клітин на поверхні сплавів (Рис. 6.13).

Кобальто-хромові сплави не містять нубідію, але містять молібден, який є одним з трьох основних чинників адгезії серед мінорних компонентів сплавів.

Молібден, у складі кобальто-хромових сплавів має негативний вплив (-2,5 абсолютні одиниці при $F = 6,4$ і $p = 0,01$) на показник адгезії близький за величиною до ефекту хрому (-2,6 абсолютні одиниці при $F = 6,7$ і $p = 0,01$) (Рис. 6.13). Іншими двома чинниками являються кремній ($F = 5,6$ і $p = 0,02$) і вуглець ($F = 4,0$ і $p = 0,05$), і вони мають позитивний вплив на показник адгезії і, вочевидь, можуть вважатися факторами адгезії для клітин дріжджів при їх взаємодії з кобальто-хромовими сплавами. Особливим чином ефект кремнію і вуглецю проявляється для клітин дріжджів опромінених ДВЧ-ЕМВ, для яких присутність молібдену не має вагомого впливу і величина адгезії визначається кремнієм і вуглецем, а протидіє їй – хром (Рис. 6.13).

6.2.5. Спосіб литва сплавів як фактор адгезії

Поряд із індивідуальними характеристиками сплавів, серед яких вміст окремих компонентів має найбільший вплив, тип литва сплаву також виявився достовірним чинником, який мав вплив на показник адгезії клітин дріжджів ($F = 65,2$ і $p < 0,001$) (Рис. 6.6Б і В). Найбільш високі показники адгезії були відзначені для сплавів, приготованих методом вакуумного литва (Рис. 6.6А). При цьому тип плавки сплаву (плавка полум'ям чи високочастотним струмом) не мав достовірного впливу.

Спосіб литва сплаву визначає, перш за все, особливості його мікрокристалічної структури: ступінь текстурованості та співвідношення кристалічної і аморфної фаз, що має суттєвий вплив на антикорозійні властивості поверхні сплаву [540, 541]. Відповідно, найбільшу корозійну стійкість мали зразки кобальто-хромових сплавів, отримані методом центробіжного литва із індукційною плавкою (стійкість сплаву Wirobond 280 була найвищою). Однак показники адгезії для цього сплаву не виявляли достовірних відмінностей від інших кобальто-хромових сплавів (Рис. 6.6), а тому цілком резонно зробити висновок, що антикорозійні властивості сплавів не перешкоджають адгезії на їх поверхні клітин дріжджів.

6.2.6. Вплив ДВЧ-ЕМВ на адгезію клітин дріжджів до поверхні сплавів

Дія ДВЧ-ЕМВ була одним з найбільш вагомих факторів, яка, не залежно від компонентного складу і способу литва сплавів, визначала величину адгезії клітин дріжджів. Така залежність була притаманна клітинам обох штамів дикого типу Y-517 і CRY. Однак дія ДВЧ-ЕМВ не мала суттєвого значення щодо величини адгезії клітин дефектних за полі(Ф)азою PPN1 і величина адгезії цих клітин визначалася компонентним складом і методом приготування сплавів. Ці ж фактори були вагомими й для клітин дикого типу. Тобто біологічні фактори, які визначали процес адгезії клітин дріжджів дефектних за PPN1 до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів не були чутливими до дії ДВЧ-ЕМВ, на відміну від клітин дикого типу. Тим не менше, ефективність адгезії навіть опромінених клітин дріжджів визначалася способом литва сплаву (F = 24,2 при p < 0,001).

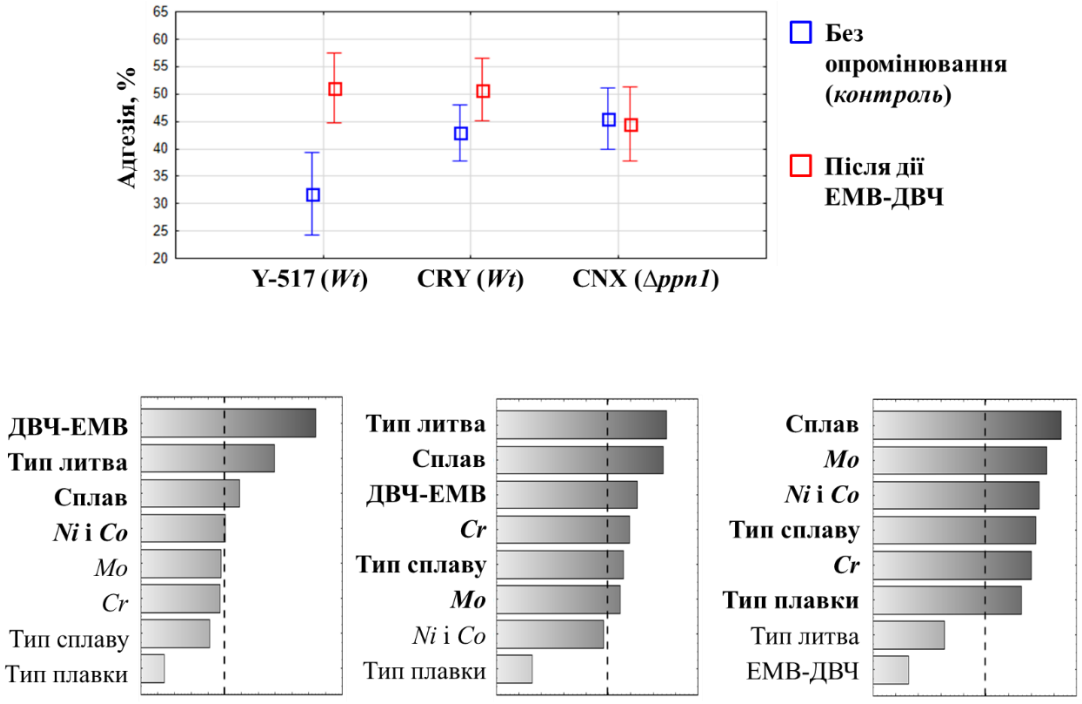


Рис. 6.12. Вплив ДВЧ-ЕМВ на величину адгезії клітин дріжджів до нікель-хромових і кобальт-хромових стоматологічних сплавів металів.

6.2.7. Фізико-біологічні параметри клітин дріжджів як фактори адгезії до поверхні сплавів

Причина відмінностей адгезивних властивостей Δ*ppn1*-клітин від *Wt*-клітин очевидно полягає у відмінностях властивостей їх поверхонь. Найбільш вагомими чинниками, які впливають на адгезивні властивості біологічних поверхонь є заряд поверхні клітин дріжджів і показник їх гідрофобності, а також такі біологічні чинники, як специфічні фактори адгезії, наприклад білки-адгезини (білки-лектини).

Аналіз показнику заряду поверхні клітин дріжджів показав, що клітини досліджених штамів дріжджів, в тому числі клітин дефектні за полі(Ф)азою PPN1, мають однаковий негативний заряд який становив -20,5 мВ. Дія ДВЧ-ЕМВ не викликала змін цього показнику і єдиним чинником, який мав вплив, виявилися незначні флуктуації властивостей буферної системи, в якій проводили визначення. Максимальна відмічена величина заряду поверхні досягала -27 мВ. Однак, навість за таких умов цей показник був однаковим для клітин всіх досліджених штамів дріжджів. А тому даний показник є стабільним для клітин різних штамів дріжджів, не залежить від дефектності за полі(Ф)азою і не змінюється після дії на клітин дріжджів ДВЧ-опромінювання.

Інший показник – гідрофобність клітин дріжджів, яку визначали в суміші вода : *n*-октан, а також, вода : *n*-гексан, також не змінювався для клітин дріжджів досліджених штамів і не виказував залежності від дефектності за полі(Ф)азою PPN1, або ж після дії ДВЧ-ЕМВ. Загалом, клітини характеризувалися досить низьким рівнем гідрофобності: 14-18%.

Спроба виявлення не поверхні клітин дріжджів специфічних факторів адгезії, білків-лектинів, методом аглютинації кролячих еритроцитів показала, що клітини досліджених штамів дріжджів не мають цих структур на своїй поверхні. Недолік цього методу полягає у його досить вузькій специфічності щодо манан-асоційованих адгезинів. А тому отриманий негативний результат,

звісно ж, не виключає існування інших факторів адгезії, специфічних до інших цукрових залишків.

Загалом, отриманий результат показав, що основні фізико-біологічні властивості поверхні клітин дріжджів однакові для клітин різних штамів і не змінюються після дії ДВЧ-ЕМВ, а тому не можуть бути причиною відмічених змін показнику адгезії цих клітин до різних сплавів металів.

Узагальнення розділу

Величина адгезії клітин дріжджів до нікель-хромових і кобальто-хромових сплавів виявляла залежність, як із біологічними (штамовими) так і небіологічними (тип сплаву, компонентний склад, тощо) чинниками (Рис. 6.13). До фізико-біологічних чинників, які впливають на адгезію і визначаються особливостями будови клітин, відносять заряд на поверхні клітин, її гідрофобність і наявність на поверхні специфічних біологічних факторів адгезії. Проведені вимірювання показали, що усі ці показники є однаковими для клітин різних штамів дріжджів і не змінювалися на за дефектності за полі(Ф)азою PPN1, ні за дії ДВЧ-ЕМВ: заряд на поверхні клітин дріжджів становив -20,5 мВ і показник гідрофобності був 14-18%. Тому очевидно, що зовсім інші біологічні чинники мають вплив на показник адгезії клітин дріжджів до поверхні сплавів.

Серед небіологічних чинників, тип сплаву і його елементний склад, а також метод литва, мали приблизно однаковий вплив на величину адгезії, як і біотичні чинники. При цьому ефективними виявилися окремо взяті фактори, а не їхні взаємодії, тобто ефект дії окремих елементів не залежав від методу литва і плавки сплавів. Роль абіотичних чинників значно зростала після дії на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ, а роль біологічних факторів зникала (Рис. 6.13). В цілому це призводило до збільшення показнику адгезії опромінених клітин до поверхні сплавів в порівнянні з неопроміненими клітинами. Тим не менше ефективність до адгезії навіть опромінених клітин дріжджів визначалася способом литва сплаву (центробіжне чи вакуумне). Спосіб литва і компонентний склад сплаву можуть визначати особливості мікрокристалічної структури сплавів,

шорсткість поверхні, капілярні сили (гідрофобність) і поверхневий потенціал. Однак, як і у випадку вимірювання біологічних чинників, ми не виявили достовірного зв'язку жодного з цих фізичних чинників з показником адгезії.

Дефектність клітин дріжджів за PPN1 мала суттєвий вплив на вміст цукрів у ПКМ (збільшення вмісту *N*-ацетилнейрамінової кислоти і відповідне зменшення *N*-ацетилглюкозаміну і *N*-ацетилгалактозаміну), а також негативно впливало на експресію *FLO11* і *CWP1* (GPI-білків КС). Зважаючи на те, що інші фізичні параметри-показники стану поверхні клітин (заряд, гідрофобність) є однаковими для клітин різних штамів, цілком ймовірно, що саме зміни

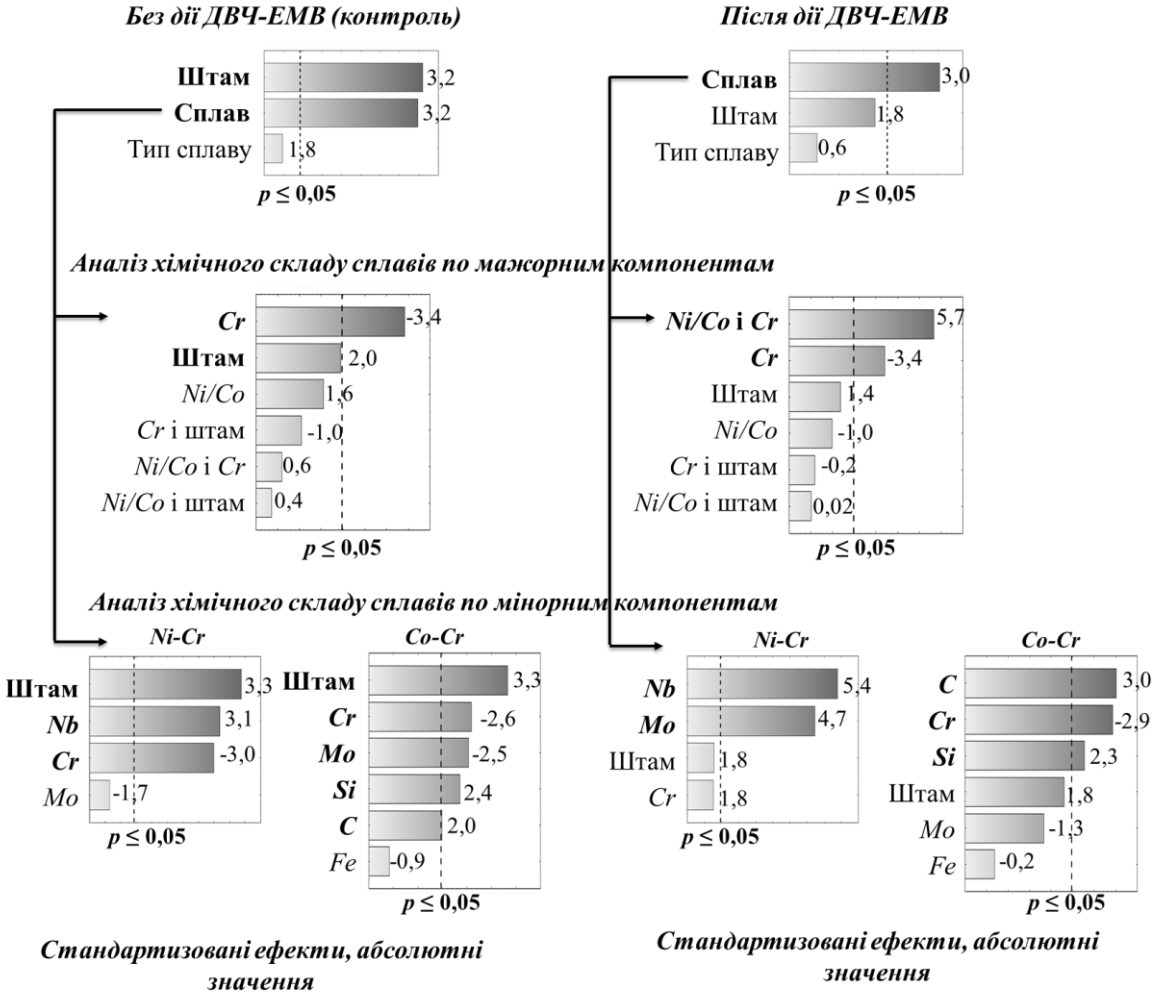


Рис. 6.13. Вплив біотичних і абіотичних чинників на величину адгезії клітин дріжджів до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів. Примітка: наведено стандартизовані ефекти і жирним шрифтом виділено фактори, вплив яких на величину адгезії клітин дріжджів є достовірним при $p \leq 0{,}05$.

цукрового складу у ПКМ, а також білків КС, можуть виступати чинниками специфічної адгезії клітин дріжджів до поверхні сплавів металів (Рис. 6.14).

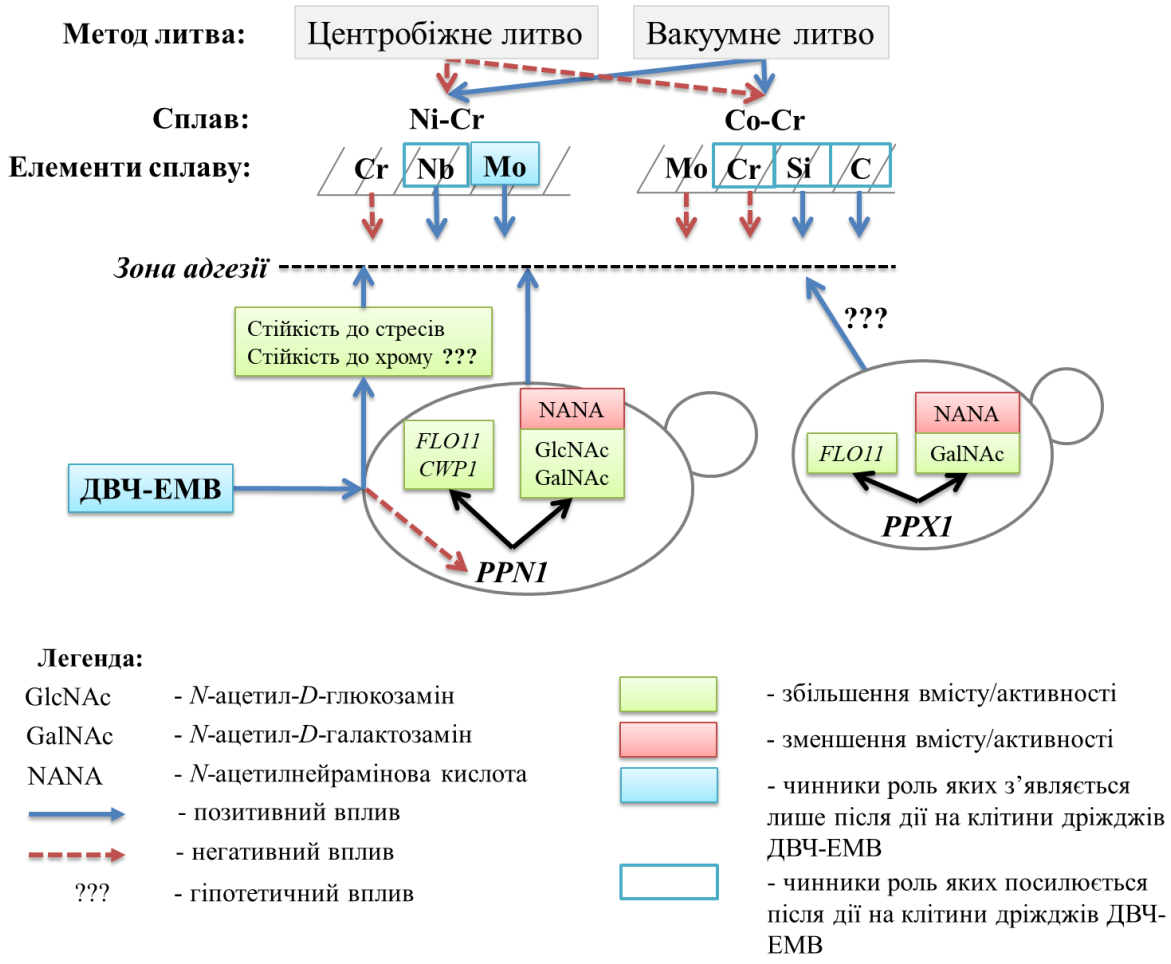


Рис. 6.14. Схема дії ДВЧ-ЕМВ на адгезію клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азою PPN1 до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів.

Отримані результати показали, що адгезія клітин дріжджів до поверхні сплавів металів визначається як біологічними, так і суто фізичними властивостями поверхні металів. Дефектність за полі(Ф)азою PPN1 збільшує адгезивні властивості клітин дріжджів, що співпадає за величиною ефектів із дією на клітини ДВЧ-ЕМВ. Однак, в основі цих ефектів лежать зовсім різні механізми і в першому випадку – це, вочевидь, зміна позаклітинних полісахаридів і білків КС, а в другому випадку – загальне збільшення стійкості опромінених клітин дріжджів до дії окремих компонентів, які входять до складу сплаву. А це, в свою чергу вказує на те, що як полі(Ф)ази, так і дія ДВЧ-ЕМВ можуть виступати факторами адгезії клітин до абіотичних поверхонь.

6.3. Вплив ЕМВ ДВЧ-діапазону на процес міжклітинної взаємодії

6.3.1. Адгезія клітин дріжджів до клітин ссавців

Адгезія – це процес, який залежить від багатьох факторів, серед яких склад середовища, вік клітин, стадія росту і т.п. Встановлено, що клітини, які перебувають в активній стадії розвитку, у логарифмічній фазі, є більш чутливими до впливу факторів зовнішнього середовища, натомість клітини зі стаціонарної фази росту є менш чутливими до дії різних чинників, а тому вважаються більш придатними для вивчення механізмів адгезії [542]. У нашому дослідженні ми використовували клітини дріжджів зі стаціонарної фази росту і для зменшення впливу компонентів середовища клітини дріжджів і ссавців відмивали водою і фосфатно-сольовим буфером із pH 7,2, відповідно [543, 544]. Тим не менш, величина адгезії сильно змінювалася від одного експерименту до іншого (Таблиця 6.2).

Таблиця 6.2.

Величина адгезії клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до клітин ссавців ST і L-929 за результатами п'яти незалежних експериментів.

(Наведено середні значення ± стандартне відхилення для мінімального і максимального виявлених значень адгезії)

S. cerevisiae	**Адгезія клітин дріжджів до клітин ссавців, %**			
штам	**ST**	***Середнє***	**L929**	***Середнє***
Y-517	11,4±3,0 – 81,3±7,8	59,7	36,0±6,4 – 77,5±7,3	62,0
CRY	25,4±5,8 – 54,7±11,4	58,6	36,0±7,9 – 76,5±25,3	61,0
CNX	31,3±5,2 – 84,5±10,0	63,9	7,3±5,0 – 81,1±22,7	69,5

Це вказує на існування низки неврахованих нами факторів фізичної або хімічної природи, які впливають на величину адгезії [545]. Серед таких факторів можуть бути такі показники, як якість моношару клітин ссавців (перш за все його однорідність і рівномірність розподілу по поверхні), яка оцінюється візуально, також наявність на поверхні клітин обох типів специфічних

адгезинів, наявність локальних зарядів на поверхні і величина гідрофобності клітин ссавців (для клітин дріжджів було показано, що ці показники однакові і не залежать від штаму або дефектності за полі(Ф)азами, або ж впливу на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ), тощо [542].

Візуальний аналіз показав, що моношар сформований клітинами ссавців не покриває поверхню підложки рівномірно і що клітини дріжджів прикріплюються до клітин ссавців, головним чином, в областях контактів клітин ссавців один з одним (Рис. 6.15). Лише поодинокі клітини дріжджів були прикріплені до філоподій клітин ссавців або ж до виступаючої над поверхнею зони ядра. Останнє вказує на те, що фактори адгезії, які визначають прикріплення клітин дріжджів, розміщені нерівномірно по поверхні клітин ссавців і, вочевидь, мають певну специфічну локалізацію.

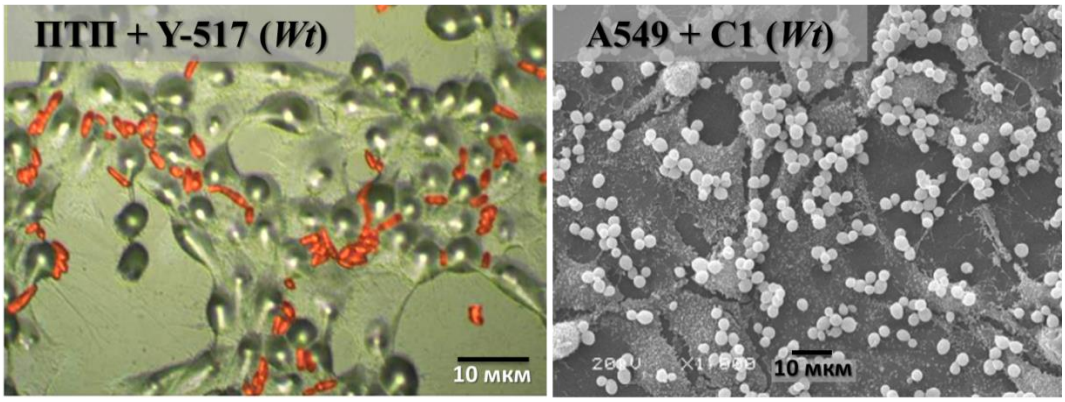


Рис. 6.15. Адгезія клітин дріжджів *S. cerevisiae* штт. УКМ Y-517 (*Wt*) і C1 (*Wt*) до моношару клітин ПТП і A549, відповідно.

Примітка: клітини дріжджів штаму Y-517 овальну форму і виділені помаранчевим кольором для кращої візуалізації (зображення отримане методом світлової мікроскопії). Клітини дріжджів штаму C1 мають округлу форму (зображення отримане методом скануючої електронної мікроскопії).

Проведений візуальний аналіз показав, що стан (якість) моношару клітин ссавців і, можливо відповідна, кількість зон зв’язування на поверхні клітин ссавців можуть бути чинниками значної варіабельності показнику адгезії клітин дріжджів до клітин ссавців.

6.3.2. Вплив блокаторів адгезії на взаємодію клітин дріжджів з клітинами ссавців

В залежності від механізму, який лежить в основі адгезії клітин дріжджів, її можна охарактеризувати як лектиноподібну адгезію, яка є чутливою до іонів Ca^{+2} і може бути заблокована при додаванні різних цукрів, або ж аглютиніноподібна адгезія, яка є чутливою до ЕДТА і може бути заблокована при додаванні іонів заліза [546, 547]. За лектиноподібним типом адгезії взаємодіють білки флокуліни *Flo1p, Flo5p, Flo9p* і *Flo10p* розташовані на поверхні КС клітин дріжджів [546]. Іони металів Ca^{2+} і Mn^{2+} знаходяться в безпосередній близькості від вуглеводних ділянок зв'язування, що може допомогти у формуванні активної стабільної конформації, яку називають «замкнутою» і яка має набагато більшу спорідненість до сахаридів [548, 549]. Агглютиніноподібна взаємодія відбувається при статевому процесі і забезпечує злиття клітин. За цим механізмом працює, наприклад, білок *Fus1p* [546, 550, 551]. Білки *Flo11p* і *Asp1p* мають у свої структурі домен подібний до фібронектину III-го типу (FN3-подібний домен), який формує велике сімейство в рамках суперсімейства іммуноглобулінів, які включають різні білки-адгезини, гормони, розташовані на поверхні клітин, а також цитокінові рецептори і білки шаперони [547].

Використання потенційних блокаторів адгезії показало, що ефект їх дії суттєвим чином залежить від типу культури клітин ссавців, а також відрізняється для клітин різних штамів. Усі використані сполуки мали здатність зменшувати величину адгезії клітин дріжджів до клітин тестикули свиней (ST) (Рис. 6.16). Ці ж сполуки виявилися досить ефективними для блокування адгезії клітин штамів CRY і CNX до моношару клітин фібробластів (L-929), однак не викликали пригнічення адгезії *Wt*-клітин штаму (Y-517), а навпаки посилювали її (тобто виступали медіаторами адгезії) і найбільше стимулювання адгезії до 30% було відмічене за додавання галактози ($p < 0{,}001$). Жодна зі сполук не мала

здатності повністю блокувати адгезію і щонайменше 15%-20% клітин дріжджів залишилися прикріпленими до поверхні клітин ST і L929.

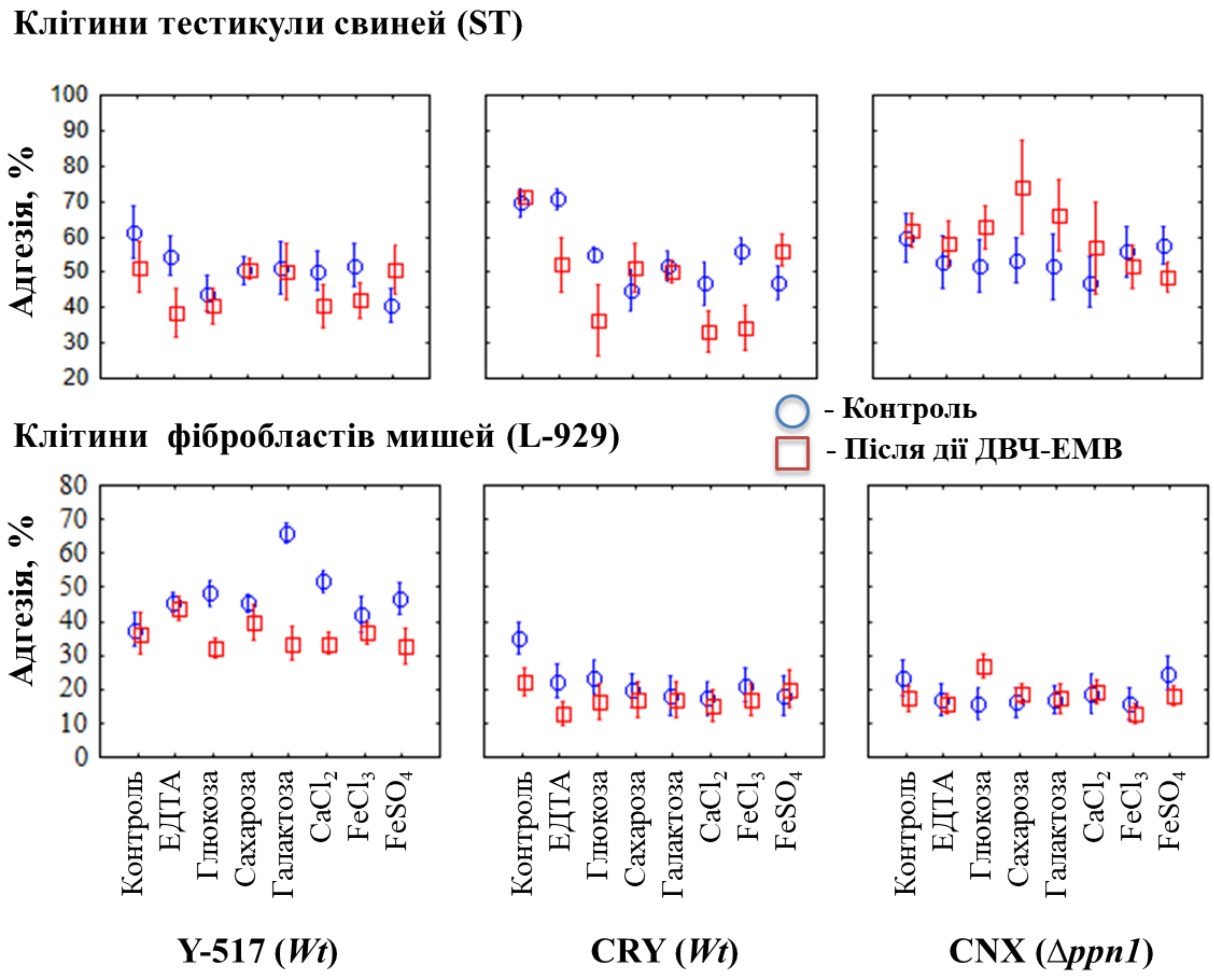


Рис. 6.16. Адгезія (%) клітин дріжджів штамів Y-517 (*Wt*), CRY (*Wt*) і CNX (Δ*ppn1*) до моношару клітин тестикули поросят (ST) і фібробластів мишей (L-929). Представлено середні значення і похибка середнього визначені за результатом дисперсійного аналізу (ANOVA) даних отриманих з трьох незалежних серій експериментів ($N \geq 11$).

Серед досліджених сполук ЕДТА був найменш ефективним блокатором адгезії: хоча він і виказував загальну тенденцію до зниження показнику адгезії, однак, достовірний ефект був відмічений лише щодо пригнічення адгезії *Wt*-клітин штаму CRY до клітин L-929 ($p \leq 0{,}045$). В той час як цукри, солі кальцію і заліза мали різну ефективність залежно від штаму і культури клітин. Солі Fe^{2+} були ефективними для блокування адгезії *Wt*-клітин обох штамів але не

пригнічували адгезію Δ*ppn1*-клітин. Для Δ*ppn1*-клітин найбільш ефективним блокатором адгезії виявився хлорид кальцію, який так само ефективно пригнічував адгезію й клітин батьківського штаму CRY але вплив якого не мав достовірної дії на *Wt*-клітини іншого штаму Y-517.

Загалом отримані профілі адгезії вказують на те, що для клітин дріжджів характерними є лектиноподібний і іммуноголобуліноподібний типи адгезії опосередковані взаємодією через цукрові залишки і іони металів (Рис. 6.17). Дефектність за полі(Ф)азою має вплив на синтез залізо-чутливих і вуглеводне-чутливих медіаторів адгезії, адже за відсутності PPN1 солі заліза і цукри втрачають, або ж суттєво знижують свою ефективність. Проте, очевидні відмінності в ефективності вивчених сполук і здатність сполук виступати медіаторами адгезії, вказують на те, що клітини різних штамів дріжджів залучають різні механізми адгезії.

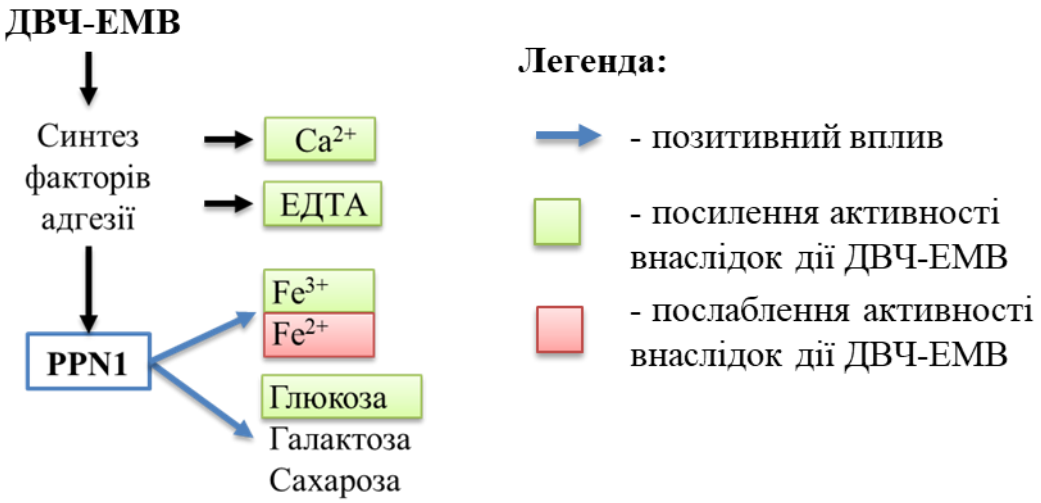


Рис. 6.17. Участь полі(Ф)ази PPN1 у процесах адгезії клітин дріжджів до моношару культури клітин тестикули свиней (ST) і фібробластів мишей (L-929) за результатами інгібіторного аналізу.

Дія ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 30 Вт, протягом 30 хв.) посилювала інгібуючу ефективність ЕДТА і глюкози, ефекти дії яких набували статистичної значущості ($p \leq 0{,}05$), а також посилювала дію хлориду кальцію і заліза (II) щодо адгезії *Wt*-клітин (Рис. 6.16). Також цей фактор пригнічував стимулюючу

активність сполук щодо *Wt*-клітин штаму Y-517 і зменшував інгібуючу активність цукрів щодо адгезії Δ*ppn1*-клітин.

В цілому ж, посилення ефективності одних блокаторів адгезії і зниження ефективності інших, після дії на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ, вказує на структурні зміни клітинної поверхі, принаймні на рівні синтезу і доступності відповідних факторів адгезії. Ефект дії випромінювання також залежав від дефектності клітин за полі(Ф)азою PPN1, яка виказала свою залученість до синтезу специфічних факторів адгезії, а тому за її відсутності за дії ДВЧ-ЕМВ була відмічена зміна ролі цукрів з блокуючої на стимулюючу.

6.3.3. Синтез білків de novo клітинами дріжджів при їх взаємодії з клітинами фібробластів

Реалізація кожного з механізмів адгезії залежить як від властивостей поверхні клітин дріжджів, так і від наявності специфічних факторів адгезії на поверхні клітин ссавців. Щоб встановити, чи потрібно дріжджовим клітинам синтезувати фактори адгезії *de novo*, ми заблокували процеси транскрипції в клітинах дріжджів за допомогою актиноміцину D (AMD). Додатково клітини ссавців попередньо фіксували у розчині глутарового альдегіду, який дозволяє зупинити більшість внутрішньоклітинних процесів. Це дозволило нам встановити роль, яку відіграють клітини ссавців в процесі взаємодії із клітинами дріжджів: активні учасники процесу, які регулюють цей процес, чи пасивна біологічна підложка для клітин дріжджів. Ми провели два варіанти обробки дріжджових клітин AMD: (*i*) після опромінювання ДВЧ-ЕМВ, безпосередньо перед взаємодією з клітинами ссавців і (*ii*) до опромінювання ДВЧ-ЕМВ, за годину до взаємодії з клітинами ссавців. В останньому варіанті клітини дріжджів мали час для відновлення процесів транскрипції, що слугувало додатковим контролем.

Ефект дії актиноміцину Д на показник адгезії клітин дріжджів мав достовірний прояв лише в разі обробки клітин дріжджів AMD безпосередньо перед їх взаємодією з клітинами фібробластів L-929 і лише для *Wt*-клітин

штаму Y-517, для яких відмічене збільшення показнику адгезії на 25% ($p < 0{,}004$) (Рис. 6.18). Для клітин інших двох штамів (CRY і CNX) видно тенденцію до збільшення величини середнього значення, однак різниця була недостовірною. Відмічений ефект дії AMD вочевидь лише частково пов'язаний із блокуванням синтезу мананспецифічних білків, адже додавання манози не в повній мірі нівелювало відмічений ефект, хоча, в цілому, знижувало показник адгезії клітин цього штаму щонайменше на 20%. Подібних закономірностей не виявлено для *Wt*-клітин іншого штаму CRY, показник адгезії яких не змінювався в наслідок дії AMD і не пригнічувався у присутності манози. Це вказує на те, що *Wt*-клітин різних штамів дріжджів використовують різні механізми адгезії.

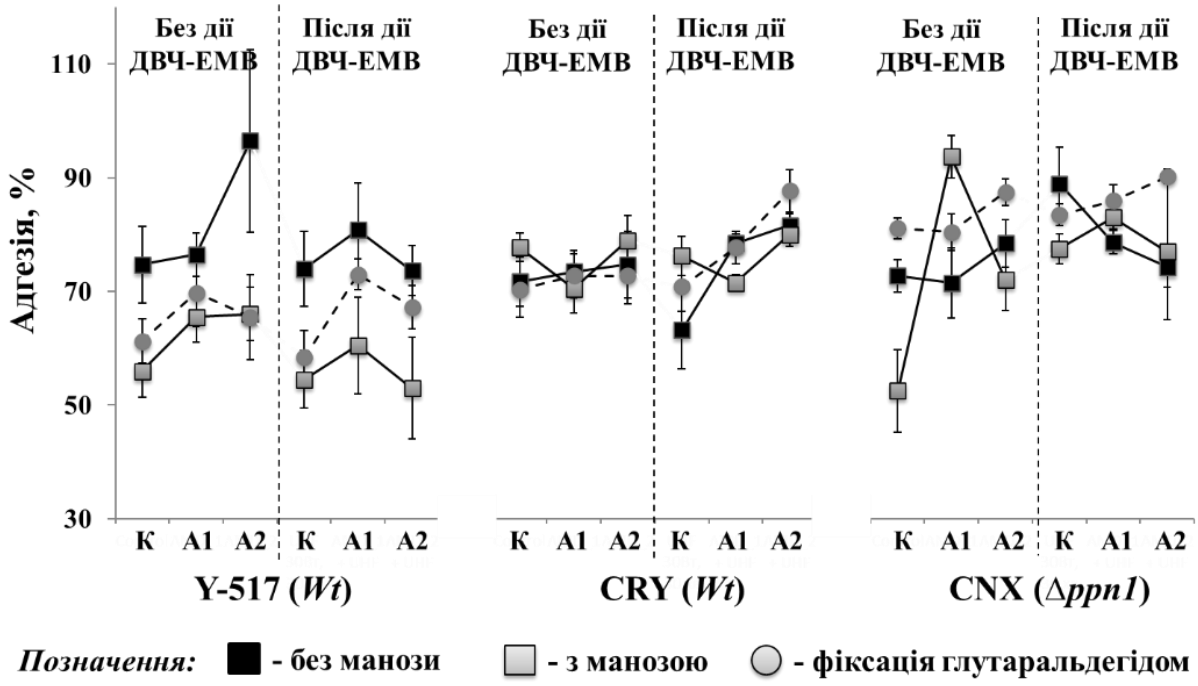


Рис. 6.18. Вплив актиноміцину Д на адгезію клітин дріжджів до клітин фібробластів L-929.

Примітки: «К» - контроль, «А1 і А2» - клітини дріжджів обробляли актиноміцином Д, відповідно, до і одразу ж після опромінювання ДВЧ-ЕМВ (30 Вт, 30 хв.). Представлено середні значення і стандартне відхилення ($N \geq 5$).

Дефектність за полі(Ф)азою PPN1 не мала ефекту на показник адгезії за оптимальних умов і суттєво пригнічувалася додаванням манози (20% при $p \leq 0{,}008$), що вказує на значну роль лектиноподібного механізму адгезії для Δ*ppn1*-клітин. Одночасно з цим маноза слугувала медіатором адгезії для Δ*ppn1*-клітин, які обробили AMD за годину до їх взаємодії з клітинами ссавців: адгезія цих клітин зростала більш як на 20% ($p \leq 0{,}006$), що, як і у випадку *Wt*-клітин штаму Y-517, вказує на зміну поверхневих властивостей цих клітин за рахунок, можливо, появи на поверхні клітин чисельних вільних манан-специфічних зв'язків, для яких зовнішнє додавання манози виступає медіатором адгезії і адгезія клітин дріжджів суттєво зростає.

Дія ДВЧ-ЕМВ нівелювала ефекти дії актиноміцину D на *Wt*-клітини штаму Y-517 і на 10%-15% ($p \leq 0{,}035$) пригнічувала показник адгезії опромінених Δ*ppn1*-клітин. Ефекти дії манози на опромінені клітини в цілому не змінювалися. Тобто дія ДВЧ-ЕМВ змінює стан клітинної поверхні і знижує роль синтезу білків *de novo*, що деякою мірою походить на ефекти ДВЧ-ЕМВ відмічені при взаємодії клітин дріжджів із небіологічними поверхнями (нікель-хромовими і кобальто-хромовими сплавами) де було відмічене зменшення ролі біологічних чинників адгезії і посилення ролі небіологічних чинників (*що розглянуто у попередньому розділі*).

Отриманий результат показав, що дріжджові клітини активно синтезують *de novo* білки, які корегують адгезію клітин дріжджів і, що полі(Ф)аза PPN1, є необхідною для блокування манан-специфічних факторів зв'язування. Тобто обидва процеси (транскрипції і розщеплення полі(Ф)), за нормальних умов спрямовані на зменшення величини адгезії клітин дріжджів до клітин фібробластів. Фіксація фібробластів за допомогою глутарового альдегіду достовірно знижувала величину адгезії лише *Wt*-клітин штаму Y-517 ($p \leq 0{,}04$) і не мала достовірного впливу на ефективність адгезії клітин дріжджів інших штамів. В цілому ефект фіксації фібробластів повторював ефекти дії актиноміцину, стимулюючи адгезивні властивості клітин дріжджів, і частково ефект дії манози, знижуючи загальний показник адгезії клітин штаму Y-517,

однак збільшуючи його для Δ*ppn1*-клітин штаму CNX. Ця процедура була неефективною для *Wt*-клітин штаму CRY, адгезія яких не мала залежності із синтезом білків *de novo* і мала слабку залежність від присутності манози. Це вказує на те, що фібробласти, вочевидь, активно реагують на присутність клітин дріжджів і змінюють властивості своєї поверхні, що й відображається на величині адгезії, яка може як збільшуватися (у випадку клітин штаму Y-517), так і зменшуватися (у випадку клітин штаму CNX).

6.3.4. Структурні зміни в клітинах ссавців викликані взаємодією з клітинами дріжджів

Аналіз цитоморфологічних особливостей клітин дріжджів і клітин ссавців при їх взаємодії показав, що в клітинах ссавців відбуваються значні цитоморфологічні зміни, які стосуються будови цитоскелету, стану цитоплазми і ядерного апарату [552]. В присутності *Wt*-клітин штаму Y-517 на поверхні клітин L-929 виявлено поглиблення або ж пори діаметром до 2,0 мкм (Рис. 6.19Г і Д). Ці новоутворення не мали певної локалізації і були виявлені не на всіх клітинах. Природа цих новоутворень дискусійна і вимагає окремого дослідження. В присутності клітин інших двох штамів (CRY і CNX) відбувалося сплощення клітин фібробластів, в результаті чого ядро клітин фібробластів виділялося над рештою маси клітин і в ядрах добре видно ядерця (частіше по 2-3 ядерця на ядро) (Рис. 6.19Е-І). Тяжі цитоскелету в таких клітин не покривають всю поверхню клітини, включаючи ядро, як це видно в контролі (Рис. 6.19А-В), а лише ту її частину, яка асоційована з цитоплазмою.

Ще більші зміни в топографії клітин L-929 відбувалися при їх взаємодії з опроміненими клітинами дріжджів. Так при взаємодії з опроміненими клітинами дріжджів штаму Y-517, новоутворення пор не відбувалося, але відзначені множинні сферичні новоутворення з діаметром до 3,0 мкм, що виступали над поверхнею фібробластів (Рис. 6.19Л). Як і в разі пор, природа цих новоутворень не відома. Клітинний матеріал зазнавав ще більшого сплощення у присутності опромінених клітин штаму CRY (Рис. 6.19М і Н):

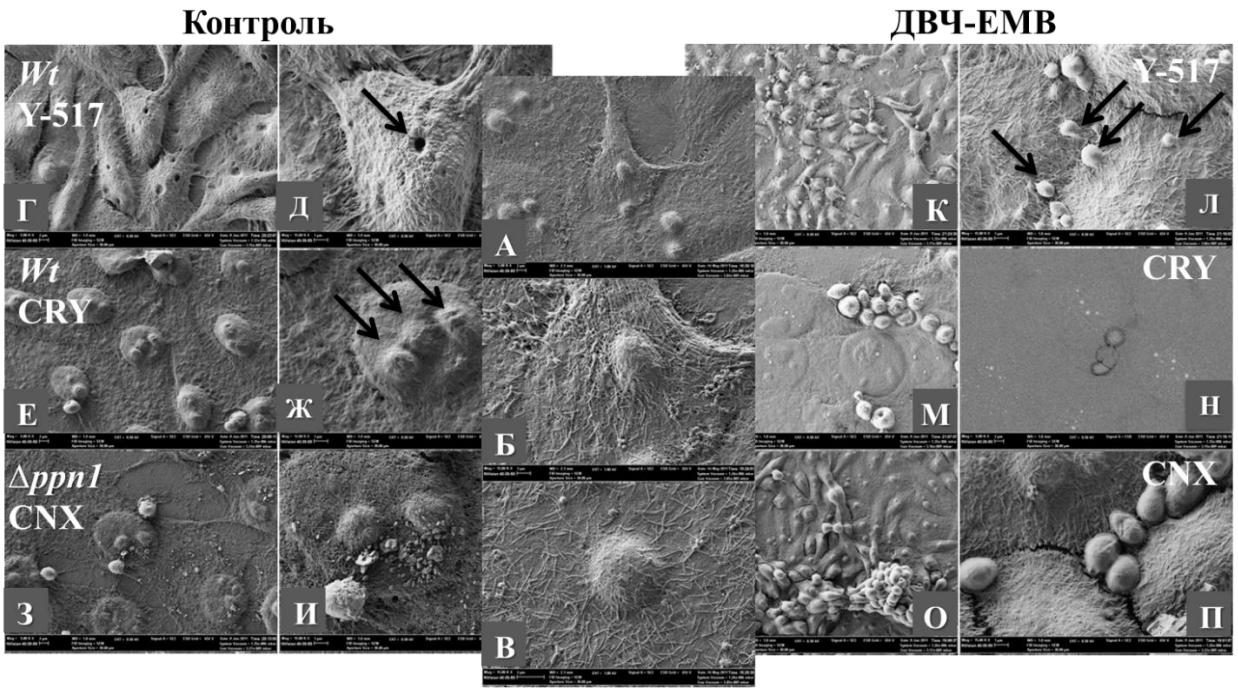


Рис. 6.19. Зміни топографії клітин L-929 у присутності клітин *S. cerevisiae* штт. Y-517, CRY і CNX неопромінених (контроль) та опромінених ДВЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 15 Вт, 30 хв.). (А-В) - клітини L929 без взаємодії з клітинами дріжджів, (Г-И) - клітини L929 в присутності клітин дріжджів, які не були опромінені, (К-П) - клітини L929 в присутності клітин дріжджів, попередньо опромінених. Стрілками вказані пори (на вставці Д) і сферичні новоутворення (на вставці Л) на поверхні L-929, які виникають у присутності клітин дріжджів штаму Y-517. Скануюча електронна мікроскопія.

ядро, і ядерця більш не підносилися над іншими частинами клітини, хоча все ще візуалізуються; нитки цитоскелету не помітні. Клітини ж штаму CNX, навпаки, викликали ущільнення клітин фібробластів, як це було видно для клітин Y-517 (Рис. 6.19О, П).

Аналіз клітин іншого типу (А549 – епітеліальні клітини альвеолярної аденокарциноми людини) показав, що в присутності клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами на поверхні клітин А549 формуються чисельні сферичної форми новоутворення, які щільно вкривають всю поверхню клітин (Рис. 6.20О, С, Ф) і можуть бути видозміненими мікроворсинками, які в нормі щільно вкривають поверхню клітин цього типу (Рис. 6.20Г, Е, З). Водночас, при

взаємодії з *Wt*-клітинами, відмічена зміна форми і загальне зменшення числа мікроворсинок на одиницю поверхні клітин А549 (Рис. 6.20Л).

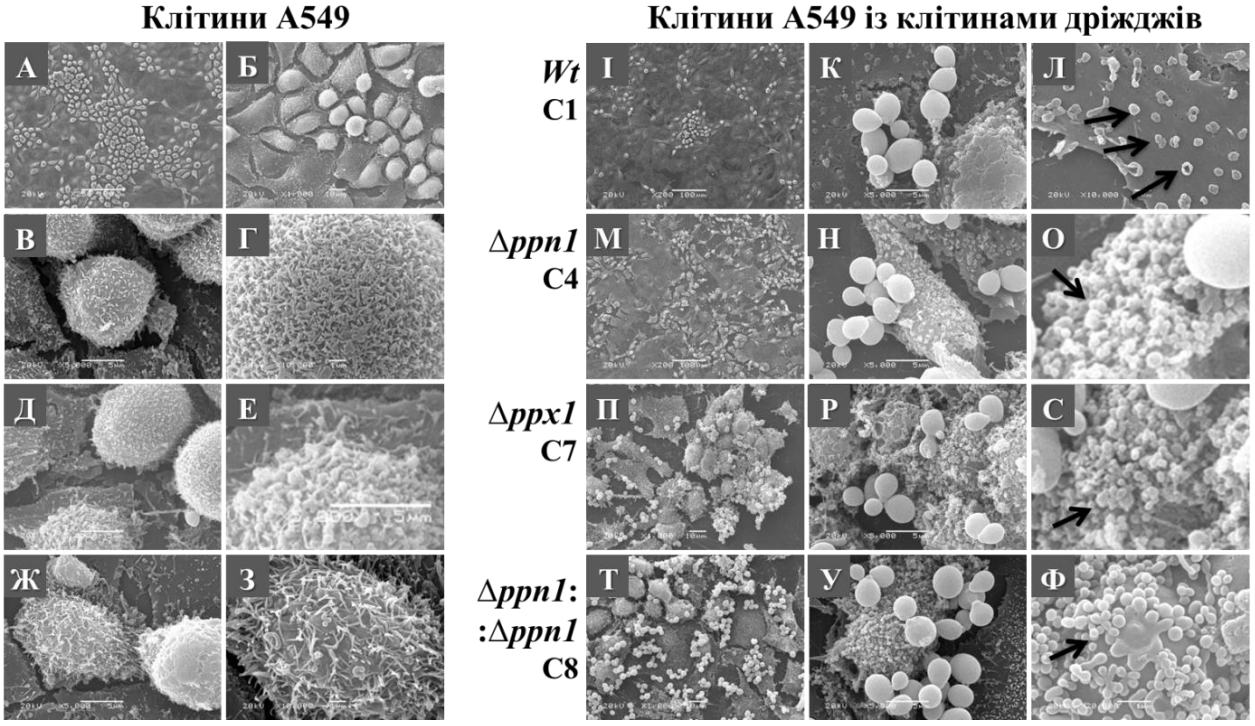


Рис. 6.20. Зміни топографії клітин А549 (клітини аденокарциноми) у присутності клітин дріжджів *S. cerevisiae* штт. С1, С4, С7 і С8 дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1. Стрілками показані цитоморфологічні зміни на поверхні клітин А549. Скануюча електронна мікроскопія.

Дослідження препаратів забарвлених флуорохромним барвником ДАФІ було відзначено, що неопромінені *Wt*-клітини штамів Y-517 і CRY не виявляють помітного впливу на загальну морфологію, внутрішньоклітинний вміст і ядерний матеріал клітин ST (Рис. 6.21). Цитоплазма забарвлена рівномірно з поодинокими щільними дрібними гранулами. Ядра, в основному, овальної форми без ознак конденсації хроматину. Клітини дефектні за полі(Ф)азою PPN1 (штам CNX) викликали вакуолізацію цитоплазми клітин ST з формуванням або декількох великих вакуолей, або безлічі дрібних.

Опромінені *Wt*-клітини штаму Y-517 викликали лише незначну вакуолізацію периферичної зони цитоплазми (Рис. 6.21), в той час як опромінені *Wt*-клітини штаму CRY призводили до масового прояву цього

ефекту, при цьому відзначена конденсація ядерного матеріалу і відповідне зменшення розміру ядер. Опромінені Δ*ppn1*-клітини штаму CNX змінювали форму клітин і ядер: розміри клітин зменшувалися, ймовірно, через відкріплення від матеріалу підкладки, а ядра, в багатьох клітинах, набували неправильної форми із ознаками конденсації хроматину, хоча й не в усіх ядрах.

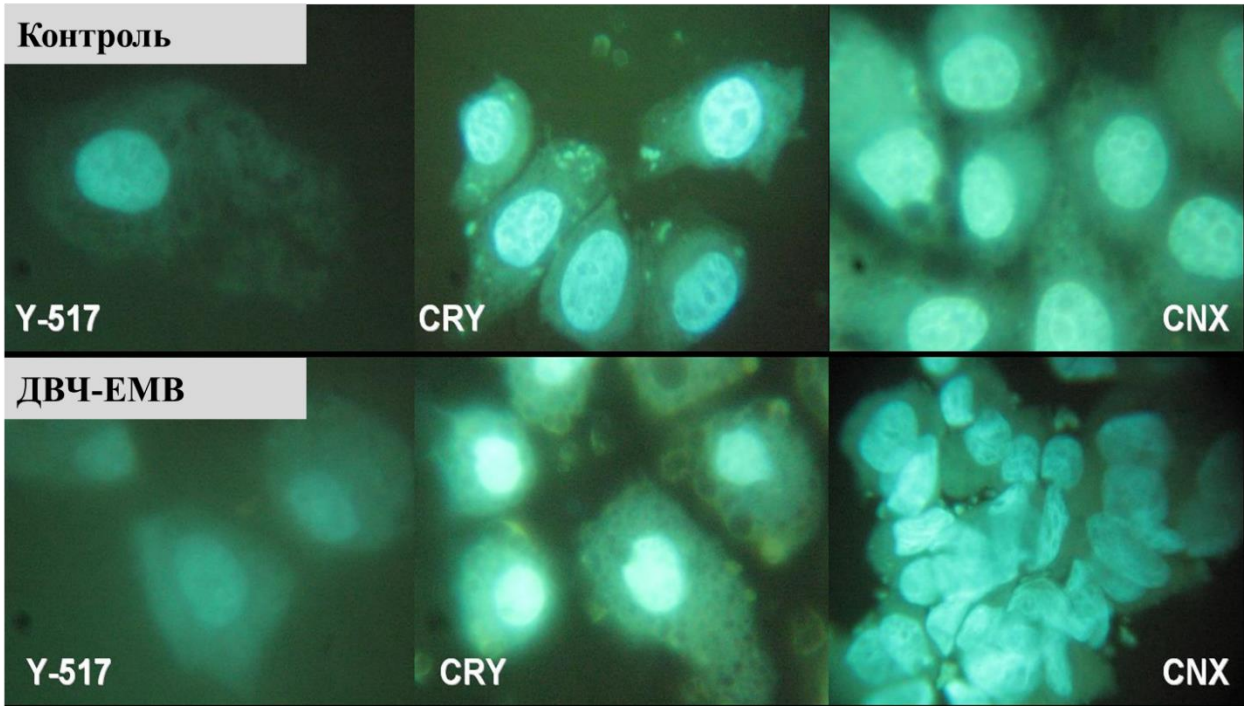


Рис. 6.21. Цитоморфологічні зміни клітин тестикули свиней (ST) в присутності клітин *S. cerevisiae* штт. Y-517, CRY і CNX неопромінених (Контроль) та опромінених (ЕМВ 40,68 МГц) електромагнітним випромінюванням радіочастотного діапазону частотою 40,68 МГц (15 Вт, 30 хв). Люмінесцентна мікроскопія клітин ST, забарвлених ДАФІ (4’,6’-диамідин-2’-феніліндол).

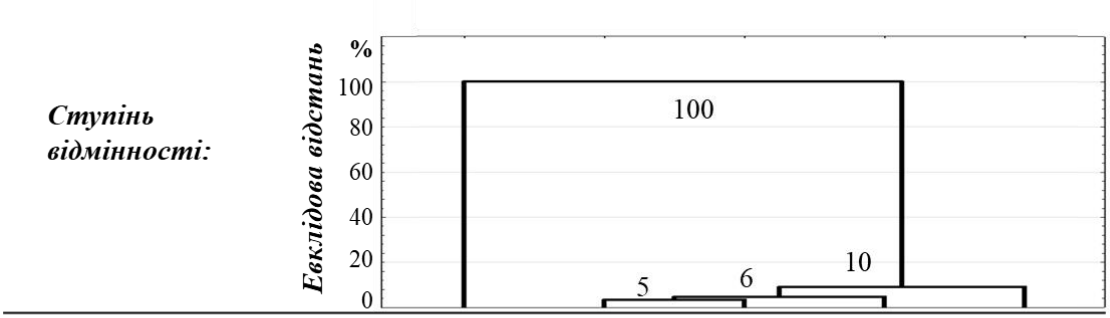
Відмічена вакуолізація цитоплазми при взаємодії клітин ПТП з дріжджами дефектними за полі(Ф)азою PPN1, може свідчити про ініціювання апоптотичних процесів в клітинах ссавців, в той час як зміни ядерного апарату, можуть вказувати на ініціацію некротичних процесів [553].

При вивченні реакції епітеліоподібних клітин MDBK (клітини нирок бика), які фарбували флуорохромним барвником акридиновим оранжевим, було відзначено, що популяція клітин MDBK представлена чотирма основними

морфотипами, які відрізняються розмірами, ступенем візуалізації внутрішньоклітинних структур (ядро, вакуолі, тощо), а також інтенсивністю накопичення флуорохромного барвника. Показник середнього значення розміру клітин MDBK не змінювався при взаємодії клітин із клітинами дріжджів, проте оптичні показники RGB, які є унікальними для кожного з морфотипів і окрім іншого вказують на цитоморфологічні зміни (Додаток 18), достовірно зростали і досягали максимуму при взаємодії клітин ссавців із клітинами дріжджів дефектними за полі(Ф)азою PPX1 (Рис. 6.22): клітини дріжджів викликали збільшення в клітинах MDBK величини співвідношення Red/Green і зменшення інших співвідношень у 1,5-2 рази. Це вказує на утворення фракції ущільнених клітин із підвищеним вмістом барвника, що притаманно некротичним клітинам. З цього виходить, що клітини всіх досліджених штамів дріжджів, при взаємодії із епітеліоподібними клітинами MDBK, запускають в клітинах ссавців процеси некрозу і цей ефект посилюється дефектністю клітин дріжджів за полі(Ф)азою PPX1.

Посилення флуоресценції клітин в червоній області і одночасне зменшення її в зеленій області можуть вказувати одночасно на посилення процесів синтезу РНК, так і на ініціацію процесів деградації ДНК. Зважаючи на виявлені свідчення щодо можливої індукції некротичних процесів в клітинах MDBK, виявлений ефект може бути свідченням посилення ферментативної активності, пов’язаної із порушенням цілісності структури епітеліоподібних клітин в присутності клітин дріжджів і бути обумовленим цитотоксичним і/або генотоксичним характером дії чинника (в даному випадку – це клітини дріжджів). Однак, клітини дріжджів так само мають змінений колір від зеленого до помаранчевого, що також може бути свідченням цитотоксичної, або ж генотоксичної дії на них з боку клітин MDBK.

Аналіз генотоксичного потенціалу клітин дріжджів і клітин MDBK вивчали методом комета-тесту в його лужному варіанті, який дозволяє одночасно виявляти одно- і дволанцюгові розриви ДНК. Було виявлено, що



Оцінювані показники	Без дріжджів	Штам дріжджів			
		Δppn1: :*Δppx1*	*Δppx1*	*Δppn1*	*Wt*
Red/Green	0,26±0,0	0,31±0,0	0,35±0,0	0,33±0,0	0,32±0,0
Red/Blue	3,5±0,6	2,3±0,6	2,6±0,4	2,3±0,3	2,5±0,4
Green/Blue	13,4±1,4	7,5±1,3	7,4±0,9	7,1±0,7	8,0±0,8
Розмір клітин MDBK, мкм^2	63,2±10,0	63,3±13,4	65,4±8,9	70,1±7,5	65,5±8,3

Клітини MDBK при взаємодії з клітинами дріжджів:

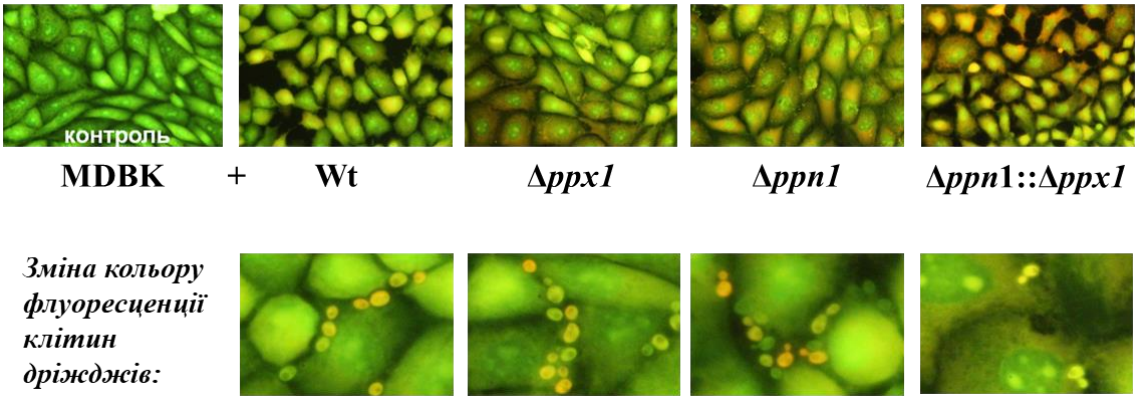


Рис. 6.22. Зміна оптичних показників Red/Green, Red/Blue, Green/Blue в епітеліоподібних клітинах MDBK в присутності клітин дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1.

Примітки: Клітини MDBK профарбовані акридиновим помаранчевим. «Контроль» - клітини MDBK без дріжджів.

клітини досліджених штамів дріжджів, незалежно від дефектності за полі(Ф)зами, викликають порушення цілісності структури ДНК в клітинах MDBK, що видно за утворенням «комет» при лужному гель-електрофорезі таких клітин (Рис. 6.23). При цьому, ми не виявили яких-небудь змін у структурі і стабільності ДНК клітин дріжджів. Тобто ефект мав односторонній характер: лише клітини дріжджів мали генотоксичну дію на клітини ссавців. А значить

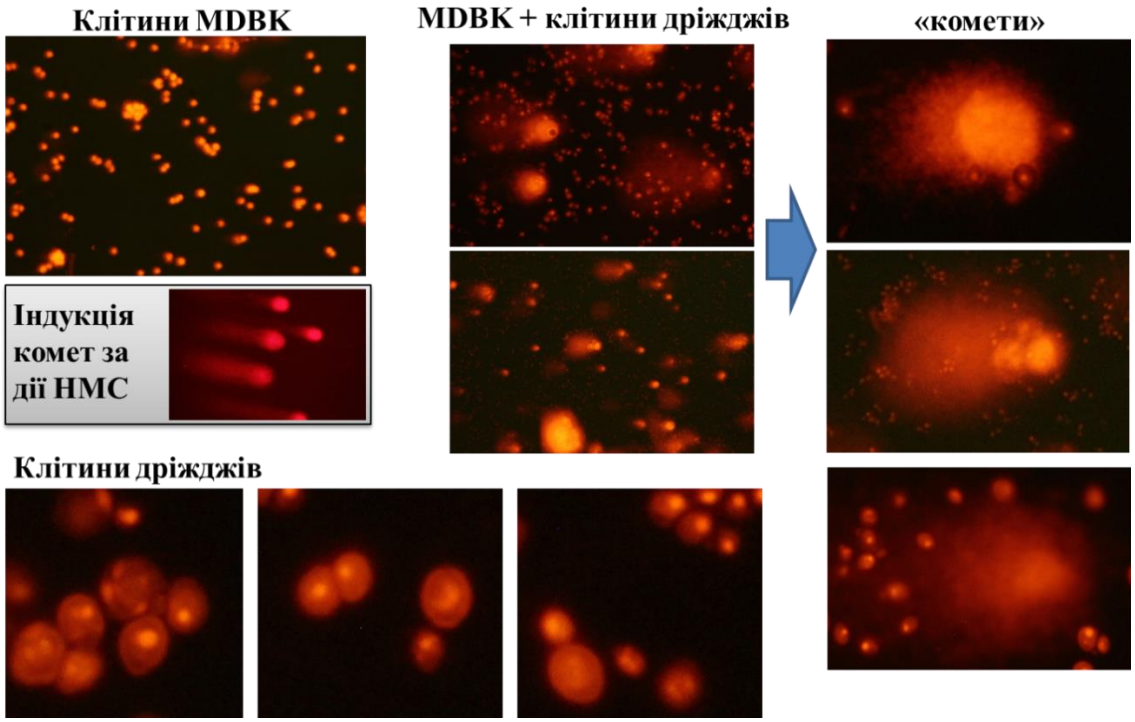


Рис. 6.23. Ініціація одно- і дволанцюгових розривів ДНК («комети») в культурі епітеліоподібних клітин нирки бика (MDBK) при їх взаємодії з клітинам дріжджів.

Примітка: «НМС» – нітрозометилсечовина.

зміна флуоресценції клітин дріжджів в червону зону при їх взаємодії з клітинами ссавців є свідченням посилення експресії, адже, як відомо, РНК фарбується в червоний колір при взаємодії з акридиновим оранжевим.

6.3.5. Експресія стрес-індукованих генів в клітинах дріжджів при їх взаємодії з клітинами ссавців

Аналіз активності (рівнів експресії) стрес-індукуємих генів при взаємодії клітин дріжджів з епітеліоподібними клітинами MDBK показав, що в *Wt*-клітинах відбувається активація генів *GSY2*, *HSP12* і *CWP1*, які вказують на геномний стрес, гіперосмотичний стрес і стрес КС, відповідно (Рис. 6.24). Експресія генів полі(Ф)аз *PPN1* і *PPX1* в *Wt*-клітинах при їх взаємодії з клітинами MDBK цілому не має достовірних змін, що могло б вказувати на відсутність прямої регуляторної ролі цих генів при взаємодії клітин дріжджів з

клітинами ссавців. Однак дефектність за цими генами викликає зміну профілів експресії низки стрес-індукуємих генів, що вказує на пряму залежність між активністю ферментів полі(Ф)аз і здатністю клітин дріжджів формувати відповідь на стрес. Профіль експресії стрес-індукуємих генів в Δ*ppx1*-клітин були найменш відмінними від *Wt*-клітин (75%), в той час як дефектність за PPN1, спричиняла найбільші зміни, які стосувалися також і клітин подвійного мутанта. В клітинах

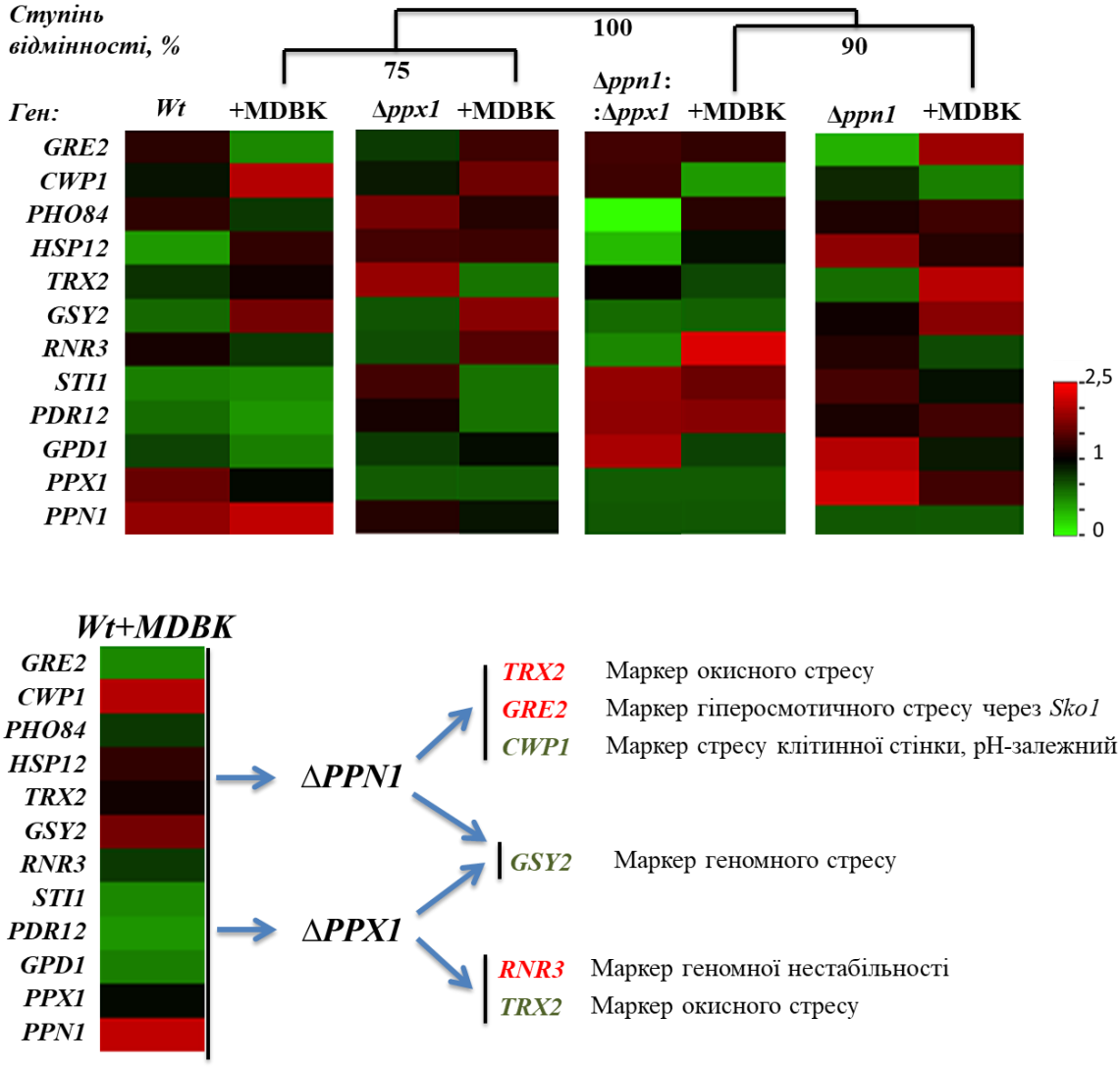


Рис. 6.24. Зміна показників експресії стрес-індукуємих генів в дріжджів після взаємодії з епітеліоподібними клітинами нирки бика (MDBK). *Примітка*: рівні експресії генів вказані відносно рівнів експресії *housekeeping*-генів, прийнятих за 1 (одиницю).

дріжджів дефектних за однією з полі(Ф)аза збільшено активність гену маркеру геномного стресу *GSY2* в присутності клітин MDBK. Однак активність цього гену знижена в клітинах з подвійною мутацією. Окрім того в Δ*ppx1*-клітинах збільшено активність *RNR3*, гену-маркеру геномної нестабільності. А в Δ*ppn1*-клітинах додатково відбувається активація генів маркерів оксидативного і гіперосмотичного стресу (*TRX2* і *GRE2*, відповідно).

Тобто взаємодія клітин дріжджів з клітинами MDBK є чинником геномного стресу в клітинах дріжджів. В той час як дефектність за полі(Ф)азами додатково викликає явище геномної нестабільності і стимулює оксидативний і гіперосмотичний стреси. Зважаючи на те, що індукція цих генів не пов'язана із порушенням цілісності ДНК клітин дріжджів (за даними «комета»-тесту), причинами є інші невстановлені фактори, наприклад порушення реплікативних функцій геному, транскрипційних, утворення активних форм кисню, порушення цілісності ЦПМ і КС, тощо. А тому, зміна флуоресценції клітин дріжджів окрашених акридиновим оранжевим в зону червоного кольору не є свідченням деградації ДНК, а вказує на посилення синтезу РНК і посилення метаболізму в цілому.

Узагальнення розділу

Взаємодія клітин дріжджів з клітинами ссавців є фактором стресу для обох сторін: в клітинах ссавців відбувається низка цитоморфологічних змін і порушується стабільність генетичного апарату що призводить до деградації ДНК. В той же час в клітинах дріжджів запускаються механізми протидії геномному стресу, а також механізми відновлення цілісності КС і протидії гіпертонічному стресу. Стрес КС може бути чинником, який визначає синтез відповідних компонентів КС включно з факторами адгезії (Рис. 6.25). В свою чергу в клітинах ссавців відбуваються зміни, які впливають на величину адгезії клітин дріжджів, однак ці зміни пов'язані з порушенням цілісності клітин ссавців в присутності клітин дріжджів.

Дріжджові клітини активно синтезують білки *de novo*, які корегують адгезію клітин дріжджів до клітин ссавців загалом знижуючи адгезію. Так само

й полі(Ф)аза PPN1 необхідна для блокування манан-специфічних факторів зв'язування. А це означає, що обидва процеси (транскрипції і метаболізму

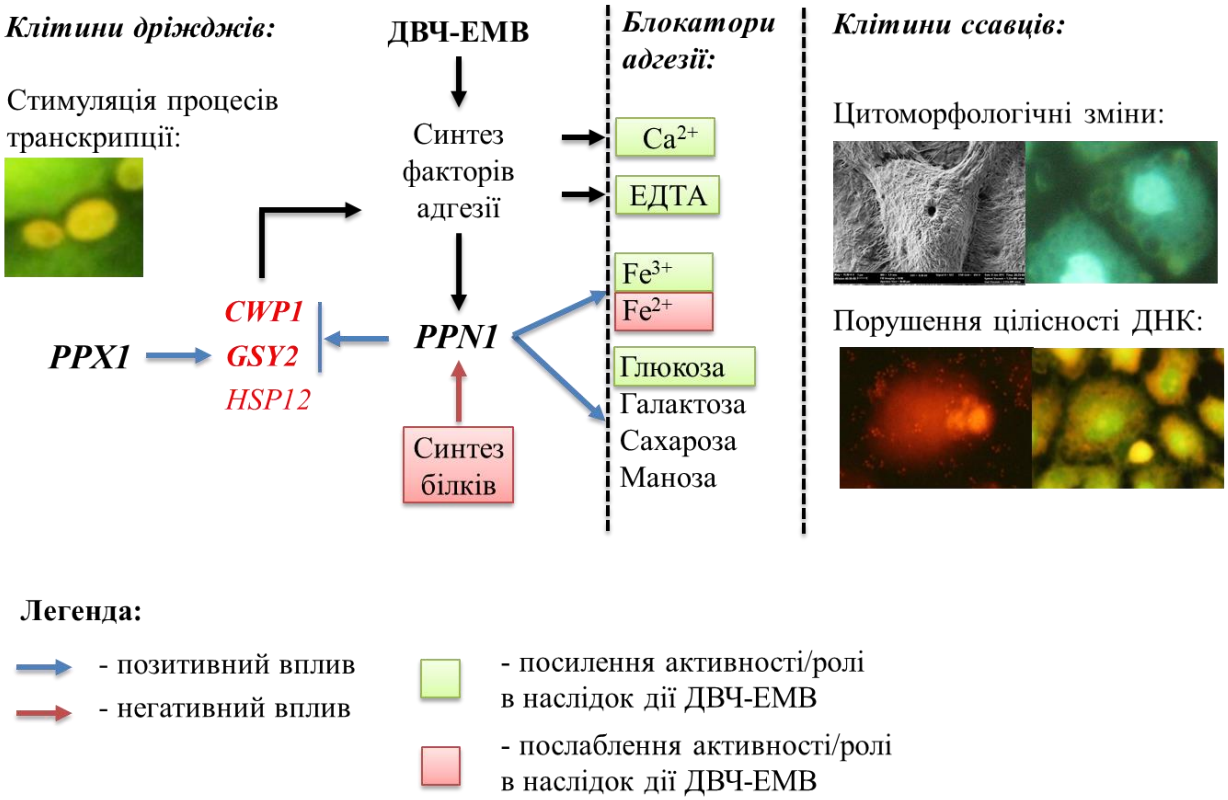


Рис. 6.25. Схема формування факторів адгезії у відповідь на взаємодію клітин дріжджів з клітинами ссавців за дії ДВЧ-ЕМВ.

полі(Ф)) спрямовані на зменшення величини адгезії клітин дріжджів до клітин фібробластів. Зважаючи на те, що взаємодія цих біологічних об'єктів має негативні наслідки для обох сторін, то така роль синтезу білків *de novo* і фосфорного метаболізму вбачається еволюційно доцільною для збільшення життєздатності клітин обох видів. В свою чергу дія радіочастотного електромагнітного випромінювання ДВЧ-діапазону, яке збільшує стійкість клітин дріжджів до дії факторів стресу, може вважатися непрямим регулятором адгезії, адже цей тип випромінювання не має особливого впливу на показник адгезії клітин дріжджів.

Основні положення розділу опубліковано у наукових працях [430, 432, 522, 528, 531, 534-537, 542, 543, 551]

РОЗДІЛ 7.
ОБГОВОРЕННЯ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Клітини мікроорганізмів пристосовані до існування у нестабільному оточуючому середовищі, в якому постійно відбуваються зміни різних фізико-хімічних показників. Основним бар'єром між зовнішнім оточенням і внутрішньоклітинним простором виступають КС, ПКМ і ЦПМ, на які покладено функції фільтрації (тобто диференційованого потрапляння сполук до клітини), забезпечення механічної стійкості до деформацій і створення захисту до осмотичних пертурбацій. Однак, в останні роки з'являються відомості щодо більш широкої ролі цих структур і їх долученість до формування стійкості клітин до значно ширшого кола стресових чинників.

Проведені нами дослідження показали, що кількісний вміст окремих структурних елементів клітинних КС і ПКМ має вагоме значення не лише для створення осмотолерантності, чи механічної стійкості клітин, але й для виживання за дії таких чинників стресу, як оксидативний і кислотний стреси, а також за дії генотоксичних чинників і антибіотичних сполук. Ми виявили, що зміни, які виникають в клітинах мікроорганізмів внаслідок дії чинників стресу, в більшості випадків відображаються на структурі і компонентному складі КС, ПКМ і ЦПМ, що, з одного боку, може бути індикатором стресової природи діючого чинника, а з іншого боку вказує на те, що ці структури є активними учасниками при формуванні клітинної відповіді на дію широкого кола фізико-хімічних факторів стресу. Проведені аналізи фенотипових, морфолого-структурних, фізіолого-біохімічних і молекулярно-генетичних параметрів клітин за дії чинників стресу не лише підтвердили існування стрес-специфічних механізмів клітинної відповіді але й показали долученість до цих процесів внутрішньоклітинних поліфосфатів і ферментів їх обміну (поліфосфатаз PPN1 і PPX1). Природні і антропогенні електромагнітні випромінювання не лише виказують низку біологічних ефектів, які дозволяють віднести їх до факторів стресу, але й змінюють чутливість живих організмів до дії інших чинників

стресу. А генетичні ефекти дії випромінювання дозволяють розглядати його, як можливий фактор еволюції живих організмів. Усе це разом дозволяє більш глибоко зрозуміти механізми біологічної дії різних стресів і запропонувати модель регуляції синтезу компонентів КС та ЦПМ дріжджових клітин за дії та на фоні дії факторів фізичної природи (РЧ-ЕМВ) через поліфосфат-асоційовані шляхи біосинтезу компонентів КС.

7.1. Молекулярна модель регуляції синтезу компонентів клітинної стінки та ЦПМ дріжджових клітин факторами фізичної природи

Проведені нами дослідження дозволили встановити окремі фізіолого-біохімічні, генетичні і структурні ланки клітинної організації, які виявили чутливість до дії чинників стресу фізичної і хімічної природи. Відмічені ефекти показали, що зміни, які відбуваються в клітинах дріжджів за дії РЧ-ЕМВ зачіпають майже всі досліджені ланки і впливають на ростові характеристики клітин дріжджів, їх адгезивні властивості, чутливості до антибіотиків і стійкість до інших видів стресу. Це дозволило нам запропонувати модель регуляції синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ дріжджових клітин за дії стресу, яка схематично представлена на Рис. 7.1.

Загалом ми встановили, що РЧ-ЕМВ впливають на активність ферментів гліколітичного шляху через підсилення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенизи і активність ферментів циклу трикарбонових кислот на прикладі сукцинатдегідрогенази і альфа-кетоглутаратдегідрогенази. Випромінювання впливає на процеси синтезу жирних кислот через пригнічення активності *OLE1*, з чим може бути пов’язане відмічене зменшення вмісту пальмітинової кислоти (С16:0) в ЦПМ клітин дріжджів. За дії випромінювання відбувається посилення процесу біосинтезу стеролів, адже ми відмітили зменшення вмісту сполук, які розташовані на початку цього шляху (сквален і ланостерол) і відповідне збільшення вмісту зимостеролу, який є наприкінці шляху, і ергостеролу, його кінцевого продукту. Дія випромінювання впливає на експресію генів і підвищує рівень експресії *Flo11* (одного зі структурних білків

КС), а також експресію *Ubc6* (одного з білків убіквітинового комплексу деградації дефектних білків).

Представлена на рисунку схема вказує на зв'язки між дослідженими ланками внутрішньоклітинних процесів і каскадом взаємозалежних реакцій, які й призводять до фенотипових і фізіологічних проявів на клітинному і популяційному рівнях. Так, наприклад, ефективність гліколітичного шляху і

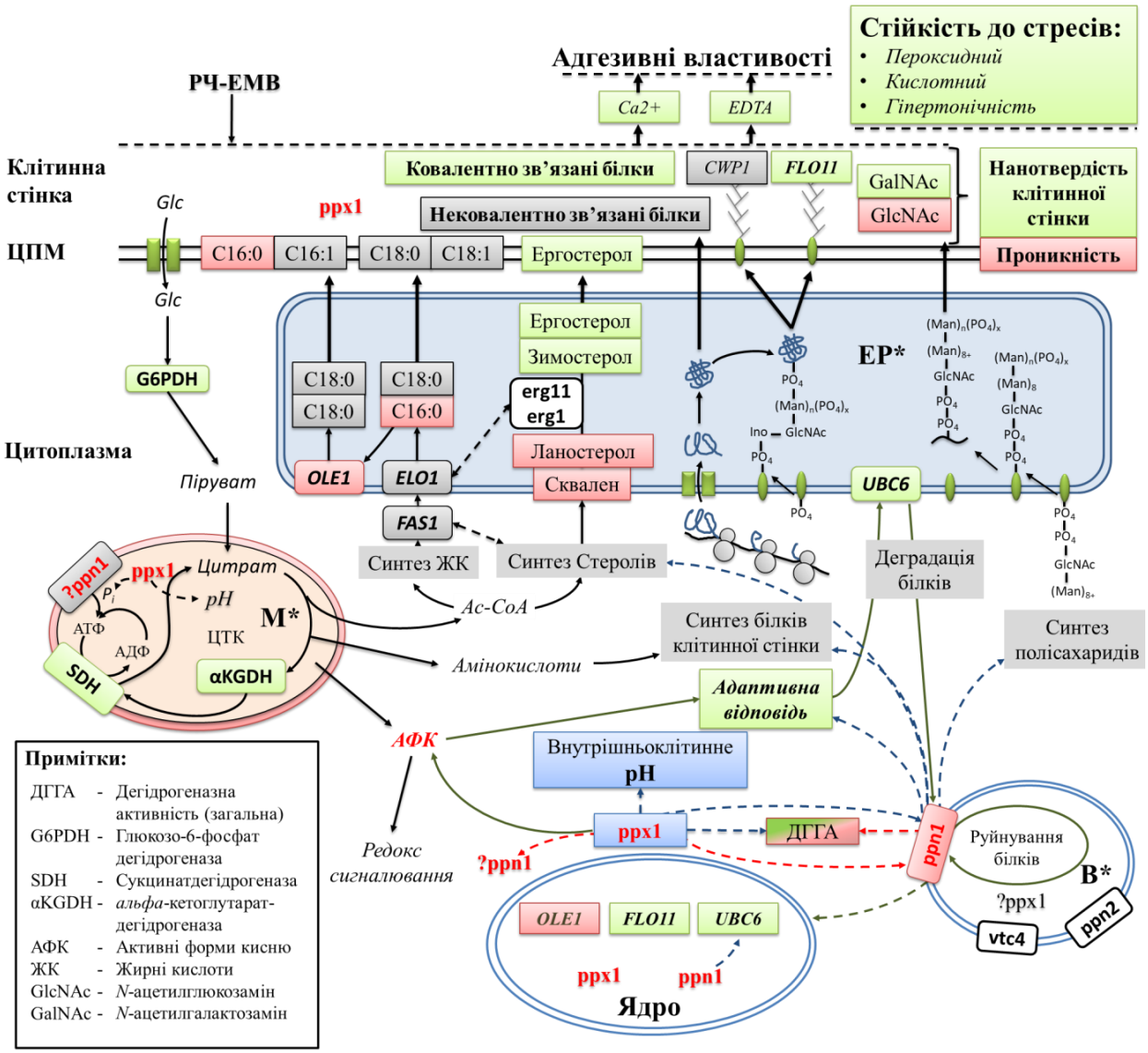


Рис. 7.1. Схема дії РЧ-ЕМВ на клітини дріжджів.

Примітки: Зелений і червоний кольори, позначають елементи, активність яких відповідно підвищується і знижується за дії ЕМВ, а сірим кольором – елементи, активність яких залишається незмінною. «ЕР» – ендоплазматичний ретикулум, «В» – вакуоля, «М» – мітохондрія.

циклу трикарбонових кислот впливає на синтез ацетил-CoA, який є обов'язковим попередником на шляху синтезу жирних кислот і стеролів, а також на синтез амінокислот, які необхідні для синтезу всіх клітинних білків. Водночас в результаті діяльності ЦТК утворюється значна кількість АФК, які впливають на редокс-статус клітин і активність щонайменше антиоксидантних систем. Також ми виявили, що більшість досліджених процесів (синтез стеролів, білків і полісахаридів) виявляють пряму залежність із активністю ендополіфосфатази PPN1. Тобто зміна активності навіть одного з ключових ферментів за дії РЧ-ЕМВ запускатиме каскад відповідних взаємопов'язаних компенсаторних чи репараційних реакцій, що, в свою чергу, відобразиться на структурних особливостях КС, ПКМ і ЦПМ клітин дріжджів і їх стійкості до чинників стресу.

Загальний характер дії РЧ-ЕМВ відповідає «класичним» стресам. Тобто за невисокого навантаження з боку РЧ-ЕМВ, в клітинах відбувається низка порушень, які знаходяться в межах гомеостатичного потенціалу клітини, а при збільшенні ж потужності, або частоти випромінювання, в клітинах можуть мати місце порушення летального характеру. Порівняння біологічної дії кількох типів РЧ-ЕМВ, які різнилися за частотою, потужністю і, відповідно, дозою показало, що різні типи РЧ-ЕМВ мають дещо відмінні біологічні ефекти і основна відмінність полягає у здатності більш високочастотного і більш потужного випромінювання викликати ефекти на рівні геному у вигляді мутацій і геномній мінливості. І хоча в цілому це відповідає загальним рисам дії стресів на живі організми, все ж випромінювання суттєво різниться за способом дії від класичних хімічних видів стресу: електромагнітне випромінювання діє моментально на всі внутрішньоклітинні молекули, які мають заряд, викликаючи їх активний рух, який відповідає частоті випромінювання, в той час як хімічні стреси діють поступово проникаючи від поверхні клітини всередину.

Зважаючи на таку особливість дії випромінювання можна припустити, що моментальне і тривале (залежно від експозиції) збурення всіх внутрішньоклітинних процесів за дії ЕМВ може перешкоджати роботі ферментних систем, значна доля яких направлена на перетворення шкідливих продуктів метаболізму. В результаті, концентрація високореакційних молекул тимчасово збільшується на всьому внутрішньоклітинному просторі, що й призводить до структурних і функціональних змін на рівні білків, ДНК, тощо (Рис. 7.2). Таке припущення знаходить своє підтвердження в результатах наших досліджень, адже ми відмітили щонайменше триразове збільшення каталазної активності після дії на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ. Активність цих ферментів повертається до норми вже за 30 хв, однак такий ефект дії випромінювання однозначно вказує на тимчасове зростання пулу внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену. Відповідно, за дії більш потужного випромінювання може відбуватися утворення й інших агресивних молекул, чим і пояснюється мутагенний потенціал таких хвиль. Зважаючи на отримані нами експериментальні результати і висунуті припущення, різке збільшення

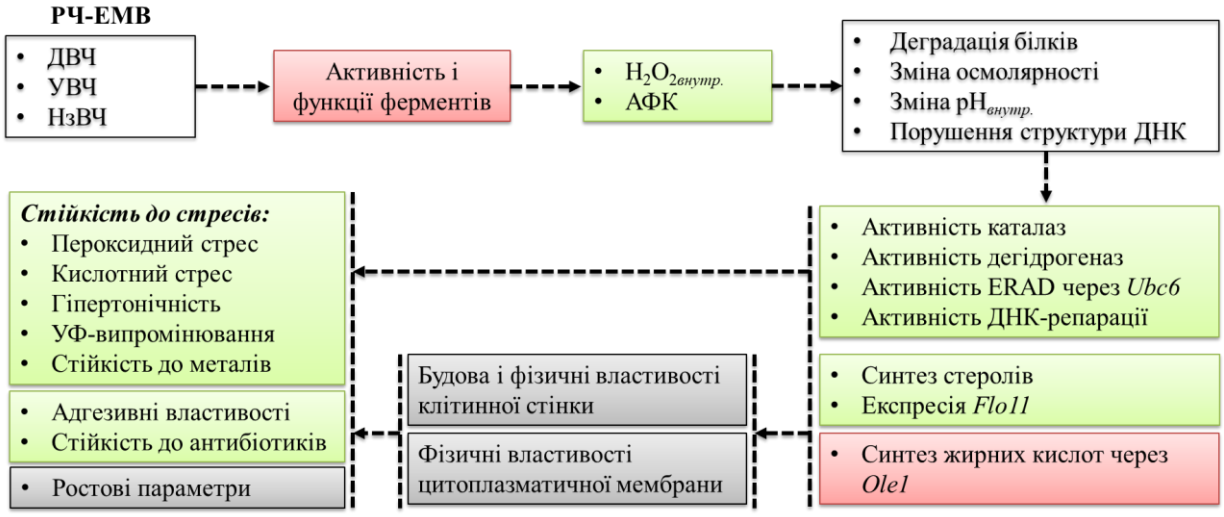


Рис. 7.2. Узагальнююча схема дії РЧ-ЕМВ на клітини живих організмів через утворення активних форм кисню і вільних радикалів. Червоним і зеленим кольорами позначені процеси, які пригнічуються і активуються за дії РЧ-ЕМВ, відповідно.

внутрішньоклітинного вмісту активних форм кисню і вільних радикалів, може бути основним тригером всіх внутрішньоклітинних змін, які були відмічені нами в дослідженнях. Саме агресивність цих молекул призводить до структурних і функціональних перетворень білків, що вимагає запуску відповідних репараційних процесів на рівні експресії генів, активації ферментних систем, тощо.

Таким чином, ми встановили окремі ланки на шляхах біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, які виказують чутливість до електромагнітного випромінювання і через які, відповідно, відбувається реалізація біологічної дії цього чинника стресу. Проте, запуск відповідних процесів ймовірно опосередкований деградацією білків і ДНК, яке відбувається в результаті неконтрольованого зростання пулу активних форм кисню і вільних радикалів. Такий результат дозволяє по-новому оцінити фенотипові, молекулярно-генетичні, фізіолого-біохімічні і морфолого-структурні зміни, які мають місце в клітинах живих організмів за дії РЧ-ЕМВ.

7.2. Обговорення

Усі хімічні чинники, так чи інакше стикаються і взаємодіють з компонентами КС і ЦПМ перш ніж потрапити в клітину. Роль цих структур, а також окремих компонентів у їх складі, у випадку вивчення дії різноманітних хімічних сполук, може бути передбачуваною і прогнозованою. В той же час, клітинні оболонки (КС і ЦПМ) не чинять перешкод для дії такого з факторів фізичної природи, як неіонізуючі ЕМВ радіочастотного діапазону. Цей тип випромінювання (на відміну, наприклад, від випромінювання оптичного діапазону, яке може поглинатися молекулами пігментів і тим самим не мати змоги потрапити в середину клітини) вільно пронизує клітини і викликає загальне збудження і коливання всіх заряджених молекул, які є в клітинах і за її межами. Результатом такої дії постулюється незначне локальне підвищення температури, яке не може мати суттєвої біологічної значущості, адже в більшості випадків не перевищує температуру необхідну для здійснення

хімічних реакцій, чи розриву хімічних зв'язків. Проте, результати наших досліджень вказують на те, що дія РЧ-ЕМВ впливає на фізіолого-біохімічний і структурно-функціональний стан клітин дріжджів, в результаті чого змінюється також і чутливість опромінених клітин до дії інших чинників стресу.

Ефекти біологічної дії випромінювання на фізіологічному рівні

Запропонована нами модель дії РЧ-ЕМВ на клітини живих організмів показує, що збільшення стійкості опромінених клітин дріжджів до різних видів стресу (оксидативного, кислотного, гіпертонічного стресу), а також до фунгіцидних антибіотиків, хоча й опосередкована змінами компонентного складу КС, ПКМ і ЦПМ і активацією певних внутрішньоклітинних систем антиоксидантного захисту і відновлення цілісності білків і ДНК, проте все це є результатом непрямої дії РЧ-ЕМВ. Натомість справжнім тригером відмічених ефектів є активні форми кисню і вільні радикали, які утворюються за дії випромінювання. Такий механізм передбачає можливу випадковість щодо типу АФК і вільних радикалів, які будуть накопичуватися в клітинах під час дії випромінювання, а також певну спорадичність щодо їх локалізації і концентрації. Такий механізм дії випромінювання буде призводити до стохастичного прояву окремих біохімічних і, значно більшою мірою, фізіологічних реакцій з боку клітин, адже очевидно, що інтенсивність утворення агресивних молекул залежатиме від цілої низки зовнішніх і внутрішніх чинників, починаючи від стадії життєвого циклу клітини, а також від хімічного складу оточення і відповідних процесів всередині клітин.

Такий погляд на механізм дії випромінювання, з одного боку, пояснює відмічені нами в попередніх дослідженнях стохастичні прояви біологічної дії ДВЧ-ЕМВ при вивченні показників росту клітин дріжджів [179].

Індукція адаптивної відповіді

З другого ж боку, ініціація процесів знешкодження відповідних агресивних молекул і запуск репараційних процесів, пояснюють здатність випромінювання викликати явище адаптивної відповіді [522]. З літератури

відомо, що адаптивна відповідь в клітинах дріжджів запускається за умов гіперосмотичного шоку і збільшує стійкість клітин до теплового шоку і гіпотонічного стресу [61]. Цей процес відбувається завдяки активності *Hog1* (однієї з MAP-кіназ HOG-шляху), яка регулює також перебіг CWI-шляху (шлях стабільності КС). В свою чергу, CWI-шлях виявляє чутливість не лише до осмотичних пертурбацій, але й до рівню внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену [5]. Приймаючи до уваги результати наших досліджень і дані літератури, об'єднуючою ланкою може бути пул внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену. За нашими даними рівень внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену зростає за дії РЧ-ЕМВ, на що опосередковано вказує триразове збільшення каталазної активності. В свою чергу, збільшення активності *UBC6*, яке вказує на активацію процесів деградації ушкоджених білків, також може бути непрямою вказівкою на ініціацію процесів пероксидного окиснення білків [554]. Очевидно, що одночасне посилення активності щонайменше цих двох ферментних систем (каталаз і ферментів убіквітинового комплексу) буде сприяти формуванню більшої стійкості клітин до послідуючої дії щонайменше пероксиду гідрогену ззовні. Водночас, дія РЧ-ЕМВ може призводити до змін в структурі КС саме через оксидативний шлях активації HOG-шляху, що й призводитиме до змін фізичних властивостей КС і збільшенню стійкості до антибіотиків і металів (Рис. 7.3).

Представлена схема індукції явища адаптивної відповіді вказує на чітку залежність між набутою стійкістю клітин живих організмів від характеру внутрішньоклітинних порушень, які виникають в клітинах живих організмів залежно від дії того чи іншого стресового чинника. Тобто явище адаптивної відповіді не має універсального характеру, натомість визначається типом репараційних процесів, які запускаються в клітинах живих організмів в результаті дії на них того чи іншого чинника стресу. Підтвердженням цьому є здатність НзВЧ випромінювання, яке має мутагенний потенціал, сприяти збільшенню стійкості опромінених клітин дріжджів до УФ-випромінювання, в той час як ДВЧ-випромінювання, яке не має мутагенного потенціалу, не мало

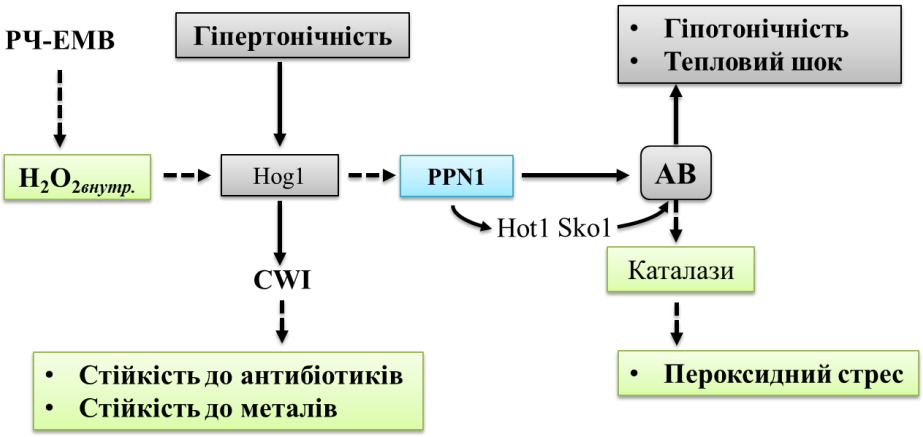


Рис. 7.3. Схема активації процесів адаптивної відповіді (АВ) і збільшення стійкості клітин дріжджів до зовнішніх чинників стресу за дії радіочастотного електромагнітного випромінювання (РЧ-ЕМВ).

Примітка: сірим кольором відмічено шлях активації АВ через Hog1 описаний в [61].

такого ефекту і набута стійкість клітин обмежувалася оксидативним, кислотним і гіперосмотичним стресами.

З іншого боку, за результатами наших досліджень, явище адаптивної відповіді не лише специфічне до типу ушкоджень, викликаних дією різних стресових чинників але й має чіткі біохімічні шляхи реалізації. Так, адаптація клітин дріжджів до оксидативного стресу унеможливлюється за відсутності поліфосфатази PPN1, а це вказує на залученість цього ферменту до формування АВ. При цьому, в клітинах дефектних за цим ферментом все ж мають місце зміни в будові КС, тобто зв'язок HOG→CWI в цілому непорушений (Рис. 7.3), в той час як зв'язок між HOG і АВ-шляхом, заблокований. І тому очевидно, що PPN1 займає проміжне положення між Hog1 і процесами формування АВ.

Вплив випромінювання на властивості клітинної стінки і позаклітинного матриксу

В цілому, відмічені ефекти дії РЧ-ЕМВ на клітини дріжджів можна віднести до опосередкованих пероксидом гідрогену змін внутрішньоклітинної осмолярності і тургору, що може відображатися на процесах біосинтезу компонентів КС. Власне з цим може бути пов'язане відмічене нами посилення

активності процесів конструктивного метаболізму викликане дією РЧ-ЕМВ (збільшенні активності ферментів гліколітичного шляху і ЦТК [14]). Проте ефекти дії випромінювання на рівні КС були двоякого характеру і з одного боку, такі показники, як заряд (дзета-потенціал) і гідрофобність поверхні, топографія і її в'язко-пружні властивості залишалися стабільними [419], з іншого ж боку, жорсткість клітин, ультраструктура КС і адгезивні властивості змінювалися достовірно, а навколо клітин формувався досить щільний екзополімерний шар [419].

Здатність РЧ-ЕМВ викликати формування екзополімерного шару, який містив значну кількість залишків манози [14], співпадало із збільшенням стійкості клітин дріжджів до фунгіцидних антибіотиків полієнового і азолового ряду, а також із стійкістю клітин дріжджів до кислотного стресу. Натомість зміни на рівні ультраструктури КС і величини наномеханічної пружності, виявляли кореляційну залежність із стійкістю клітин дріжджів до дії пероксиду гідрогену і гіперосмотичного шоку. Наномеханічні властивості КС приписують полісахаридам [262, 264] і особливу роль в цьому відводять хітину [265, 555]. Однак, ми виявили, що ключовими чинникам нанотвердості є комплекс, який містить *N*-ацетил-D-галактозамін (GalNAc) КС і *N*-ацетил-D-глюкозамін і *N*-ацетилнейрамінова кислоту ПКМ разом із GPI-білками КС, серед яких Cwp1 і Flo11 (Рис. 7.4). Для жодного з цих цукрів, за даними літератури, не показано можливої ролі у забезпеченні механічної сили КС, так само, як і білкам КС приписують зовсім інші функції не пов'язані із механічною пружністю [261] [267] [5] [262, 265]. Тим не менше, серед виявлених нами трьох цукрів, вміст GalNAc в КС виявився одним з ключових чинників стійкості клітин дріжджів також і до дії пероксиду гідрогену і гіпертонічності. В свою чергу величина чутливості клітин дріжджів до антибіотиків азолового ряду корелювала із вмістом GlcNAc в КС і активністю P_i-транспортного каналу PHO84. За даними літератури, однією з особливостей надекспресії PHO84 є те, що за цих умов, в клітинах можуть безсимптомно накопичуватися потенційно токсичні сполуки, наприклад важкі метали [556], що може бути пов'язано із збільшенням вмісту

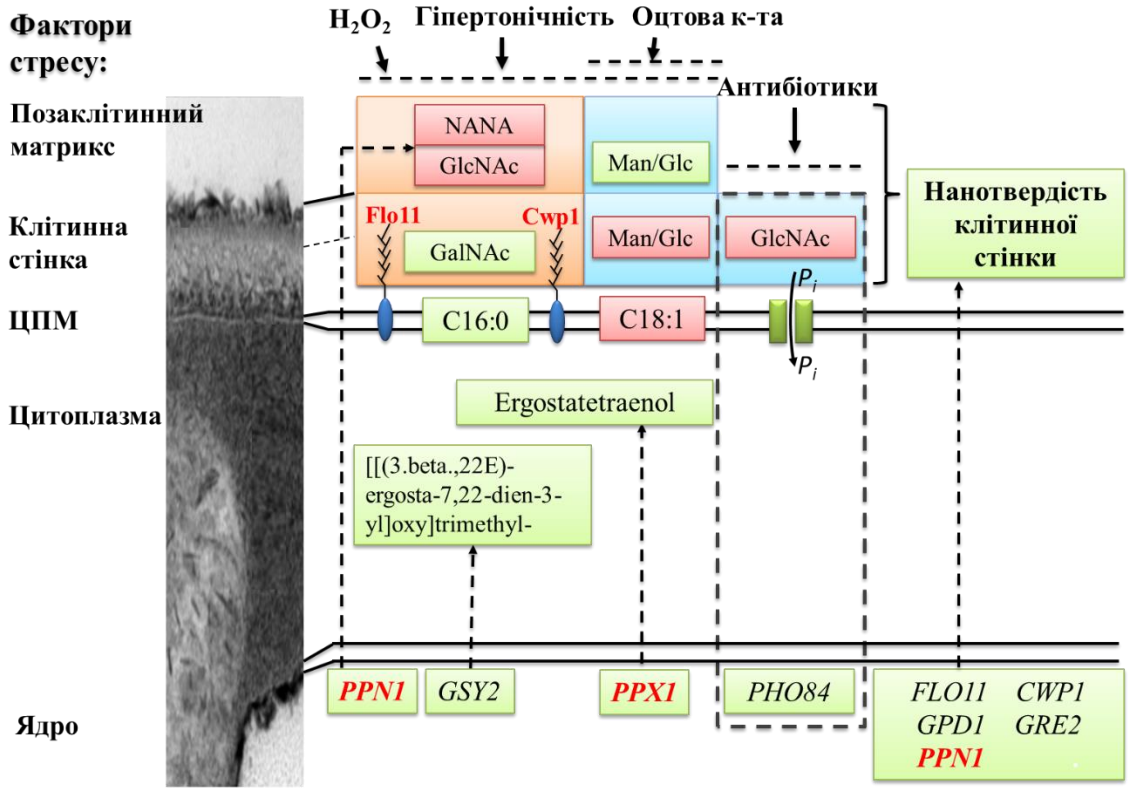


Рис. 7.4. Компоненти клітинної стінки, позаклітинного матриксу, ЦПМ, стрес-індукуємі гени і біохімічні процеси, які приймають участь у стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

полі(Ф), які є потенційними сорбентами важких металів. Ми виявили, що вміст глюкозаміну у КС і рівень експресії PHO84 є одними з ключових показників для забезпечення стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу в цілому. Однак, ці показники не мали прямого зв'язку з наномеханічними властивостями клітин, а значить стійкість до оцтової кислоти і антибіотиків визначається не стільки фізичними властивостями КС чи ЦПМ, скільки хімічною будовою і транспортними процесами в мембранах.

Аналіз експресії стрес-індукуємих генів показав існування високих кореляційних залежностей (понад 96% при $p < 0,04$) між показником нанотвердості клітин дріжджів і рівнем експресії PPN1, GPD1 і GRE2, останні два з яких хоча й є маркерами гіперосмотичного стресу, проте продукти експресії цих генів розташовані в цитоплазмі і пероксисомах (де регулюють біохімічні процеси перетворення гліцеролу і глікольальдегіду в умовах стресу),

тобто не можуть мати безпосереднього впливу на показник жорсткості КС. А тому виявлені кореляційні залежності вочевидь є непрямими.

Наномеханічні властивості КС, які очевидним чином мають сприяти стійкості клітин до осмотичних пертурабацій, виявилися навіть більш важливим для збереження життєздатності клітин дріжджів за дії пероксиду гідрогену. Зважаючи на те, що КС захищає лише від високомолекулярних сполук і для пероксиду гідрогену є вільнопроникною, більш ймовірним бар'єром для пероксиду гідрогену може бути цитоплазматична мембрана, яка, може виконувати контроль над дифузією пероксиду гідрогену. Щоб пояснити, яким чином відбувається такий контроль, деякими дослідниками було висунуто припущення щодо існування специфічних трансмембранних транспортних систем [1, 2, 48], з іншого ж боку, було показано, що механічні сили, накладені осмотичним розтягуванням ліпідних шарів ЦПМ, також можуть бути чинником, який впливає на дифузію пероксиду гідрогену крізь мембрани [367, 373]. Результати наших досліджень виступають в підтримку саме другого припущення, що клітини потенційно здатні контролювати трансмембранну дифузію пероксиду гідрогену шляхом зміни свого осмотичного тиску [1]. Зважаючи на це, зміни величини нанотвердості, які виникають за дії РЧ-ЕМВ, можуть бути гомеостатичною протидією осциляціям внутрішньоклітинного тиску. Опосередкованим доказом на користь такого припущення може бути відмічена відносна інертність компонентного складу мембрани до дії РЧ-ЕМВ і, одночасне, зниження її проникності [14]. Тобто збільшення внутрішньоклітинного тургору в наслідок дії РЧ-ЕМВ може бути сигналом для запуску процесів направлених на збільшення жорсткості КС і тим самим створювати протидію внутрішньоклітинному тиску для збереження цілісності клітин (Рис. 7.5).

Хоча ми не відмітили змін білкових профілів клітин дріжджів за дії факторів стресу, проте високий рівень кореляції між вмістом галактозаміну в КС і рівнем експресії CWP1, може опосередковано вказувати на стимулювання синтезу і збільшення вмісту GPI-білків в складі КС. Окрім того, аналіз

адгезивних властивостей опромінених клітин дріжджів також продемонстрував збільшення фракції поверхневих адгезинів чутливих до EDTA і іонів кальцію. Разом ці результати дозволяють стверджувати, що РЧ-ЕМВ таки змінює біохімічні властивості поверхні клітин дріжджів. Однак зважаючи на те, що рівні експресії досліджених білків не мали прямих зв'язків із стійкістю клітин до дії факторів стресу, можна припустити, що вміст лише окремих структурних білків в КС має бути збільшеним для досягнення максимальної стійкості клітин до дії факторів стресу, в той час як деградація або ж конформаційні зміни білків можуть бути не лише причиною низької стійкості, але й сигнальним механізмом для ініціювання процесу структурних змін в КС.

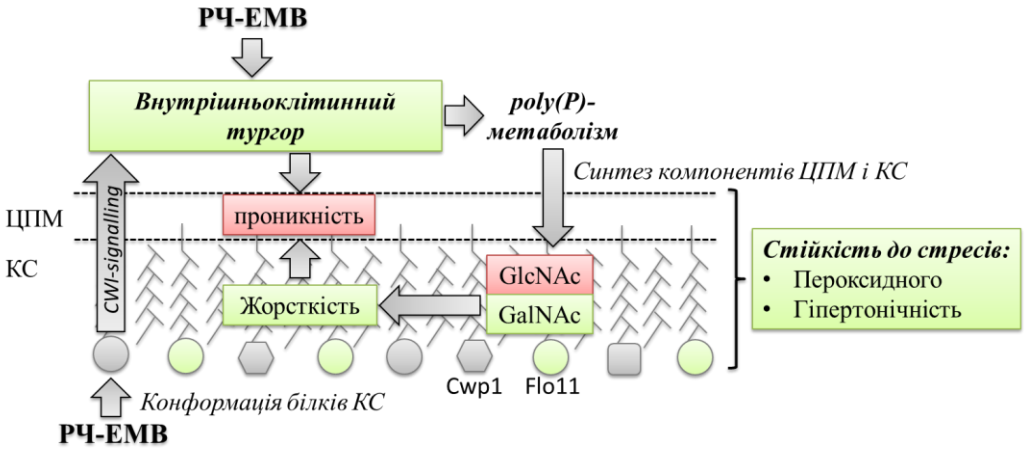


Рис. 7.5. Схема дії РЧ-ЕМВ на синтез компонентів клітинної стінки через зміну внутрішньоклітинного тургору.

Вплив випромінювання на синтез жирних кислот і стеролів

Ми відмітили певні ознаки послаблення синтезу жирних кислот за рівнем експресії *Ole1* і зниження вмісту пальмітинової кислоти (C16:0) хоча в цілому склад ЦПМ після дії РЧ-ЕМВ залишався відносно стабільним, навіть за дії на опромінені клітин дріжджів такого з факторів стресу, як температурний шок [420]. Виходячи з запропонованої нами схеми дії випромінювання на субклітинному рівні, пригнічення синтезу жирних кислот може бути тимчасовою адаптаційною зупинкою, адже одним з побічних продуктів синтезу жирних кислот є пероксид гідрогену, який в нормі захоплюється відповідними

ферментними системами захисту [557]. Відповідно, індуковане РЧ-ЕМВ зростання пулу внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену, вочевидь викликає блокування процесів, які можуть слугувати його додатковим джерелом.

Незважаючи на відносну стабільність ЦПМ до дії РЧ-ЕМВ, вона активно реагує на дію інших чинників стресу і вміст С16 жирних кислот виказав залежність із стійкістю клітин до оксидативного стресу, а вміст С18 негативно корелював із стійкістю до кислотного стресу і до гіперосмотичного шоку. Проте найбільш вагомі залежності були відмічені щодо вмісту ергостеролу, який, як припускають, визначає текучість мембран [558], і який позитивно корелював із стійкістю клітин до кислотного стресу, в той час як стійкість до інших стресових факторів виявляла залежність із проміжними продуктами на шляху біосинтезу ергостеролу. Біосинтез стеролів пов'язаний біохімічними шляхами із синтезом жирних кислот і при порушенні біосинтезу стеролів відбуваються зміни в експресії генів, що відповідають за синтез жирних кислот (*ELO1, OLE1* і *FAS1)* [508, 509]. Однак, відмічене нами зниження експресії *OLE1* за дії ДВЧ ЕМВ і інших факторів стресу не може бути пов’язано із синтезом ергостеролу, адже активність цього гену не корелює із рівнем ергостеролу в клітинах дріжджів за дії жодного зі стресів. Значних відмінностей в експресії генів *FAS1* і *ELO1* не виявлено. Такий результат узгоджується з даними літератури щодо виявлених зв’язків між експресією цих генів і біосинтезом стеролів в клітинах дріжджів, адже *FAS1*, хоча й відноситься до "*housekeeping*" генів, синтез яких вважається конститутивним [517], однак він може бути активований дією інозитол/холін-активуємого фактору транскрипції Ino2p-Ino4p [518] і пригнічений при порушенні біосинтезу стеролів [508]. Надекспресія *FAS1* не впливає на синтез стеролів [509]. Зважаючи на ці дані зменшення рівня експресії *FAS1* може слугувати індикатором порушення біосинтезу стеролів, наприклад за дії антибіотиків азолового ряду [508]. Однак в нашому дослідженні експресія *FAS1* не змінювалася, а отже варіювання кількісного вмісту ергостеролу за дії РЧ-ЕМВ відбувається в рамках гомеостатичного потенціалу клітин. Вміст окремих жирних кислот і окремих стеролів мав

достовірну залежність лише з експресією окремих пар генів: *HSP12* і *TRX2* – для жирних кислот і *GSY2* і *PPX1*, відповідно, для стеролів. З літератури добре відомо про існування зв'язку між активністю *GSY2* і синтезом стеролів [526], який, окрім іншого, може бути пов'язаний також із синтезом полі(Ф) [527]. В свою чергу Trx2 є ключовим ферментом, який впливає на етапи біосинтезу жирних кислот [528]. Разом це вказує на невипадковість отриманих нами закономірностей. В той же час зв'язок між експресією *HSP12* і вмістом окремих жирних кислот, може бути опосередкованим, адже на часі немає літературних доказів існування метаболічного зв'язку між цими процесами [529].

Стабільність геному і мутагенний потенціал факторів фізичної природи

Геном клітин дріжджів виявився чутливим до дії РЧ-ЕМВ сантиметрового і міліметрового діапазонів, які виказали не лише мутагенний потенціал але й здатність стимулювати явище геномної мінливості. Найбільш вагомі генетичні зміни нелетального характеру були виявлені за дії випромінювання низької енергії і стосувалися необернених змін профілів ДНК клітин дріжджів, викликаних дією хронічного опромінювання сантиметрового діапазону. Цей факт показує, що РЧ-ЕМВ низької інтенсивності можуть бути потенційним еволюційним чинником. В той час, як при збільшенні потужності випромінювання, в молекулі ДНК виникали одноланцюгові розриви і відбувався запуск процесів мітотичного кросинговеру. З одного боку це вказує на чутливість молекули ДНК *in vivo* до радіочастотного випромінювання, а з другого боку може бути поясненням здатності НзВЧ-ЕМВ підвищувати життєздатність клітин дріжджів до послідуючої дії УФ-випромінювання: через активацію систем репарації ДНК.

Вплив випромінювання на дію інших чинників стресу

Результати проведених досліджень показали, що біологічні ефекти дії випромінювання не залежать від дії інших чинників стресу, а визначаються біологічними чинниками (наприклад штамовими відмінностями). Тобто механізм впливу випромінювання не залежить від інших хімічних чи механічних чинників стресу, однак може перешкоджати дії останніх. За умови

дії комплексу стресових факторів на біологічні системи неіонізуючі РЧ-ЕМВ мають ряд переваг перед дією хімічних чинників стресу і найголовнішим з них є та, що дія випромінювання наступає моментально в усій площині клітини, в той час, як фактори хімічного стресу поступово проникають в клітину через КС і ЦПМ. Окрім того, хімічні чинники можуть взаємно пригнічувати активність один одного, що ми відмітили при сумісній дії оцтової кислоти і пероксиду гідрогену, де стійкість клітин за дії такого комплексу стресів збільшувалася порівняно із дією кожного з факторів окремо.

Запропонований нами механізм дії РЧ-ЕМВ вказує на відсутність можливої взаємодії між фізичним чинником і хімічними агентами, адже основним ефектом дії випромінювання є індукція утворення внутрішньоклітинних АФК і вільних радикалів, які й викликають специфічні реакції, які залежать перш за все від біологічних особливостей і здатності клітин живих організмів нівелювати внутрішньоклітинні пертурбації.

Ми не відмітили так званого «адитивного» або ж «сумарного» ефекту при дії комплексу стресів. Випромінювання мало здатність збільшувати стійкість клітин до окремих видів стресу, проте біологічний ефект визначався дією того фактору, активність якого мала найбільш виразну цито- чи генотоксичну дію і не залежала від дії інших факторів. Наприклад, при сумісній дії пероксиду гідрогену, оцтової кислоти й доксорубіцину, ефекти дії доксорубіцину не виказували залежності від присутності інших двох факторів, ефективність дії яких взаємно пригнічувалася, а тому й показник життєздатності клітин дріжджів мав досить чітку залежність саме від концентрації доксорубіцину.

Роль полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 у формуванні компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу і цитоплазматичної мембрани і у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу

Ми розглядали поліфосфати і ферменти їх метаболізму як можливі рецептори зовнішніх електромагнітних хвиль природного і антропогенного походження. Результати проведених досліджень показали, що роль цих ферментів у реалізації біологічної дії електромагнітних хвиль полягає у

регуляції, яку вони виконують в процесах біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, у регуляції експресії стрес-індукуємих генів, в роботі ферментів дегідрогеназного комплексу, процесах росту і формування стійкість до факторів стресу, тощо (табл. 7.1).

Роль полі(Ф)аз може бути опосередкованою через зміну довжини внутрішньоклітинних полі(Ф), які проявляють властивості хелатуючих агентів, шаперонів [458] і тим самим знижують токсичність важких металів, вільних радикалів, регулюють внутрішньоклітинне pH, тощо. До подібного висновку приходять й інші дослідники, які припускають провідну роль саме акумуляції полі(Ф) в КС *Mycobacterium tuberculosis* за відсутності PPX1 із одночасним порушенням синтезу компонентів КС, як механізм збільшення стійкості клітин бактерій до дії ізоніазиду [559]. Однак ми відмітили, що лише дефектність за PPX1 спричиняє незначне збільшення довжини полі(Ф) лугорозчинної фракції. Тобто ефект не був глобальним і не може пояснити ефекти відмічені в разі дефектності за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1.

Отримані результати вказують, що залученість полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 до процесів біосинтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ, не пов’язана із синтезом полі(Ф)-ланцюгів, хоча й може бути ключовою для забезпечення стійкості клітин до дії факторів стресу. Роль поліфосфатів є другорядною і на перший план виходять процеси біосинтезу компонентів клітинних оболонок (цукрів КС, стеролів ЦПМ), а також, вочевидь, зміни конформації білків-мішеней (наприклад, ферменту ланостерол-14-*α*-деметилази (*CYP51*)) за дії факторів стресу (Рис. 7.6). Ці процеси тісно пов’язані із метаболізмом фосфору, принаймні через активність *PHO84*, який кодує *Pi*-транспортний білок ЦПМ, а також із метаболізмом полі(Ф), через функції ферментів полі(Ф)аз PPN1 і PPX1. В свою чергу ефекти дії РЧ-EMB на транспорт фосфору через мембрани, також може бути пов’язаний зі змінами конформації білків-ферментів складових транспортного каналу.

Серед можливих причин порушення внутрішньоклітинних процесів за відсутності PPN1, може бути участь цього ферменту в процесах

дефосфорилювання білків, як, наприклад, показано для білку-трансдуктору і активатору транскрипції STAT1 [260], який, окрім іншого, активує синтез холестерол-25-гідроксилази, ферменту необхідного для синтезу 25-гідроксихолестерола – основного похідного холестеролу [560].

Таблиця 7.1.

Вплив делецій генів полі(Ф)аз PPN1 і PPX1 на фізіолого-біохімічні і цитоморфологічні показники клітин дріжджів

Оцінюваний показник	***Δppn1***	***Δppx1***
Морфолого-фізіологічні показники:		
Морфологія і розміри клітин	не впливає	не впливає
Ріст на рідкому поживному середовищі	не впливає	не впливає
Ріст на агаризованому поживному середовищі	не впливає	знижує
Загальна дегідрогеназна активність	не впливає	зменшується
Вміст цукрів в клітинній стінці і позаклітинному матриксі:		
Рибоза	Не змінюється	Зникає
Позаклітинний матрикс		
α-Маноза/*α*-Глюкоза	Зростає в 2 рази	Зростає в 17 разів
Сіалова кислота	Зростає в 13 разів	Зростає в 33 рази
Глюкозамін	Не змінювався	знижувався
Клітинна стінка:		
α-Маноза/*α*-Глюкоза	Зростає в 3 рази	Не змінюється
Сіалова кислота	Зростає в 20 разів	Зникає
Галактоза	Зникає	Зростає в 2,5 рази
Цитоплазматична мембрана:		
Склад жирних кислот	не впливає	збільшує C16:0
Експресія *OLE1*	Зростає в 1,8 рази	Не змінюється
Вміст ергостеролу	Збільшується в 2 рази	Не змінюється
Склад стеролів	Змінюється	Змінюється
Інші показники:		
Загальний білковий профіль	не впливає	не впливає
Білковий профіль КС	впливає	не вивчено
Геномна нестабільність	збільшується	збільшується
Нанотвердість	знижує	не впливає
Стійкість до фунгіцидних антибіотиків	не впливає	збільшує (до флуконазолу)

Полі(Ф)аза PPN1 може бути одним з ключових ферментів, необхідних для формування клітинами дріжджів явища адаптивної відповіді. В той час, як полі(Ф)аза PPX1 відіграє роль у забезпеченні стійкості клітин дріжджів до дії оксидативного і кислотного стресу. Що є вказівкою на те, що цей фермент залучений до процесів підримки балансу внутрішньоклітинного pH і АФК. Ці ж клітини мали дещо вищу стійкість і до дії генотоксичного чинника (доксорубіцину), що, очевидно, можна вважати опосередкованим ефектом пов'язаним із делецією PPX1. В свою чергу, дефектність за полі(Ф)азою PPN1 також призводила до помірного зростання стійкості клітин дріжджів до дії оксидативного і кислотного стресу, і також збільшувала стійкість до доксорубіцину. Однак, за нашими даними, цей фермент не має прямого впливу на стійкість клітин дріжджів до дії вивчених факторів стресу і ефект може бути обумовлений участю цих ферментів у синтезі і підтримці пулу глюкозаміну в клітинній стінці, який власне й визначає стійкість клітин до дії даних факторів стресу. Окрім того, обидві полі(Ф)ази знижують вміст нейрамінової кислоти в ПКМ, що позитивно впливає на показник нанотвердості (98% при $p = 0{,}017$) і також збільшує стійкість до пероксиду гідрогену і гіперосмотичного шоку.

Дефектність за полі(Ф)азами, так само як і дія стресових факторів, призводила до збільшення показнику геномної нестабільності. Проте, рівень експресії *RNR3*, гену-маркеру геномної нестабільності, в клітинах делеційних мутантів був зниженим на фоні підвищення експресії *GSY2* (принаймні в Δ*ppn1*-клітинах), що вказує на загальний геномний стрес в цих клітинах. Такий результат вказує не лише на залучення обох полі(Ф)аз до забезпечення стабільності геному клітин дріжджів, але й на існування різних способів індукції явища геномної нестабільності.

Отримані нами дані добре узгоджуються з даними літератури і доповнюють їх новими молекулярно-генетичними зв'язками та вказують на ключову роль не лише окремих компонентів але й на взаємодію між структурною організацією ЦПМ, КС і ПКМ, властивості яких в комплексі направлені на забезпечення стійкості клітин дріжджів до дії факторів стресу.

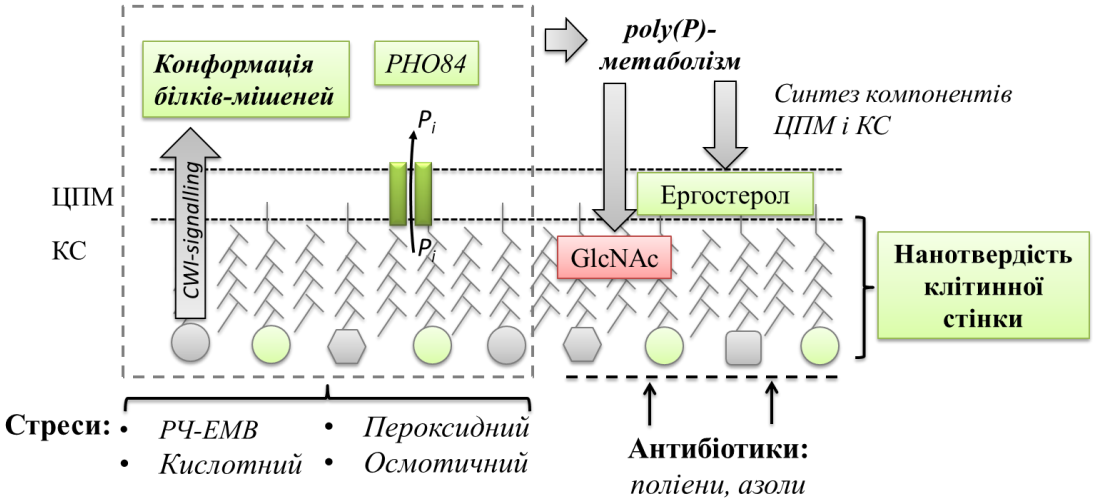


Рис. 7.6. Схема дії факторів стресу на чутливість клітин дріжджів до антибіотиків.

Ми встановили існування принаймні двох шляхів дії РЧ-ЕМВ на клітини: (1) через зміну внутрішньоклітинного тургору і (2) через конформаційні зміни структурних білків і ферментів (CWI-білків КС, ферментів дегідрогеназного комплексу, полі(Ф)ази PPN1, тощо). В обох випадках основним тригером може виступати різке збільшення вмісту активних форм кисню і вільних радикалів, яке впливає на конформацію і функціональний стан білків. Саме така дія РЧ-ЕМВ можливо є основною причиною виявлених біологічних ефектів, адже індукція геномної нестабільності, так само як і зміна внутрішньоклітинного pH, запуск убіквітин-асоційованого шляху деградації дефектних білків, зміна тонічності – все це може бути результатом утворення в клітинах дефектних білків, які некоректно виконують синтез чи реплікацію ДНК, перешкоджають нормальному протіканню біохімічних процесів, що в цілому вимагає запуску відповідних репараційних процесів і, як результат, проявляється в більшій стійкості опромінених клітин до дії факторів стресу.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень були встановлені основні структурні елементи КС, ПКМ і ЦПМ, які відіграють роль у формуванні стійкості клітин дріжджів до дії чинників стресу хімічної природи (пероксидний і кислотний стреси, гіпертонічність), антибіотиків і генотоксичних агентів. Запропоновано механізм біологічної дії неіонізуючого випромінювання радіочастотного діапазону і встановлено внутрішньоклітинні шляхи, через які відбувається модуляція синтезу компонентів КС, ПКМ і ЦПМ за дії факторів фізичної і хімічної природи.

1. Більшість із досліджених факторів фізичної і хімічної природи виявляють свою дію на рівні КС, ПКМ і ЦПМ в мікроорганізмів різних систематичних груп. Субмікроскопічні особливості цих структур змінюються залежно від сили і тривалості дії чинника стресу, що вказує на безпосередню участь цих структур у формуванні клітинної відповіді не лише на механічні деформації чи осмотичний стрес, але й на цілу низку досліджених чинників (пероксидний і кислотний стреси, дію наночасток і електромагнітного випромінювання, дію антибіотичних сполук і генотоксичних чинників).
2. Неіонізуюче радіочастотне електромагнітне випромінювання метрового, сантиметрового і міліметрового діапазонів має цито- і генотоксичний потенціал і стимулює процеси геномної мінливості, мутагенезу і апоптозу. Ефективність дії випромінювання залежить від біологічних властивостей живих організмів, адже проявляє штамову і видову специфічність, від фізичних параметрів хвилі, таких як частота і потужність, і від параметрів експозиції, таких як тривалість і температурний режим.
3. КС, ПКМ і ЦПМ містять окремі складові, які впливають на загальну стійкість клітин дріжджів до дії хімічних чинників. Так вміст *N*-ацетилглюкозаміну (*GlcNAc*) в клітинній стінці, окремих стеролів в

мембранах (сілан,[[(3-*β*-22E)-ергоста-7,22-дієн-3-іл]окси]триметил- і 5-Хі-ергост-7-єн-3-*β*-(триметилсілокси)-) і рівень експресії *PHO84* (фосфат-транспортний канал ЦПМ) виявляли високу (понад 90%) кореляційну залежність із стійкістю клітин до дії різних зовнішніх факторів.

4. Білки, які входять до складу клітинної стінки, поряд з *N*-ацетилглюкозаміном, *N*-ацетилгалактозаміном і *N*-ацетилнейраміновою кислотою клітинної стінки і позаклітинного матриксу, разом визначають механічні властивості клітин (величину наножорсткості) і стійкість клітин до гіперосмотичного шоку і пероксидного стресу.
5. Вміст жирних кислот (C18:x і C16:x), а також вміст ергостеролу в мембранних структурах клітин дріжджів може бути визначальним для формування стійкості клітин до окремих типів стресу.
6. Поліфосфатази PPN1 і PPX1 є універсальними регуляторними елементами, які долучені до формування клітинами відповіді на дію факторів стресу. Поліфосфатаза PPN1 є одним із ключових ферментів, необхідних для формування клітинами дріжджів явища адаптивної відповіді, який реалізується через *Hog1*-шлях. Участь PPN1 і PPX1 в процесах біосинтезу компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу і цитоплазматичної мембрани не пов’язана із метаболізмом полі(Ф)-ланцюгів, хоча цей процес, вочевидь, є вагомим для забезпечення стійкості клітин дріжджів до кислотного стресу.
7. Зміна властивостей поверхневих адгезинів і перерозподіл цукрових залишків між клітинною стінкою і позаклітинним матриксом є причиною стрес-індукованих змін, які впливають на адгезивні властивості клітин дріжджів, а також їх стійкість до антибіотиків за дії радіочастотного електромагнітного випромінювання метрового діапазону.
8. Механізм впливу радіочастотного випромінювання метрового (40,68 МГц, 15 і 30 Вт) і міліметрового діапазонів (57-62,5 ГГц, 10^{-4} Вт) не залежить від дії хімічних чинників стресу, проте може зменшувати їх ефективність шляхом активації в клітинах процесів адаптивної відповіді.

При сумісній дії кількох чинників стресу загальнобіологічний ефект визначається дією фактору з найбільш виразним цито- чи генотоксичним потенціалом.

9. Основним ефектом дії радіочастотного випромінювання метрового (40,68 МГц, 15 і 30 Вт), сантиметрового (1871 МГц, 0,1-10 мкВт/см^2) і міліметрового (57-62,5 ГГц, 10^{-4} Вт) діапазонів є неконтрольоване утворення внутрішньоклітинних АФК і вільних радикалів, які запускають процеси окиснення білків і руйнування структури ДНК. Тому ефективність біологічної дії випромінювання знаходиться в прямій залежності від фізіолого-біохімічного стану організму і здатності клітин живих організмів нівелювати відповідні ушкодження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. G. P. Bienert, J. K. Schjoerring, and T. P. Jahn, “Membrane transport of hydrogen peroxide,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, V.1758, N8. 2006.
2. V. Folmer *et al.*, “H2O2 induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, V.1778, N4, 2008.
3. J. C. Harrison, E. S. G. Bardes, Y. Ohya, and D. J. Lew, “A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint,” *Nat. Cell Biol.*, V.3, N4, 2001.
4. J. Torres, C. J. Di Como, E. Herrero, and M. A. De La Torre-Ruiz, “Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast,” *J. Biol. Chem.*, V.277, N45, 2002.
5. D. E. Levin, “Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, V.69, N2, 2005.
6. O. Tehlivets, K. Scheuringer, and S. D. Kohlwein, “Fatty acid synthesis and elongation in yeast,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, V.1771, N3. 2007.
7. I. V. Ene *et al.*, “Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance,” *MBio*, V.6, N4, 2015.
8. N. Udom, P. Chansongkrow, V. Charoensawan, and C. Auesukaree, “Coordination of the cell wall integrity and highosmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, V.85, N15, 2019.
9. Т. В. Кулаев, И.С., Вагабов, В.М., Кулаковская, *Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология*, Научный ми. М., 2005.
10. T. Albi and A. Serrano, “Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V.32, N2. 2016.

11. N. N. Rao, S. Liu, and A. Kornberg, “Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: The phosphate regulon and the stringent response,” *J. Bacteriol.*, V.180, N8, 1998.
12. M. H. Rashid, N. N. Rao, and A. Kornberg, “Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens,” *J. Bacteriol.*, V.182, N1, 2000.
13. J. Schaber *et al.*, “Biophysical properties of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship with HOG pathway activation,” *Eur. Biophys. J.*, V.39, N11, 2010.
14. S. I. Voichuk and E. N. Gromozova, “Effect of radiofrequency of electromagnetic radiation on yeast sensitivity to fungicide antibiotics,” *Mikrobiol. Z.*, V.66, N4, 2004.
15. IARC, “IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans,” *World Health Organization*, 2011. .
16. L. Giuliani and M. Soffritti, “Non thermal effects and mechanisms of interaction between EMF and living matter: a selected summary,” *Eur. J. Oncol.*, V.5, 2010.
17. I. A. Volodin, E. L. Terpugov, O. V. Degtyareva, and V. V. Savranskii, “Mechanisms of interaction of electromagnetic microwave field with water-saturated geostructures. Part 2,” *Actual Probl. Oil Gas*, N23, 2018.
18. S. Singh and N. Kapoor, “Health Implications of Electromagnetic Fields, Mechanisms of Action, and Research Needs,” *Adv. Biol.*, V.2014, 2014.
19. D. Botstein and G. R. Fink, “Yeast: An experimental organism for 21st century biology,” *Genetics*, V.189, N3, 2011.
20. E. N. Gromozova, S. I. Voychuk, L. B. Zelena, and I. A. Gretskey, “Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation,” in *RAD Conference Proceedings*, 2012, V.2012-April.
21. С. И. Войчук, “Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как модельный организм для исследования канцерогенности неионизирующих электромагнитных полей и излучений,” *Мікробіол. журн.*, V.76, N1, pp. 53–61, 2014.
22. H. Selye, “Experimental evidence supporting the conception of "adaptation

energy",” *Am. J. Physiol. Content*, V.123, N3, 1938.

23. A. N. Gorban, T. A. Tyukina, E. V. Smirnova, and L. I. Pokidysheva, “Evolution of adaptation mechanisms: Adaptation energy, stress, and oscillating death,” *J. Theor. Biol.*, V.405, 2016.
24. J. Abingdon, “Genome Stability: DNA Repair and Recombination.,” *YALE J. Biol. Med.*, V.88, 2015.
25. A. R. Shim *et al.*, “Dynamic Crowding Regulates Transcription,” *Biophys. J.*, V.118, N9, 2020.
26. K. R. Diller, “Stress protein expression kinetics,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, V.8. 2006.
27. S. Wang, K. R. Diller, and S. J. Aggarwal, “Heat shock protein 70 expression kinetics,” in *ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, Proceedings*, 2002.
28. Z. Kazemi, H. Chang, S. Haserodt, C. Mcken, and N. E. Zachara, “Stress-induced Heat Shock Protein Expression in a,” *J. Biol. Chem.*, V.285, N50, 2010.
29. M. Bansal and N. Kaushal, *Oxidative stress mechanisms and their modulation*, V.9788132220329. 2014.
30. R. C. MacLean, C. Torres-Barceló, and R. Moxon, “Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria,” *Nature Reviews Genetics*, V.14, N3. 2013.
31. J. Schimel, T. C. Balser, and M. Wallenstein, “Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function,” *Ecology*, V.88, N6. 2007.
32. D. De Biase, J. P. Morrissey, and C. P. O’Byrne, “Editorial: Microbial stress: from sensing to intracellular and population responses,” *Frontiers in Microbiology*, V.11. 2020.
33. J. B. Logue, S. E. G. Findlay, and J. Comte, “Editorial: Microbial responses to environmental changes,” *Frontiers in Microbiology*, V.6, NDEC. 2015.
34. D. Mattanovich, M. Sauer, and B. Gasser, “Yeast biotechnology: Teaching the old dog new tricks,” *Microbial Cell Factories*, V.13, N1. 2014.
35. R. S. K. Walker and I. S. Pretorius, “Applications of yeast synthetic biology

geared towards the production of biopharmaceuticals," *Genes*, V.9, N7. 2018.

36. S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali, "Cellular stress responses: Cell survival and cell death," *International Journal of Cell Biology*. 2010.
37. R. Sano and J. C. Reed, "ER stress-induced cell death mechanisms," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, V.1833, N12. 2013.
38. D. Liu *et al.*, "Response of microbial communities and their metabolic functions to drying–rewetting stress in a temperate forest soil," *Microorganisms*, V.7, N5, 2019.
39. D. R. Andrade-Linares, A. Lehmann, and M. C. Rillig, "Microbial stress priming: A meta-analysis," *Environ. Microbiol.*, V.18, N4, 2016.
40. P. Ranawat and S. Rawat, "Stress response physiology of thermophiles," *Archives of Microbiology*, V.199, N3. 2017.
41. N. Guan, J. Li, H. dong Shin, G. Du, J. Chen, and L. Liu, "Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.101, N10. 2017.
42. F. Depardieu, I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin, "Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression," *Clinical Microbiology Reviews*, V.20, N1. 2007.
43. R. A. Crawford and G. D. Pavitt, "Translational regulation in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, V.36, N1, 2019.
44. D. Chasman *et al.*, "Pathway connectivity and signaling coordination in the yeast stress-activated signaling network," *Mol. Syst. Biol.*, V.10, N11, 2014.
45. A. Święciło, "Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast—new insight into an old phenomenon," *Cell Stress Chaperones*, V.21, N2, 2016.
46. A. P. Gasch *et al.*, "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes," *Mol. Biol. Cell*, V.11, N12, 2000.
47. H. Taymaz-Nikerel, A. Cankorur-Cetinkaya, and B. Kirdar, "Genome-wide transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress-induced perturbations," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, V.4, NFEB. 2016.
48. G. P. Bienert and F. Chaumont, "Aquaporin-facilitated transmembrane

diffusion of hydrogen peroxide," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, V.1840, N5. 2014.

49. А. Н. Павлов and С. А. Новичков, "Механизм биоинформационных процессов в организме человека," *Интернетжурнал «Мир науки»*, N1, p. http://mir-nauki.com/PDF/07EMN115.pdf, 2015.
50. F. Tamanoi, "Ras signaling in yeast," *Genes and Cancer*, V.2, N3, 2011.
51. G. Cazzanelli *et al.*, "The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model for understanding RAS proteins and their role in human tumorigenesis," *Cells*, V.7, N2, 2018.
52. D. Besozzi, P. Cazzaniga, D. Pescini, G. Mauri, S. Colombo, and E. Martegani, "The role of feedback control mechanisms on the establishment of oscillatory regimes in the Ras/cAMP/PKA pathway in *S. cerevisiae* computational systems biology," *Eurasip J. Bioinforma. Syst. Biol.*, V.2012, N1, 2012.
53. G. Huang, Q. Huang, Y. Wei, Y. Wang, and H. Du, "Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans*," *Molecular Microbiology*, V.111, N1. 2019.
54. E. Eskes, M. A. Deprez, T. Wilms, and J. Winderickx, "pH homeostasis in yeast; the phosphate perspective," *Current Genetics*, V.64, N1. 2018.
55. L. Chantranupong and D. M. Sabatini, "Cell biology: The TORC1 pathway to protein destruction," *Nature*, V.536, N7615. 2016.
56. P. Tomar and H. Sinha, "Conservation of PHO pathway in ascomycetes and the role of Pho84," *Journal of Biosciences*, V.39, N3. 2014.
57. D. K. Morrison, "MAP kinase pathways," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, V.4, N11, 2012.
58. Q. Peng, Z. Deng, H. Pan, L. Gu, O. Liu, and Z. Tang, "Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer (Review)," *Oncology Letters*, V.15, N2. 2018.
59. J. D. Molkentin *et al.*, "Fibroblast-specific genetic manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase *in vivo* reveals its central regulatory role in fibrosis," *Circulation*, V.136, N6, 2017.

60. P. Dunayevich *et al.*, “Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway,” *Sci. Rep.*, V.8, N1, 2018.
61. R. Alonso-Monge, E. Real, I. Wojda, J. P. Bebelman, W. H. Mager, and M. Siderius, “Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects,” *Mol. Microbiol.*, V.41, N3, 2001.
62. A. Miermont, J. Uhlendorf, M. McClean, and P. Hersen, “The dynamical systems properties of the HOG signaling cascade,” *J. Signal Transduct.*, V.2011, 2011.
63. Y. M. Lee *et al.*, “Dissection of the HOG pathway activated by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Environ. Microbiol.*, V.19, N2, 2017.
64. S. Hohmann, “An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system,” *Curr. Genet.*, V.61, N3, 2015.
65. M. Palma, J. F. Guerreiro, and I. Sá-Correia, “Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A physiological genomics perspective,” *Frontiers in Microbiology*, V.9, NFEB. 2018.
66. В. М. Пахомова, “Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений,” *Цитология*, V.37, N1–2, pp. 66–91, 1995.
67. R. Rawi, C. H. Shen, P. D. Kwong, and G. Y. Chuang, “CRISPro: an automated pipeline for protein conformation stabilization by proline,” *J. Chem. Inf. Model.*, V.58, N11, 2018.
68. S. Wera, E. De Schrijver, I. Geyskens, S. Nwaka, and J. M. Thevelein, “Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biochem. J.*, V.343, N3, 1999.
69. Т. И. Колупаев, Ю.Е., Трунова, “Особенности метаболизма и защитные функции углеводов в условиях стрессов,” *Физиология и биохимия растений*, V.24, N6, pp. 523–533, 1992.
70. K. Igarashi and K. Kashiwagi, “The functional role of polyamines in eukaryotic

cells," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, V.107. 2019.

71. R. Selvam, "Effect of growth substrates on phosphatases of *Aspergillus nidulans* under heat stress.," *Indian J. Exp. Biol.*, V.18, N4, 1980.

72. R. Wieser *et al.*, "Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, V.266, N19, 1991.

73. A. Yamamoto, J. Ueda, N. Yamamoto, N. Hashikawa, and H. Sakurai, "Role of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response," *Eukaryot. Cell*, V.6, N8, 2007.

74. U. e. A. Warraich, F. Hussain, and H. U. R. Kayani, "Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling," *Heliyon*, V.6, N5. 2020.

75. I. Liguori *et al.*, "Oxidative stress, aging, and diseases," *Clinical Interventions in Aging*, V.13. 2018.

76. I. Yakymenko, O. Tsybulin, E. Sidorik, D. Henshel, O. Kyrylenko, and S. Kyrylenko, "Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation," *Electromagnetic Biology and Medicine*, V.35, N2. 2016.

77. A. Campisi *et al.*, "Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field," *Neurosci. Lett.*, V.473, N1, 2010.

78. J. N. Moloney and T. G. Cotter, "ROS signalling in the biology of cancer," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, V.80. 2018.

79. О. В. Плакунов, В.К., Гейдебрехт, О.В., Шелемех, "Множественный стресс у микроорганизмов зло или благо," *Юбилейный сборник к 70-летию института Микробиологии им. С.Н. Виноградского*, pp. 361–375, 2004.

80. E. N. Biryukova, A. G. Medentsev, A. Y. Arinbasarova, and V. K. Akimenko, "Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress," *Microbiology*, V.75, N3, 2006.

81. В. И. Лущак, "Свободно радикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма," *Биохимия*, V.72, N8, pp. 995–1017,

2007.

82. J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, and J. Dichgans, “Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration,” *European Journal of Biochemistry*, V.267, N16. 2000.

83. M. R. Herbert and C. Sage, “Autism and EMF? Plausibility of a pathophysiological link - Part I,” *Pathophysiology*, V.20, N3, 2013.

84. N. Smirnoff, “l-Ascorbic acid biosynthesis,” *Vitamins and Hormones*, V.61. 2001.

85. R. D. Hancock, J. R. Galpin, and R. Viola, “Biosynthesis of *L*-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, V.186, N2, 2000.

86. K. R. Davenport, M. Sohaskey, Y. Kamada, D. E. Levin, and M. C. Gustin, “A second osmosensing signal transduction pathway in yeast: Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway,” *J. Biol. Chem.*, V.270, N50, 1995.

87. F. I. C. Mensonides, S. Brul, F. M. Klis, K. J. Hellingwerf, and M. J. T. De Mattos, “Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation,” *Appl. Environ. Microbiol.*, V.71, N8, 2005.

88. Y. Kamada, Un Sung Jung, J. Piotrowski, and D. E. Levin, “The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response,” *Genes Dev.*, V.9, N13, 1995.

89. F. Posas and H. Saito, “Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK,” *Science (80-.).*, V.276, N5319, 1997.

90. M. Rep *et al.*, “The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage,” *Mol. Microbiol.*, V.40, N5, 2001.

91. J. Albertyn, S. Hohmann, J. M. Thevelein, and B. A. Prior, “GPD1, which

encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway.," *Mol. Cell. Biol.*, V.14, N6, 1994.

92. A. Blomberg and L. Adler, "Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.," *J. Bacteriol.*, V.171, N2, 1989.

93. D. Sorger and G. Daum, "Triacylglycerol biosynthesis in yeast," *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.61, N4. 2003.

94. S. Hohmann, M. Krantz, and B. Nordlander, "Yeast osmoregulation," in *Methods in Enzymology*, V.428, 2007.

95. F. Posas, M. Takekawa, and H. Saito, "Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast," *Curr. Opin. Microbiol.*, V.1, N2, 1998.

96. S. H. Loukin, C. Kung, and Y. Saimi, " Lipid perturbations sensitize osmotic down-shock activated Ca 2+ influx, a yeast 'deletome' analysis ," *FASEB J.*, V.21, N8, 2007.

97. A. F. Batiza, T. Schulz, and P. H. Masson, "Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse," *J. Biol. Chem.*, V.271, N38, 1996.

98. R. M. De Lucena, C. Elsztein, D. A. Simões, and M. A. De Morais, "Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid," *J. Appl. Microbiol.*, V.113, N3, 2012.

99. M. Kawahata, K. Masaki, T. Fujii, and H. Iefuji, "Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: Acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p," *FEMS Yeast Res.*, V.6, N6, 2006.

100. M. P. Collins and M. Forgac, "Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, V.1862, N12. 2020.

101. P. M. Kane, "Proton transport and pH control in fungi," 2016.

102. I. Hardewig, U. Kreutzer, H. O. Pörtner, and M. K. Grieshaber, "The role of

phosphofructokinase in glycolytic control in the facultative anaerobe *Sipunculus nudus*," *J. Comp. Physiol. B*, V.161, N6, 1991.

103. J. Ding *et al.*, "Acetic acid inhibits nutrient uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Auxotrophy confounds the use of yeast deletion libraries for strain improvement," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V.97, N16, 2013.

104. N. P. Mira, M. C. Teixeira, and I. Sá-Correia, "Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A genome-wide view," *OMICS A Journal of Integrative Biology*, V.14, N5. 2010.

105. N. R. Johnston, S. Nallur, P. B. Gordon, K. D. Smith, and S. A. Strobel, "Genome-wide identification of genes involved in general acid stress and fluoride toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*," *Front. Microbiol.*, V.11, 2020.

106. T. Suzuki, M. Sugiyama, K. Wakazono, Y. Kaneko, and S. Harashima, "Lactic-acid stress causes vacuolar fragmentation and impairs intracellular amino-acid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biosci. Bioeng.*, V.113, N4, 2012.

107. C. L. Lawrence, C. H. Botting, R. Antrobus, and P. J. Coote, "Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase pathway in yeast: Regulating adaptation to citric acid stress," *Mol. Cell. Biol.*, V.24, N8, 2004.

108. C. Jia *et al.*, "Roles of VPH2 and VMA6 in localization of V-ATPase subunits, cell wall functions and filamentous development in *Candida albicans*," *Fungal Genet. Biol.*, V.114, 2018.

109. C. A. Munro *et al.*, "The PKC, HOG and Ca2+ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*," *Mol. Microbiol.*, V.63, N5, 2007.

110. J. J. Heinisch and R. Rodicio, "Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity," *FEMS Microbiology Reviews*, V.42, N1. 2018.

111. A. Serra-Cardona, D. Canadell, and J. Ariño, "Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast," *Microbial Cell*, V.2, N6. 2015.

112. J. C. Harrison, T. R. Zyla, E. S. G. Bardes, and D. J. Lew, "Stress-specific Activation Mechanisms for the 'Cell Integrity' MAPK Pathway," *J. Biol. Chem.*,

V.279, N4, 2004.

113. H. Martin *et al.*, " Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways ," *Mol. Syst. Biol.*, V.11, N4, 2015.

114. J. Naarala, A. Höytö, and A. Markkanen, "Cellular effects of electromagnetic fields," in *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 2004, V.32, N4.

115. R. D. Montoya, "Magnetic fields, radicals and cellular activity," *Electromagn. Biol. Med.*, V.8378, NAugust, 2016.

116. M. Blank and R. Goodman, "DNA is a fractal antenna in electromagnetic fields," *Int. J. Radiat. Biol.*, V.87, N4, 2011.

117. R. Goodman and M. Blank, "Insights into electromagnetic interaction mechanisms," *Journal of Cellular Physiology*, V.192, N1. 2002.

118. S. I. Voĭchuk, "*Saccharomyces cerevisiae* as a model organism for studying the carcinogenicity of non-ionizing electromagnetic fields and radiation," *Mikrobiol. Z.*, V.76, N1, 2014.

119. I. Gorpinchenko, O. Nikitin, O. Banyra, and A. Shulyak, "The influence of direct mobile phone radiation on sperm quality," *Cent. Eur. J. Urol.*, V.67, N1, 2014.

120. M. Akdag, S. Dasdag, F. Canturk, and M. Z. Akdag, "Exposure to non-ionizing electromagnetic fields emitted from mobile phones induced DNA damage in human ear canal hair follicle cells," *Electromagn. Biol. Med.*, V.37, N2, 2018.

121. A. Zalata, A. Z. El-Samanoudy, D. Shaalan, Y. El-Baiomy, and T. Mostafa, "*In vitro* effect of cell phone radiation on motility, DNA fragmentation and Clusterin gene expression in human sperm," *Int. J. Fertil. Steril.*, V.9, N1, 2015.

122. K. Megha, P. S. Deshmukh, B. D. Banerjee, A. K. Tripathi, R. Ahmed, and M. P. Abegaonkar, "Low intensity microwave radiation induced oxidative stress, inflammatory response and DNA damage in rat brain," *Neurotoxicology*, V.51, 2015.

123. P. S. Deshmukh *et al.*, "Cognitive impairment and neurogenotoxic effects in rats exposed to low-intensity microwave radiation," *Int. J. Toxicol.*, V.34, N3, 2015.

124. M. E. Alkis *et al.*, “Effect of 900-, 1800-, and 2100-MHz radiofrequency radiation on DNA and oxidative stress in brain,” *Electromagn. Biol. Med.*, V.38, N1, 2019.

125. S. T. Qureshi, S. A. Memon, A. R. Abassi, M. A. Sial, and F. A. Bughio, “Radiofrequency radiations induced genotoxic and carcinogenic effects on chickpea (*Cicer arietinum* L.) root tip cells,” *Saudi J. Biol. Sci.*, V.24, N4, 2017.

126. W. J. Zhi, L. F. Wang, and X. J. Hu, “Recent advances in the effects of microwave radiation on brains,” *Military Medical Research*, V.4, N1. 2017.

127. K. K. Kesari, S. Kumar, J. Nirala, M. H. Siddiqui, and J. Behari, “Biophysical evaluation of radiofrequency electromagnetic field effects on male reproductive pattern,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, V.65, N2. 2013.

128. M. L. Pall, “Scientific evidence contradicts findings and assumptions of Canadian Safety Panel 6: Microwaves act through voltage-gated calcium channel activation to induce biological impacts at non-thermal levels, supporting a paradigm shift for microwave/lower frequency electromagnetic field action,” *Rev. Environ. Health*, V.30, N2, 2015.

129. D. Belpomme, L. Hardell, I. Belyaev, E. Burgio, and D. O. Carpenter, “Thermal and non-thermal health effects of low intensity non-ionizing radiation: An international perspective,” *Environmental Pollution*, V.242. 2018.

130. A. Burlaka *et al.*, “Overproduction of free radical species in embryonal cells exposed to low intensity radiofrequency radiation,” *Exp. Oncol.*, V.35, N3, 2013.

131. S. Velizarov, “Electric and magnetic fields in microbial biotechnology: possibilities, limitations, and perspectives,” *Electromagnetic Biology and Medicine*, V.18, N2. 1999.

132. M. Spanu *et al.*, “Microwaves disinfection of farmland,” *J. Electromagn. Waves Appl.*, V.30, N16, 2016.

133. R. H. W. Funk and T. K. Monsees, “Effects of electromagnetic fields on cells: Physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review,” *Cells Tissues Organs*, V.182, N2. 2006.

134. E. N. Gromozova and S. I. Voychuk, “Influence of radiofrequency EMF on the

yeast *Sacharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system," in *Biophotonics and Coherent Systems in Biology*, 2007.

135. A. G. Levis, V. Gennaro, and S. Garbisa, "Business bias as usuall: The case of electromagnetic pollution," in *Social Costs Today: Institutional Analyses of the Present Crises*, 2012.

136. I. Belyaev *et al.*, "EUROPAEM EMF Guideline 2016 for the prevention, diagnosis and treatment of EMF-related health problems and illnesses," *Rev. Environ. Health*, V.31, N3, 2016.

137. L. Hardell, "World health organization, radiofrequency radiation and health - A hard nut to crack (Review)," *Int. J. Oncol.*, V.51, N2, 2017.

138. M. H. Repacholi, "International EMF project," in *Radio Frequency Radiation Dosimetry and Its Relationship to the Biological Effects of Electromagnetic Fields*, 2000.

139. A. Ahlbom, E. Cardis, A. Green, M. Linet, D. Savitz, and A. Swerdlow, "Review of the epidemiologic literature on EMF and health," *Environmental Health Perspectives*, V.109, NSUPPL. 6. 2001.

140. P. Wust *et al.*, "Non-thermal effects of radiofrequency electromagnetic fields," *Sci. Rep.*, V.10, N1, 2020.

141. V. Vojisavljevic, E. Pirogova, and I. Cosic, "Investigation of the mechanisms of electromagnetic field interaction with proteins," in *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings*, 2005, V.7 VOLS.

142. M. Y. Amusia and M. Y. Amusia, "The structure of the atom and its interaction with an electromagnetic field," in *Atomic Photoeffect*, 1990.

143. D. A. Savitz, "Overview of evidence and research needs concerning electromagnetic fields and health," in *Environmental Epidemiology*, 2020.

144. W. Grundler, F. Kaiser, F. Keilmann, and J. Walleczek, "Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems," *Naturwissenschaften*, V.79, N12, 1992.

145. M. Blank and L. Soo, "Electromagnetic acceleration of the Belousov-

Zhabotinski reaction," *Bioelectrochemistry*, V.61, N1–2, pp. 93–97, 2003.

146. S. A. Reshetnyak, V. A. Shcheglov, V. I. Blagodatskikh, P. P. Gariaev, and M. Y. Maslov, "Mechanisms of interaction of electromagnetic radiation with a biosystem," *Laser Phys.*, V.6, N4, 1996.

147. M. R. Scarfi, M. O. Mattsson, M. Simkó, and O. Zeni, "Special issue: 'electric, magnetic, and electromagnetic fields in biology and medicine: From mechanisms to biomedical applications,'" *International Journal of Environmental Research and Public Health*, V.16, N22. 2019.

148. L. Giuliani and M. Soffritti, *Non-thermal Effects and Mechanisms of Interaction Between Electromagnetic Fields and Living Matter*, V.5. 2010.

149. M. Zmyślon, "Biophysical mechanisms of electromagnetic fields interaction and health effects..," *Med. Pr.*, V.57, N1, 2006.

150. C. Sage, "The implications of non-linear biological oscillations on human electrophysiology for electrohypersensitivity (EHS) and multiple chemical sensitivity (MCS)," *Reviews on Environmental Health*, V.30, N4. 2015.

151. M. Gaestel, "Biological monitoring of non-thermal effects of mobile phone radiation: Recent approaches and challenges," *Biol. Rev.*, V.85, N3, 2010.

152. M. L. Pall, "Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric effects including depression," *Journal of Chemical Neuroanatomy*, V.75. 2016.

153. W. Klonowski, "Non-thermal effects of electromagnetic fields in biology and medicine," in *IFMBE Proceedings*, 2017, V.65.

154. S. Jankovic, M. Milosev, and M. Novakovic, "The effects of microwave radiation on microbial cultures," *Hosp. Pharmacol. - Int. Multidiscip. J.*, V.1, N2, 2014.

155. M. Markov, "Thermal vs. nonthermal mechanisms of interactions between electromagnetic fields and biological systems," in *Bioelectromagnetics Current Concepts*, Springer Netherlands, 2006, pp. 1–15.

156. H. Ramaswamy and J. Tang, "Microwave and radio frequency heating," *Food Sci. Technol. Int.*, V.14, N5, 2008.

157. D. J. Panagopoulos and L. H. Margaritis, “The identification of an intensity ‘window’ on the bioeffects of mobile telephony radiation,” *Int. J. Radiat. Biol.*, V.86, N5, 2010.

158. Маринченко, Л.В., Ніжельська, О.І., Маринченко, В.О., “Стимуляція накопичення біомаси та бродильної активності культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою надвисокочастотного електромагнітного випромінювання,” *Наукові вісті НТУУ “КПІ,”* V.3, pp. 68–73, 2011.

159. M. S. Markov, “‘Biological windows’: A tribute to W. Ross Adey,” in *Environmentalist*, 2005, V.25, N2-4 SPEC. ISS.

160. S. Franzellitti *et al.*, “Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, V.683, N1–2, 2010.

161. A. Yadollahpour, M. Jalilifar, and S. Rashidi, “Antimicrobial effects of electromagnetic fields: A review of current techniques and mechanisms of action,” *J. Pure Appl. Microbiol.*, V.8, N5, 2014.

162. P. GIRI, “Evaluation of bioprospective potentialities of hyllosphere Microbial diversity and effect of electromagnetic irradiation stress on their survival – a review.,” *Int. J. Pharma Bio Sci.*, V.8, N3, 2017.

163. C. Piyadasa *et al.*, “Antimicrobial effects of pulsed electromagnetic fields from commercially available water treatment devices – controlled studies under static and flow conditions,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, V.93, N3, 2018.

164. M. M. Movahedi, F. Nouri, A. Tavakoli Golpaygani, L. Ataee, S. Amani, and M. Taheri, “Antibacterial susceptibility pattern of the pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus after exposure to electromagnetic waves emitted from mobile phone simulator,” *J. Biomed. Phys. Eng.*, V.9, N6, 2019.

165. M. Brailo *et al.*, “The influence of electromagnetic field on viability of marine microalgae *Tetraselmis suecica* and bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*,” *Nase More*, V.65, N2, 2018.

166. R. B. Steffen, G. P. K. Steffen, and J. Maldaner, “*In vitro* activation of microbial growth in low frequency electromagnetic fields,” *J. Agric. Environ. Sci.*, V.9, N1, 2020.

167. W. Sang *et al.*, “Achieving enhanced biological nitrogen removal via 2450 MHz electromagnetic wave loading on returned sludge in anaerobic-anoxic-oxic process,” *Water Sci. Technol.*, V.82, N2, 2020.

168. N. Benyoucef, A. Pauss, N. Abdi, C. O. Sarde, H. Grib, and N. Mameri, “Enhancement of the denitrification performance of an activated sludge using an electromagnetic field in batch mode,” *Chemosphere*, V.262, 2021.

169. L. Fojt, L. Strašák, and V. Vetterl, “Effect of electromagnetic fields on the denitrification activity of *Paracoccus denitrificans*,” *Bioelectrochemistry*, V.70, N1, pp. 91–95, Jan. 2007.

170. В. А. Якунов, А.В., Нижельская, А.И., Маринченко, Л.В., Маринченко, В.А., Макара, “Влияние обработки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* миллиметровыми волнами на показатели сбраживания в технологии производства биоэтанола,” *Электронная обработка материалов*, V.51, N2, pp. 55–60, 2015.

171. S. Oncul, E. M. Cuce, B. Aksu, and A. Inhan Garip, “Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on bacterial membrane,” *Int. J. Radiat. Biol.*, V.92, N1, 2016.

172. X. Feng, M. Zhu, J. Xu, W. Yin, and F. Hu, “Analysis of factors influencing the transmembrane voltage induced in filamentous fungi by pulsed electric fields,” *Microorganisms*, V.7, N9, 2019.

173. M. V. Trushin, “The possible role of electromagnetic fields in bacterial communication,” *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, V.36, N3. 2003.

174. H. Gu, S. W. Lee, J. Carnicelli, T. Zhang, and D. Ren, “Magnetically driven active topography for long-term biofilm control,” *Nat. Commun.*, V.11, N1, 2020.

175. Y. Xiao *et al.*, “Electromagnetic fields for biofouling mitigation in reclaimed water distribution systems,” *Water Res.*, V.173, 2020.

176. M. Gérard, O. Noamen, G. Evelyne, V. Eric, C. Gilles, and H. Marc, “Hydraulic continuity and biological effects of low strength very low frequency electromagnetic waves: Case of microbial biofilm growth in water treatment,” *Water Res.*, V.83, 2015.

177. M. J. Ruiz-Gómez, F. Sendra-Portero, and M. Martínez-Morillo, “Effect of 2.45 mT sinusoidal 50Hz magnetic field on *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in DNA strand breaks repair,” *Int. J. Radiat. Biol.*, V.86, N7, 2010.

178. I. Vrhovac, R. Hrascan, and J. Franekic, “Effect of 905 MHz microwave radiation on colony growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains FF18733, FF1481 and D7,” *Radiol. Oncol.*, V.44, N2, 2010.

179. S. I. I. Voichuk, V. S. S. Podgorskii, and E. N. N. Gromozova, “Effect of radio-frequency electromagnetic radiation on physiological features of *Saccharomyces cerevisiae* strain UCM Y-517,” *Mikrobiol. Z.*, V.66, N3, 2004.

180. V. A. Gusev and D. Schulze-Makuch, “Low frequency electromagnetic waves as a supplemental energy source to sustain microbial growth?,” *Naturwissenschaften*, V.92, N3, 2005.

181. V. S. Podgorskii, S. I. Voichuk, E. N. Gromozova, and A. S. Gordienko, “Protective action of electromagnetic radiation (40.68 MHz) on *Saccharomyces cerevisiae* UCM Y-517,” *Mikrobiol. Z.*, V.66, N5, 2004.

182. A. Markkanen, J. Juutilainen, S. Lang, J. Pelkonen, T. Rytömaa, and J. Naarala, “Effects of 50 Hz magnetic field on cell cycle kinetics and the colony forming ability of budding yeast exposed to ultraviolet radiation,” *Bioelectromagnetics*, V.22, N5, 2001.

183. M. J. Ruiz-Gómez and M. Martínez-Morillo, “Electromagnetic fields and the induction of DNA strand breaks,” *Electromagn. Biol. Med.*, V.28, N2, 2009.

184. D. Crouzier, A. Perrin, G. Torres, V. Dabouis, and J. C. Debouzy, “Pulsed electromagnetic field at 9.71 GHz increase free radical production in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*),” *Pathol. Biol.*, V.57, N3, 2009.

185. F. I. Wolf *et al.*, “50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: Possible involvement of a redox

mechanism," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, V.1743, N1–2, 2005.

186. M. Simko, "Cell Type Specific Redox Status is Responsible for Diverse Electromagnetic Field Effects," *Curr. Med. Chem.*, V.14, N10, 2007.

187. J. Vanderstraeten and L. Verschaeve, "Gene and protein expression following exposure to radiofrequency fields from mobile phones," *Environ. Health Perspect.*, V.116, N9, 2008.

188. C. Consales, C. Merla, C. Marino, and B. Benassi, "Electromagnetic fields, oxidative stress, and neurodegeneration," *International Journal of Cell Biology*. 2012.

189. J. Novák, L. Strašák, L. Fojt, I. Slaninová, and V. Vetterl, "Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Bioelectrochemistry*, V.70, N1, 2007.

190. S. Hadjiloucas, M. S. Chahal, and J. W. Bowen, "Preliminary results on the non-thermal effects of 200-350 GHz radiation on the growth rate of *S. cerevisiae* cells in micocolonies," *Phys. Med. Biol.*, V.47, N21, 2002.

191. P. Gos, B. Eicher, J. Kohli, and W. D. Heyer, "Extremely high frequency electromagnetic fields at low power density do not affect the division of exponential phase *Saccharomyces cerevisiae* cells," *Bioelectromagnetics*, V.18, N2, 1997.

192. K. Rass and J. Reichrath, "UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, V.624. 2008.

193. Y. Takashima, M. Ikehata, J. Miyakoshi, and T. Koana, "Inhibition of UV-induced G1 arrest by exposure to 50 Hz magnetic fields in repair-proficient and -deficient yeast strains," *Int. J. Radiat. Biol.*, V.79, N11, 2003.

194. G. Chen, D. Lu, H. Chiang, D. Leszczynski, and Z. Xu, "Using model organism *Saccharomyces cerevisiae* to evaluate the effects of ELF-MF and RF-EMF exposure on global gene expression," *Bioelectromagnetics*, V.33, N7, 2012.

195. R. W. Hunt, A. Zavalin, A. Bhatnagar, S. Chinnasamy, and K. C. Das, "Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and

bioenergy applications," in *Advances in Biofuel Production: Algae and Aquatic Plants*, 2016.

196. R. W. Hunt, A. Zavalin, A. Bhatnagar, S. Chinnasamy, and K. C. Das, "Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications," *International Journal of Molecular Sciences*, V.10, N10. 2009.

197. P. Mohtasham, E. Keshavarz-Moore, I. Kale, and T. Keshavarz, "Application of magnetic field for improvement of microbial productivity," *Chem. Eng. Trans.*, V.49, 2016.

198. S. REVISTAS, O. Zuñiga, C. Jiménez, J. Benavides, and C. Torres González, "Effect of electromagnetic fields on microbial activity of a bio-fertilizer," *Rev. Ciencias*, V.20, N1, 2018.

199. М. И. Гамаюрова, В.С., Крыницкая, А.Ю., Астраханцева, "Влияние ЭМИ КВЧ нетепловой интенсивности на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*," *Биомедцинские технологии и радиоэлектроника*, V.1–2, pp. 117–120, 2004.

200. A. Fanti, S. Casu, F. Desogus, N. Djuric, and G. Mazzarella, "Design and optimization of a microwave irradiated and resonant continuous biochemical reactor," *Radio Sci.*, V.51, N7, 2016.

201. C. Guo, Y. Wang, and D. Luan, "Non-thermal effects of microwave processing on inactivation of Clostridium Sporogenes inoculated in salmon fillets," *LWT*, V.133, 2020.

202. O. M. SOBOLEVA, M. M. KOLOSOVA, and L. A. FILIPOVICH, "Electromagnetic Field of Super High Frequency as a Method for Controling Microbial Exchange of Poultry Feed," 2020.

203. T. Ananyeva and V. Ostroukhova, "Improvement of methods of the influence on microbiological indicators of raw milk," *Gl. Zooteh. (Head Anim. Breeding)*, N5, 2020.

204. T. V. Pershakova, G. A. Kupin, L. V. Mikhaylyuta, E. S. Yatsushko, S. M. Gorlov, and T. G. Prichko, "Strawberry treatment with low frequency electromagnetic fields," *Int. J. Emerg. Trends Eng. Res.*, V.8, N3, 2020.

205. V. V. Lisovoy, T. V. Pershakova, E. P. Victorova, G. A. Kupin, V. N. Aleshin, and L. V. Mikhaylyuta, “RESEARCH OF ELECTROMAGNETIC FIELDS INFLUENCE ON CHANGES OF MICROBIAL CONTAMINATION OF THE SURFACE OF FRUITS DURING STORAGE,” *Polythematic Online Sci. J. Kuban State Agrar. Univ.*, 2017.

206. “Influence of a Low Frequency Electromagnetic field in the Microbial Flora of a Mango Nectar,” *Tecnol. Química*, V.36, N3, 2016.

207. W. J. Sang, D. Li, Y. J. Feng, Y. Y. Feng, W. J. Zhang, and Q. Xu, “Effect on function of anaerobic tank in A2O system with electromagnetic wave loading on returned sludge,” *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environ. Sci.*, V.39, N7, 2019.

208. S. M. Janković, M. Z. Milošev, and M. L. Novaković, “Specialist in general surgery; subspecialist in clinical pharmacology The effects of microwave radiation on microbial cultures,” *Hosp. Pharmacol.*, V.1, N2, 2014.

209. H. Yumoto *et al.*, “Bactericidal activity and oral pathogen inactivation by electromagnetic wave irradiation,” *J. Appl. Microbiol.*, V.113, N1, 2012.

210. F. Desogus *et al.*, “Use of microwaves for disinfection of farmland: A feasibility study,” *Chem. Eng. Trans.*, V.52, 2016.

211. M. Guida *et al.*, “*Pseudomonas aeruginosa* in swimming pool water: Evidences and perspectives for a new control strategy,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, V.13, N9, 2016.

212. K.W. Boumarah *et al*. “The effect of microwave radiation on the growth of *Staphylococcus aureus*,” *Int. J. Sci. Res.*, V.5, N5, 2016.

213. В. М. Баран, Б.А., Бубенщикова, Г.Т., Рокицька, В.Й., Хрящевський, “Дія магнітного та електричного полів на процес бродіння,” *Вісник ХНУ*, V.1, pp. 151–153, 2009.

214. T. A. Ignatyeva, “Perspectives of constant gradient magnetic fields applications in biotechnology,” *Am. J. Biosci. Bioeng.*, V.2, N6, 2014.

215. H. L. A. Miñano, A. C. de Sousa Silva, S. Souto, and E. J. X. Costa, “Magnetic fields in food processing perspectives, applications and action models,” *Processes*, V.8, N7. 2020.

216. D. Poljak and M. Cvetković, “Biomedical applications of electromagnetic fields,” in *Human Interaction with Electromagnetic Fields*, 2019.

217. C. Hilton, D. Markie, B. Corner, E. Rikkerink, and R. Poulter, “Heat shock induces chromosome loss in the yeast *Candida albicans*,” *MGG Mol. Gen. Genet.*, V.200, N1, 1985.

218. C. L. Limoli *et al.*, “Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity,” *Cancer Res.*, V.58, N16, 1998.

219. S. M. Jazwinski, “Aging and longevity genes,” *Acta Biochim. Pol.*, V.47, N2, 2000.

220. A. G. Nikitin and R. J. Shmookler Reis, “Role of transposable elements in age-related genomic instability,” *Genetical Research*, V.69, N3. 1997.

221. Á. Sturm, Z. Ivics, and T. Vellai, “The mechanism of ageing: Primary role of transposable elements in genome disintegration,” *Cell. Mol. Life Sci.*, V.72, N10, 2015.

222. T. J. Chalmers and L. E. Wu, “Transposable elements cross kingdom boundaries and contribute to inflammation and ageing: Somatic acquisition of foreign transposable elements as a catalyst of genome instability, epigenetic dysregulation, inflammation, senescence, and ageing,” *BioEssays*, V.42, N3, Mar. 2020.

223. H. Harbottle, S. Thakur, S. Zhao, and D. G. White, “Genetics of antimicrobial resistance,” *Anim. Biotechnol.*, V.17, N2, 2006.

224. L. Sun, P. Ashcroft, M. Ackermann, and S. Bonhoeffer, “Stochastic gene expression influences the selection of antibiotic resistance mutations,” *Mol. Biol. Evol.*, V.37, N1, 2020.

225. H. J. Hong, M. I. Hutchings, J. M. Neu, G. D. Wright, M. S. B. Paget, and M. J. Buttner, “Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (vanK) required for drug resistance,” *Mol. Microbiol.*, V.52, N4, 2004.

226. S. E. Van Mulders *et al.*, “Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated

adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res.*, V.9, N2, 2009.

227. A. Aviv and H. Aviv, "Telomeres, hidden mosaicism, loss of heterozygosity, and complex genetic traits," *Hum. Genet.*, V.103, N1, 1998.

228. H. L. Klein *et al.*, "Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways," *Microbial Cell*, V.6, N1. 2019.

229. Н. М. Корогодин, В.И., Близник, К.М., Капульцевич, Ю.Г., Петин, В.Г., Кабакова, "Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 3. Количественные закономерности лучевого расообразования у диплоидных дрожжей.," *Радиобиология*, V.12, N6, pp. 857–863, 1972.

230. А. М. Оловников, "О роли неполной репарации конца хромосомной ДНК в старении нейронов и постмитотических организмов," *Изв. РАН. Сер. биол.*, N4, pp. 504–507, 1995.

231. B. Beauvoit, M. Rigoulet, B. Guerin, and P. Canioni, "Polyphosphates as a source of high energy phosphates in yeast mitochondria: A 31P NMR study," *FEBS Lett.*, V.252, N1–2, 1989.

232. J. M. Mouillon and B. L. Persson, "New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Research*, V.6, N2. 2006.

233. L. Achbergerová and J. Nahálka, "Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator," *Microbial Cell Factories*, V.10. 2011.

234. A. Kornberg, N. N. Rao, and D. Ault-Riché, "Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions," *Annual Review of Biochemistry*, V.68. 1999.

235. A. P. Oliveira, C. Ludwig, P. Picotti, M. Kogadeeva, R. Aebersold, and U. Sauer, "Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation," *Mol. Syst. Biol.*, V.8, 2012.

236. C. Azevedo and A. Saiardi, "Functions of inorganic polyphosphates in eukaryotic cells: A coat of many colours," *Biochem. Soc. Trans.*, V.42, N1, 2014.

237. A. Y. Abramov *et al.*, "Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, V.104, N46, 2007.

238. D. Morimoto *et al.*, "Inorganic polyphosphate differentiates human

mesenchymal stem cells into osteoblastic cells," *J. Bone Miner. Metab.*, V.28, N4, 2010.

239. S. A. Smith and J. H. Morrissey, "Polyphosphate: A new player in the field of hemostasis," *Curr. Opin. Hematol.*, V.21, N5, 2014.

240. S. C. Stotz *et al.*, "Inorganic polyphosphate regulates neuronal excitability through modulation of voltage-gated channels," *Mol. Brain*, V.7, N1, 2014.

241. X. Wang, H. C. Schröder, Q. Feng, B. Diehl-Seifert, V. A. Grebenjuk, and W. E. G. Müller, "Isoquercitrin and polyphosphate co-enhance mineralization of human osteoblast-like SaOS-2 cells via separate activation of two RUNX2 cofactors AFT6 and Ets1," *Biochem. Pharmacol.*, V.89, N3, 2014.

242. T. Kulakovskaya, E. Pavlov, and E. N. Dedkova, *Inorganic polyphosphates in eukaryotic cells*. 2016.

243. P. C. Hsieh, B. C. Shenoy, J. E. Jentoft, and N. F. B. Phillips, "Purification of polyphosphate and atp glucose phosphotransferase from mycobacterium tuberculosis h37ra: Evidence that poly(p) and atp glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme," *Protein Expr. Purif.*, V.4, N1, 1993.

244. I. S. Kulaev, V. M. Vagabov, and T. V. Kulakovskaya, *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates: Second Edition*. 2005.

245. A. Kuroda *et al.*, "Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*," *Science (80-.).*, V.293, N5530, 2001.

246. T. Albi and A. Serrano, "Two exopolyphosphatases with distinct molecular architectures and substrate specificities from the thermophilic green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* TLS," *Microbiol. (United Kingdom)*, V.160, NPART 9, 2014.

247. K. Motomura, R. Hirota, M. Okada, T. Ikeda, T. Ishida, and A. Kuroda, "A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (Class III PPK2) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation," *Appl. Environ. Microbiol.*, V.80, N8, 2014.

248. L. P. Lichko, T. V. Kulakovskaya, and I. S. Kulaev, "Inorganic polyphosphate

and exopolyphosphatase in the nuclei of *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on the growth phase and inactivation of the PPX1 and PPN1 genes," *Yeast*, V.23, N10, 2006.

249. A. Lonetti, Z. Szijgyarto, D. Bosch, O. Loss, C. Azevedo, and A. Saiardi, "Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases," *J. Biol. Chem.*, V.286, N37, 2011.

250. D. Secco, C. Wang, H. Shou, and J. Whelan, "Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins," *FEBS Letters*, V.586, N4. 2012.

251. M. H. Rashid *et al.*, "Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, V.97, N17, 2000.

252. N. Andreeva, L. Trilisenko, M. Eldarov, and T. Kulakovskaya, "Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: Switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities," *PLoS One*, V.10, N3, 2015.

253. M. J. Gray and U. Jakob, "Oxidative stress protection by polyphosphate-new roles for an old player," *Current Opinion in Microbiology*, V.24. 2015.

254. M. Hothorn *et al.*, "Catalytic core of amembrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase," *Science (80-.).*, V.324, N5926, 2009.

255. T. V. Kulakovskaya, N. A. Andreeva, and I. S. Kulaev, "Adenosine-5′-tetraphosphate and guanosine-5′-tetraphosphate: new substrates of the cytosolic exopolyphosphatase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem.*, V.62, N9, 1997.

256. N. A. Andreeva, T. V. Kulakovskaya, and I. S. Kulaev, "High molecular mass exopolyphosphatase from the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PPN1 gene," *Biochem.*, V.71, N9, 2006.

257. L. Lichko and T. Kulakovskaya, "Polyphosphatase PPX1 of *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for polyphosphate assay," *Adv. Enzym. Res.*, V.03, N04, 2015.

258. L. Lichko, T. Kulakovskaya, N. Pestov, and I. Kulaev, "Inorganic

polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes," *Biosci. Rep.*, V.26, N1, 2006.

259. A. Sethuraman, N. N. Rao, and A. Kornberg, "The endopolyphosphatase gene: Essential in *Saccharomyces cerevisiae*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, V.98, N15, 2001.

260. S. Yamada, S. Shiono, A. Joo, and A. Yoshimura, "Control mechanism of JAK/STAT signal transduction pathway," *FEBS Lett.*, V.534, N1–3, 2003.

261. P. Orlean, "Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall," *Genetics*, V.192, N3. 2012.

262. D. E. Levin, "Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway," *Genetics*, V.189, N4, 2011.

263. J. G. De Nobel and J. A. Barnett, "Passage of molecules through yeast cell walls: A brief essay-review," *Yeast*, V.7, N4, 1991.

264. E. Cabib, "Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both *β*(1-6)- and *β*(1-3)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall," *Eukaryot. Cell*, V.8, N11, p. Two novel techniques for determination of polysacc, 2009.

265. F. M. Klis, P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul, " Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* ," *FEMS Microbiol. Rev.*, V.26, N3, 2002.

266. M. H. Valdivieso, L. Ferrario, M. Vai, A. Duran, and L. Popolo, "Chitin synthesis in a gas1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Bacteriol.*, V.182, N17, 2000.

267. F. M. Klis, A. Boorsma, and P. W. J. De Groot, "Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, V.23, N3. 2006.

268. P. Orlean and A. K. Menon, " Thematic review series: Lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycophospholipids ," *J. Lipid Res.*, V.48, N5, 2007.

269. L. Lichko, T. Kulakovskaya, and I. Kulaev, "Effect of PPX1 inactivation on

exopolyphosphatases of different cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, V.1599, N1–2, 2002.

270. S. A. Hossain, S. R. Rahman, T. Ahmed, and C. Mandal, "An overview of yeast cell wall proteins and their contribution in yeast display system," *Asian J. Med. Biol. Res.*, V.5, N4, 2020.

271. M. Pittet and A. Conzelmann, "Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, V.1771, N3. 2007.

272. P. Neubert *et al.*, "Mapping the O-Mannose glycoproteome in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Proteomics*, V.15, N4, 2016.

273. P. Neubert and S. Strahl, "Protein O-mannosylation in the early secretory pathway," *Current Opinion in Cell Biology*, V.41. 2016.

274. M. J. Neves and J. Francois, "On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. J.*, V.288, N3, 1992.

275. T. Hottiger, C. De Virgilio, M. N. Hall, T. Boller, and A. Wiemken, "The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*," *Eur. J. Biochem.*, V.219, N1–2, 1994.

276. M. A. Singer and S. Lindquist, "Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*," *Mol. Cell*, V.1, N5, 1998.

277. M. A. Singer and S. Lindquist, "Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin and Yang of trehalose," *Trends in Biotechnology*, V.16, N11. 1998.

278. T. Ketela, R. Green, and H. Bussey, "*Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway," *J. Bacteriol.*, V.181, N11, 1999.

279. H. Martín, J. M. Rodríguez-Pachón, C. Ruiz, C. Nombela, and M. Molina, "Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, V.275, N2, 2000.

280. M. Rajavel, B. Philip, B. M. Buehrer, B. Errede, and D. E. Levin, "Mid2 Is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol.*, V.19, N6, 1999.

281. M. Inagaki, T. Schmelzle, K. Yamaguchi, K. Irie, M. N. Hall, and K. Matsumoto, "PDK1 homologs activate the Pkc1–Mitogen-Activated Protein Kinase pathway in yeast," *Mol. Cell. Biol.*, V.19, N12, 1999.

282. T. J. Cohen, K. Lee, L. H. Rutkowski, and R. Strich, "Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p," *Eukaryot. Cell*, V.2, N5, 2003.

283. B. Krems, C. Charizanis, and K. D. Entian, "The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance," *Curr. Genet.*, V.29, N4, 1996.

284. B. A. Morgan, G. R. Banks, W. Mark Toone, D. Raitt, S. Kuge, and L. H. Johnston, "The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO J.*, V.16, N5, 1997.

285. N. Pagé, J. Sheraton, J. L. Brown, R. C. Stewart, and H. Bussey, "Identification of ASK10 as a multicopy activator of Skn7p-dependent transcription of a HIS3 reporter gene," *Yeast*, V.12, N3, 1996.

286. K. K. Singh, "The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion," *Free Radic. Biol. Med.*, V.29, N10, 2000.

287. J. C. Kapteyn *et al.*, "Low external ph induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall," *Mol. Microbiol.*, V.39, N2, 2001.

288. T. M. Lamb, W. Xu, A. Diamond, and A. P. Mitchell, "Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway," *J. Biol. Chem.*, V.276, N3, 2001.

289. O. Protchenko *et al.*, "Three Cell Wall Mannoproteins Facilitate the Uptake of Iron in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, V.276, N52, 2001.

290. K. S. Lee, L. K. Hines, and D. E. Levin, “A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway.,” *Mol. Cell. Biol.*, V.13, N9, 1993.

291. F. Posas, A. Casamayor, and J. Ariño, “The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells,” *FEBS Lett.*, V.318, N3, 1993.

292. S. Merchan, D. Bernal, R. Serrano, and L. Yenush, “Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases,” *Eukaryot. Cell*, V.3, N1, 2004.

293. P. A. Delley and M. N. Hall, “Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1,” *J. Cell Biol.*, V.147, N1, 1999.

294. P. D. Andrews and M. J. R. Stark, “Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth,” *J. Cell Sci.*, V.113, N15, 2000.

295. A. Audhya *et al.*, “Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton,” *EMBO J.*, V.23, N19, 2004.

296. R. H. Valdivia and R. Schekman, “The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, V.100, N18, 2003.

297. A. Toulmay and R. Schneiter, “Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: A model to study plasma membrane biogenesis in yeast,” *Biochimie*, V.89, N2, 2007.

298. V. V. Rekstina, A. A. Bykova, R. H. Ziganshin, and T. S. Kalebina, “GPI-modified proteins non-covalently attached to *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall,” *Biochem.*, V.84, N12–13, 2019.

299. X. Wang and P. J. Quinn, “Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification,” *Progress in Lipid Research*, V.49, N2. 2010.

300. H. Simonin, L. Beney, and P. Gervais, “Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments,” *Biotechnol. Bioeng.*, V.100, N2, 2008.

301. S. Guyot, E. Ferret, and P. Gervais, “Yeast survival during thermal and osmotic shocks is related to membrane phase change,” *J. Agric. Food Chem.*, V.54, N22, 2006.

302. S. Epstein and H. Riezman, “Sphingolipid signaling in yeast: Potential implications for understanding disease,” *Front. Biosci. - Elit.*, V.5 E, N1, 2013.

303. A. Athanasopoulos, B. André, V. Sophianopoulou, and C. Gournas, “Fungal plasma membrane domains,” *FEMS Microbiology Reviews*, V.43, N6. 2019.

304. T. Premsler, R. Zahedi, U. Lewandrowski, and A. Sickmann, “Recent advances in yeast organelle and membrane proteomics,” *Proteomics*, V.9, N20. 2009.

305. T. J. Proszynski, R. Klemm, M. Bagnat, K. Gaus, and K. Simons, “Plasma membrane polarization during mating in yeast cells,” *J. Cell Biol.*, V.173, N6, 2006.

306. S. Claus, S. Jezierska, and I. N. A. Van Bogaert, “Protein-facilitated transport of hydrophobic molecules across the yeast plasma membrane,” *FEBS Letters*, V.593, N13. 2019.

307. R. Schneiter and A. Toulmay, “The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.73, N6. 2007.

308. R. Bosson and A. Conzelmann, “Multiple functions of inositolphosphorylceramides in the formation and intracellular transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast,” *Biochem. Soc. Symp.*, V.74, 2007.

309. S. S. Sokolov, N. I. Trushina, F. F. Severin, and D. A. Knorre, “Ergosterol Turnover in Yeast: An Interplay between Biosynthesis and Transport,” *Biochemistry (Moscow)*, V.84, N4. 2019.

310. R. C. Dickson, “Thematic Review Series: Sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast ,” *J. Lipid Res.*, V.49, N5, 2008.

311. M. E. Van Der Rest, A. H. Kamminga, A. Nakano, Y. Anraku, B. Poolman, and W. N. Konings, “The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function, and biogenesis,” *Microbiological Reviews*, V.59, N2. 1995.

312. E. Schweizer, K. Werkmeister, and M. K. Jain, “Fatty acid biosynthesis in yeast,” *Molecular and Cellular Biochemistry*, V.21, N2. 1978.

313. L. Klug and G. Daum, “Yeast lipid metabolism at a glance,” *FEMS Yeast Research*, V.14, N3. 2014.

314. S. Fakas, “Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*,” *Engineering in Life Sciences*, V.17, N3. 2017.

315. J. B. Madeira, C. A. Masuda, C. M. Maya-Monteiro, G. S. Matos, M. Montero-Lomelí, and B. L. Bozaquel-Morais, “TORC1 inhibition induces lipid droplet replenishment in yeast,” *Mol. Cell. Biol.*, V.35, N4, 2015.

316. K. Düvel and J. R. Broach, “The role of phosphatases in TOR signaling in yeast,” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, V.279. 2003.

317. D. Hardman, D. McFalls, and S. Fakas, “Characterization of phosphatidic acid phosphatase activity in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and its role in lipid biosynthesis,” *Yeast*, V.34, N2, 2017.

318. S. Fakas *et al.*, “Phosphatidate phosphatase activity plays key role in protection against fatty acid-induced toxicity in yeast,” *J. Biol. Chem.*, V.286, N33, 2011.

319. H. E. Brown, C. L. Telzrow, J. W. Saelens, L. Fernandes, and J. A. Alspaugh, “Sterol-response pathways mediate alkaline survival in diverse fungi,” *MBio*, V.11, N3, 2020.

320. R. Prasad, N. K. Khandelwal, and A. Banerjee, “Yeast ABC transporters in lipid trafficking,” *Fungal Genetics and Biology*, V.93. 2016.

321. J. Garbarino *et al.*, “Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death,” *J. Biol. Chem.*, V.284, N45, 2009.

322. M. Fischer *et al.*, “Analysis of the co-translational assembly of the fungal fatty acid synthase (FAS),” *Sci. Rep.*, V.10, N1, 2020.

323. F. Wernig, S. Born, E. Boles, M. Grininger, and M. Oreb, “Fusing α and β subunits of the fungal fatty acid synthase leads to improved production of fatty acids,” *Sci. Rep.*, V.10, N1, 2020.

324. A. Soto-Cardalda, S. Fakas, F. Pascual, H. S. Choi, and G. M. Carman, "Phosphatidate phosphatase plays role in zinc-mediated regulation of phospholipid synthesis in yeast," *J. Biol. Chem.*, V.287, N2, 2012.

325. J. I. Nikawa, M. Yata, M. Motomura, N. Miyoshi, T. Ueda, and D. Hisada, "Ternary complex formation of Ino2p-Ino4p transcription factors and Apl2p adaptin *β* subunit in yeast," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, V.70, N11, 2006.

326. C. E. Martin, C. S. Oh, and Y. Jiang, "Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, V.1771, N3. 2007.

327. J. Cerbón, A. Falcon, C. Hernández-Luna, and D. Segura-Cobos, "Inositol phosphoceramide synthase is a regulator of intracellular levels of diacylglycerol and ceramide during the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. J.*, V.388, N1, 2005.

328. M. Otsu, M. Toume, Y. Yamaguchi, and M. Tani, "Proper regulation of inositolphosphorylceramide levels is required for acquirement of low pH resistance in budding yeast," *Sci. Rep.*, V.10, N1, 2020.

329. K. Liu, X. Zhang, C. Sumanasekera, R. L. Lester, and R. C. Dickson, "Signalling functions for sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. Soc. Trans.*, V.33, N5, 2005.

330. R. C. Dickson, C. Sumanasekera, and R. L. Lester, "Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*," *Progress in Lipid Research*, V.45, N6. 2006.

331. P. Spincemaille, N. Matmati, Y. A. Hannun, B. P. A. Cammue, and K. Thevissen, "Sphingolipids and mitochondrial function in budding yeast," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, V.1840, N10. 2014.

332. K. Funai, S. A. Summers, and J. Rutter, "Reign in the membrane: How common lipids govern mitochondrial function," *Current Opinion in Cell Biology*, V.63. 2020.

333. M. L. Villasmil *et al.*, "Ceramide signals for initiation of yeast mating-specific cell cycle arrest," *Cell Cycle*, V.15, N3, 2016.

334. S. Manzanares-Estreder, A. Pascual-Ahuir, and M. Proft, “Stress-activated degradation of sphingolipids regulates mitochondrial function and cell death in yeast,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, V.2017, 2017.

335. Q. Guo *et al.*, “Sphingolipids are required for exocyst polarity and exocytic secretion in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Cell Biosci.*, V.10, N1, 2020.

336. G. Zhu *et al.*, “Enhancement of sphingolipid synthesis improves osmotic tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, V.86, N8, 2020.

337. M. Tani and K. Funato, “Protection mechanisms against aberrant metabolism of sphingolipids in budding yeast,” *Current Genetics*, V.64, N5. 2018.

338. E. Quon *et al.*, “Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites integrate sterol and phospholipid regulation,” *PLoS Biol.*, V.16, N5, 2018.

339. J. Encinar del Dedo *et al.*, “ORP-Mediated ER Contact with Endocytic Sites Facilitates Actin Polymerization,” *Dev. Cell*, V.43, N5, 2017.

340. D. Yan and V. M. Olkkonen, “Characteristics of oxysterol binding proteins,” in *International Review of Cytology*, V.265, 2008.

341. T. Vihervaara, M. Jansen, R. L. Uronen, Y. Ohsaki, E. Ikonen, and V. M. Olkkonen, “Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: Sterol sensors or transporters?,” *Chemistry and Physics of Lipids*, V.164, N6. 2011.

342. V. M. Olkkonen and S. Li, “Oxysterol-binding proteins: Sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism,” *Progress in Lipid Research*, V.52, N4. 2013.

343. L. Li, G. Qu, M. Wang, Q. Huang, and Y. Liu, “Association of oxysterol binding protein-related protein 9 polymorphism with cerebral infarction in Hunan Han population,” *Ir. J. Med. Sci.*, V.183, N3, 2014.

344. M. Weber-Boyvat, W. Zhong, D. Yan, and V. M. Olkkonen, “Oxysterol-binding proteins: Functions in cell regulation beyond lipid metabolism,” *Biochemical Pharmacology*, V.86, N1. 2013.

345. N. F. Lipp, S. Ikhlef, J. Milanini, and G. Drin, “Lipid exchangers: Cellular functions and mechanistic links with phosphoinositide metabolism,” *Frontiers in*

Cell and Developmental Biology, V.8. 2020.

346. R. Burr, E. V. Stewart, and P. J. Espenshade, “Coordinate regulation of yeast sterol regulatory elementbinding protein (SREBP) and Mga2 transcription factors,” *J. Biol. Chem.*, V.292, N13, 2017.

347. G. M. Carman and G. S. Han, “Regulation of phospholipid synthesis in the yeast Saccharomyces Cerevisiae,” *Annu. Rev. Biochem.*, V.80, 2011.

348. J. Petschnigg *et al.*, “Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast,” *J. Biol. Chem.*, V.284, N45, 2009.

349. M. J. Rao, M. Srinivasan, and R. Rajasekharan, “Cell size is regulated by phospholipids and not by storage lipids in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Curr. Genet.*, V.64, N5, 2018.

350. R. Ferreira, P. G. Teixeira, V. Siewers, and J. Nielsen, “Redirection of lipid flux toward phospholipids in yeast increases fatty acid turnover and secretion,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, V.115, N6, 2018.

351. Z. Guo, S. Khoomrung, J. Nielsen, and L. Olsson, “Changes in lipid metabolism convey acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biotechnol. Biofuels*, V.11, N1, 2018.

352. B. E. Bauer, D. Rossington, M. Mollapour, Y. Mamnun, K. Kuchler, and P. W. Piper, “Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants,” *Eur. J. Biochem.*, V.270, N15, 2003.

353. A. Piecuch and E. Obłak, “Yeast ABC proteins involved in multidrug resistance,” *Cellular and Molecular Biology Letters*, V.19, N1. 2014.

354. Y. Nygård, D. Mojzita, M. Toivari, M. Penttilä, M. G. Wiebe, and L. Ruohonen, “The diverse role of Pdr12 in resistance to weak organic acids,” *Yeast*, V.31, N6, 2014.

355. P. Piper *et al.*, “The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast,” *EMBO J.*, V.17, N15, 1998.

356. K. Hatzixanthis *et al.*, “Moderately lipophilic carboxylate compounds are the

selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter," *Yeast*, V.20, N7, 2003.

357. S. Michaelis and I. Herskowitz, "The *a*-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating.," *Mol. Cell. Biol.*, V.8, N3, 1988.

358. R. M. Lucena, L. Dolz-Edo, S. Brul, M. A. de Morais, and G. Smits, "Extreme low cytosolic pH is a signal for cell survival in acid stressed yeast," *Genes (Basel).*, V.11, N6, 2020.

359. A. Ullah, G. Chandrasekaran, S. Brul, and G. J. Smits, "Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure," *Front. Microbiol.*, V.4, NJUN, 2013.

360. M. Redza-Dutordoir and D. A. Averill-Bates, "Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, V.1863, N12. 2016.

361. R. Ferreira, A. Limeta, and J. Nielsen, "Tackling cancer with yeast-based technologies," *Trends in Biotechnology*, V.37, N6. 2019.

362. C. Pereira, I. Coutinho, J. Soares, C. Bessa, M. Leão, and L. Saraiva, "New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model," *FEBS Journal*, V.279, N5. 2012.

363. L. H. Hartwell, "Yeast and cancer," in *Bioscience Reports*, 2004, V.24, N4–5.

364. T. Chidawanyika, K. M. K. Mark, and S. Supattapone, "A genome-wide crispr/cas9 screen reveals that riboflavin regulates hydrogen peroxide entry into hap1 cells," *MBio*, V.11, N4, 2020.

365. A. Sousa-Lopes, F. Antunes, L. Cyrne, and H. S. Marinho, "Decreased cellular permeability to H_2O_2 protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress," *FEBS Lett.*, V.578, N1–2, 2004.

366. Y. Ouchi, K. Unoura, and H. Nabika, "Role of oxidized lipids in permeation of H_2O_2 through a lipid membrane: Molecular mechanism of an inhibitor to promoter switch," *Sci. Rep.*, V.9, N1, 2019.

367. J. C. Mathai and V. Sitaramam, "Stretch sensitivity of transmembrane mobility of hydrogen peroxide through voids in the bilayer. Role of cardiolipin," *J. Biol.*

Chem., V.269, N27, 1994.

368. F. Rolland, J. Winderickx, and J. M. Thevelein, "Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast," in *FEMS Yeast Research*, 2002, V.2, N2.

369. J. I. Park, E. J. Collinson, C. M. Grant, and I. W. Dawes, "Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway," *J. Biol. Chem.*, V.280, N4, 2005.

370. E. V. Laz, J. Lee, and D. E. Levin, "Crosstalk between *Saccharomyces cerevisiae* SAPKs Hog1 and Mpk1 is mediated by glycerol accumulation," *Fungal Biol.*, V.124, N5, 2020.

371. C. Capusoni, S. Arioli, S. Donzella, B. Guidi, I. Serra, and C. Compagno, "Hyper-osmotic stress elicits membrane depolarization and decreased permeability in halotolerant marine *Debaryomyces hansenii* strains and in *Saccharomyces cerevisiae*," *Front. Microbiol.*, V.10, NJAN, 2019.

372. A. Szopinska, H. Degand, J. F. Hochstenbach, J. Nader, and P. Morsomme, "Rapid response of the yeast plasma membrane proteome to salt stress," *Mol. Cell. Proteomics*, V.10, N11, 2011.

373. S. Dupont, L. Beney, T. Ferreira, and P. Gervais, "Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, V.1808, N6, 2011.

374. B. L. Todd, E. V. Stewart, J. S. Burg, A. L. Hughes, and P. J. Espenshade, "Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast," *Mol. Cell. Biol.*, V.26, N7, 2006.

375. H. Wurst, T. Shiba, and A. Kornberg, "The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Bacteriol.*, V.177, N4, 1995.

376. E. A. Winzeler *et al.*, "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis," *Science (80-.).*, V.285, N5429, 1999.

377. A. L. Goldstein and J. H. McCusker, "Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, V.15, N14, 1999.

378. F. Baganz, A. Hayes, D. Marren, D. C. J. Gardner, and S. G. Oliver, "Suitability

of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, V.13, N16, 1997.

379. И. А. Захаров, С. В. Ковальцова, and С. В. Марфин, "Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для изучения индуцированного мутагенеза и рекомбинации," *Генетика*, V.15, N1, 1979.

380. A. Klapwuk, J. Drent, and J. H. A. M. Steenvoorden, "A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated-sludge," *Water Res.*, V.8, N2, 1974.

381. D. Martins and A. M. English, "Catalase activity is stimulated by H_2O_2 in rich culture medium and is required for H_2O_2 resistance and adaptation in yeast," *Redox Biol.*, V.2, N1, 2014.

382. Y. L. Ching, A. Lesimple, Å. Larsen, O. Mamer, and J. Genest, "ESI-MS quantitation of increased sphingomyelin in Niemann-Pick disease type B HDL," *J. Lipid Res.*, V.46, N6, 2005.

383. M. A. Quail and S. L. Kelly, "The extraction and analysis of sterols from yeast.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, V.53. 1996.

384. T. Zhang, J. Lei, H. Yang, K. Xu, R. Wang, and Z. Zhang, "An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, V.28, N11, 2011.

385. A. Pitarch, C. Nombela, and C. Gil, "Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics.," *Methods Mol. Biol.*, V.425, 2008.

386. R. B. Caldwell and C. T. Lattemann, "Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant," *Appl. Environ. Microbiol.*, V.70, N1, 2004.

387. A. M. Lawrence and H. Besir, "Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid," *J. Vis. Exp.*, N30, 2009.

388. R. J. Simpson, "Rapid Coomassie blue staining of protein gels," *Cold Spring Harb. Protoc.*, V.5, N4, 2010.

389. M. Chevallet, S. Luche, and T. Rabilloud, "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels," *Nat. Protoc.*, V.1, N4, 2006.

390. J. M. François, "A simple method for quantitative determination of

polysaccharides in fungal cell walls," *Nat. Protoc.*, V.1, N6, 2007.

391. A. H. Y. Tong *et al.*, "Global mapping of the yeast genetic interaction network," *Science (80-.).*, V.303, N5659, 2004.

392. M. Costanzo, A. Baryshnikova, C. L. Myers, B. Andrews, and C. Boone, "Charting the genetic interaction map of a cell," *Current Opinion in Biotechnology*, V.22, N1. 2011.

393. A. Baryshnikova *et al.*, "Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale," *Nat. Methods*, V.7, N12, 2010.

394. S. Harju, H. Fedosyuk, and K. R. Peterson, "Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab," *BMC Biotechnol.*, V.4, 2004.

395. P. L. Olive and J. P. Banáth, "The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells," *Nat. Protoc.*, V.1, N1, 2006.

396. M. Ares, "Isolation of total RNA from yeast cell cultures," *Cold Spring Harb. Protoc.*, V.7, N10, 2012.

397. D. Sint, L. Raso, and M. Traugott, "Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success," *Methods Ecol. Evol.*, V.3, N5, 2012.

398. Z. Shen *et al.*, "MPprimer: A program for reliable multiplex PCR primer design," *BMC Bioinformatics*, V.11, 2010.

399. J. J. Bozzola, "Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells," *Methods Mol. Biol.*, V.1117, 2014.

400. H. K. Hagler, "Ultramicrotomy for biological electron microscopy," *Methods Mol. Biol.*, V.369, 2007.

401. E. A. Ellis, "Poststaining Grids for Transmission Electron Microscopy," 2007.

402. J. Vandesompele *et al.*, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.," *Genome Biol.*, V.3, N7, 2002.

403. S. Guénin, M. Mauriat, J. Pelloux, O. Van Wuytswinkel, C. Bellini, and L. Gutierrez, "Normalization of qRT-PCR data: The necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references," *J. Exp.*

Bot., V.60, N2, 2009.

404. S. Babicki *et al.*, “Heatmapper: web-enabled heat mapping for all,” *Nucleic Acids Res.*, V.44, NW1, 2016.

405. I. Garmasheva, N. Kovalenko, S. Voychuk, A. Ostapchuk, O. Livins’ka, and L. Oleschenko, “*Lactobacillus* species mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against opportunistic pathogens *in vitro*,” *BioImpacts*, V.6, N4, 2016.

406. L. P. Babenko, N. M. Zholobak, A. B. Shcherbakov, S. I. Voychuk, L. M. Lazarenko, and M. Y. Spivak, “Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms *in vitro*.,” *Mikrobiol. Z.*, V.74, N3, 2012.

407. S. Skrotskyi, S. Voychuk, L. Khomenko, O. Vasyliuk, and P. Pidgorskyi, “Influence of nanoparticles on the solventogenesis of bacteria *Clostridium beijerinckii* IMV B-7806, *Clostridium acetobutylicum* IMV B-7807,” *Ukr. Food J.*, V.8, N1, pp. 110–118, 2019.

408. Н. О. Дронова, М.Л.; Войчук, С.І.; Вринчану, “Ултьраструктура *Escherichia coli* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів,” *Morphologia*, V.8, N4, pp. 26–29, 2014.

409. Н. О. . Суворова, З.С.; Войчук, С.І.; Вринчану, “Ультраструктура *S. cerevisiae* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів,” *Вісник Вінницького наці онального медичного університету*, V.20, N2, pp. 347–351, 2016.

410. Н. Дудікова, Д.; Войчук, С.; Вринчану, “Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(n-бензил, n-диметил аміно)-2-пропанол хлориду на *Pseudomonas spp*.,” *Sci. Biol. Sci.*, V.4, N13, pp. 35–41, 2018.

411. N. O. Dronova, M.L.; Voychuk, S.I.; Vrynchanu, “Antibacterial activity of 1-4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)phenoxy.-3-(*N*-benzyl-4-methylpiperidine)-2-propanol chloride,” *Ukr. Biopharm. J*, V.6, N41, pp. 92–97, 2015.

412. Н. О. Дудікова, Д.М.; Войчук, С.І.; Вринчану, “Ультраструктура *Candida albicans* при дії 1-4-(1-адамантил)-фенокси.-3-(*N*-бензил, *N*-диметиламіно)2-пропанол хлориду,” *Вісник морфології*, V.21, N2, pp. 300–303, 2015.

413. L.A. Safronova, S.I. Voychuk, O.S. Brovarska, “Influence of nanobiocomposites on the exopolysaccharide matrix of *Bacillus* strains,” *Reports Natl. Acad. Sci. Ukr.*, V.8, pp. 81–91, 2020.

414. Л.А. Сафронова, С.И. Войчук, Б.Г. Сухов, В.С. Подгорский, “Цитотоксическое и ДНК-повреждающее действие пребиотических субстанций,” *Biotechnol. Acta*, V.6, N6, pp. 86–93, 2013.

415. V. V. Klochko, L. B. Zelena, S. I. Voychuk, and A. N. Ostapchuk, “Peculiarities of *Alteromonas macleodii* strains reflects their deep/surface habitation rather than geographical distribution,” *J. Gen. Appl. Microbiol.*, V.58, N2, 2012.

416. A. C. Alves *et al.*, “Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: Insights from *in vitro* and in silico studies,” *Sci. Rep.*, V.7, N1, 2017.

417. С. И. Войчук and Е. Н. Громозова, “Изменение физиолого-биохимических свойств клеток *Saccharomyces cerevisiae* при слабых гравитационных вариациях вызваных процедурой центрифугирования,” in *V Всероссийский Конгресс по Медицинской Микологии, Москва, Россия 24-25 марта*, 2007, p. 6.

418. С. И. Войчук and Е. Н. Громозова, “Влияние центрифугирования на физиолого-биохимическое состояние клеток дрожжей,” in *Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии,* 2008, p. 272.

419. S. I. Voychuk, E. N. Gromozova, P. M. Lytvyn, and V. S. Podgorsky, “Changes of surface properties of yeast cell wall under exposure of electromagnetic field (40.68 MHz) and action of nystatin,” *Environmentalist*, V.25, N2-4 SPEC. ISS., 2005.

420. E. N. Gromozova, S. I. Voychuk, L. B. Zelena, and I. A. Gretckey, “Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation,” *Saf. Eng.*, V.2, N2, pp. 89–92, 2012.

421. E. N. Gromozova and S. I. Voychuk, “Influence of radiofrequency EMF on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system,” in *Biophotonics and*

Coherent Systems in Biology, L.V. Beloussov, V.L. Voeikov, V.S. Martynyuk, Printed in the USA by Springer Science Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA., 2007, pp. 167–175.

422. С. И. Войчук and Е. Н. Громозова, “Влияние излучений видеодисплейных терминалов на клетки эукариотического модельного организма *Saccharomyces cerevisiae*,” *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Серія біологія.*, V.5, N768, pp. 52–56, 2007.

423. С. И. Войчук and Е. Н. Громозова, “Биологическое действие физических факторов видеодисплейных терминалов и радиочастотного электромагнитного поля,” in *IV Международный Конгресс “Слабые и сверслабые поля и излучения в биологии и медицине”, 3-7 июля*, 2006, p. 104.

424. В. С. Подгорский, Е. Н. Громозова, and С. И. Войчук, “Дрожжевые клетки как альтернативные объекты изучения влияния на потребителя физических факторов видеодисплейных терминалов,” in *Тез. 2-го Міжнародного симпозіуму “Біоетика – шлях до світових стандартів”, Харків, 4-7 жовтня*, 2005, p. 43.

425. S. I. Voychuk, E. N. Gromozova, and V. S. Podgorskiy, “Use of a model organism for an estimation of action of the physical factors of videodisplay terminals,” in *4th International Workshop “Biological Effects of EMFs”, 16-20 October 2006, Crete, Greece*, 2006, pp. 135–138.

426. S. I. Voychuk, E. N. Gromozova, and V. S. Podgorskiy, “EMFs generated by video display terminals and EMF by frequency 40.68 MHz have opposite effects on viability of organisms,” in *28th International Congress on Occupational Health, Milan, Italy, 11-16 June*, 2006, p. 255.

427. О. . Громозова, С. І. Войчук, Н. В. Брюзгінова, П. С. Красов, and Б. Р. Масюк, “Розробка тест-системи для вивчення впливу різних типів електромагнітного випромінювання на біологічні об’єкти,” *Біологія та валеологія (Збірник наукових праць).*, N9, pp. 25–30, 2007.

428. E. N. Gromozova and S. I. Voychuk, “Дрожжевые клетки – как объекты изучения биологического действия электромагнитного излучения,” in *IV*

Междунар. Науч. Конф. «Электромагнитные излучения в биологии. Био-ЭМИ-2008». – Калуга, Россия, 21-23 октября, 2008, pp. 109–113.

429. В. С. Подгорский, Е. Н. Громозова, and С. И. Войчук, “Микроорганизмы как биосенсоры космофизических воздействий,” in *Тез. 6-й Международной конференции “Космос и биосфера: Космическая погода и биологические процессы”, Партенит, Крым, 26 сентября - 1 октября*, 2005, p. 202.

430. Е. Н. Громозова, С. И. Войчук, and Т. Л. Качур, “Влияние космической погоды и антропогенного электромагнитного излучения на чувствительность дрожжевых клеток к антибиотикам,” in *VI Международный симпозиум «Актуальные проблемы биофизической медицины», Киев 14-17 мая 2009г., Украина.*, 2009, p. 33.

431. S. I. Voychuk and E. N. Gromozova, “Microbial growth fluctuating in response to solar-terrestrial activity variations.,” *Mikrobiol. Z.*, V.74, N3, 2012.

432. Е. Н. Громозова and С. И. Войчук, “Гелиофизическая активность и устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков,” in *Международный Симпозиум “Гелио-геофизические факторы и здоровье человека”, Новосибирск, Центр клинич. и эксперим. медицины РА Мед. Наук, 15 - 16 ноября*, 2005, p. 132.

433. О. М. Громозова, Т. Л. Качур, and С. І. Войчук, “Космічна погода та життєдіяльність мікроорганізмів,” in *XII з’їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 24-30 травня 2009 р., Ужгород, Україна*, 2009, p. 107.

434. Е. Н. Громозова, П. Е. Григорьев, Т. Л. Качур, and С. И. Войчук, “Влияние космо-физических факторов на реакцию метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae*,” *Геофизические процессы и биосфера*, N2, pp. 67–76, 2010.

435. Е. Н. Громозова, Т. Л. Качур, С. И. Войчук, Л. П. Рязанова, and Т. В. Кулаковская, “Новые аспекты плейотропного действия генов, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*,” *Мікробіол. журн.*, V.74, N5, pp. 26–31, 2012.

436. Е. Н. Громозова, Т. Л. Качур, С. И. Войчук, and П. Е. Григорьев, “Результаты длительного мониторинга био-астрономического эффекта Чижевского-Вельховера,” *Физика сознания и жизни, космология и астрофизика*, N4, pp. 12–14, 2011.

437. Е. Н. Громозова, Т. Л. Качур, and С. И. Войчук, “Клеточные неорганические полифосфаты как акцепторы осцилляций геокосмических факторов,” in *5-й Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 29.06.2009-03.07.2009, Россия*, 2009, p. 166.

438. М. С. Громозова, О.М., Качур, Т.Л., Войчук, С.І., Харчук, “Дослідження реакції метахромазії *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mikrobiol. Z.*, V.78, N3, pp. 45–51, 2016.

439. Е. Н. Громозова, С. И. Войчук, Т. Л. Качур, В. Ф. Горчев, and С. А. Карахим, “Особенности строения волютиновых гранул в клетках низших полифосфат-аккумулирующих эукариот,” *Биотехнология*, N4, pp. 55–61, 2010.

440. О. М. Громозова, П. Е. Григор’єв, Т. Л. Качур, and С. І. Войчук, “Сучасний погляд на біо-астрономічний ефект Чижевського-Вельховера,” in *Международная конференция, посвященная 165-летию обсерватории КГУ и 105-летию С.К. Всесвятского, 24-28 мая 2010 г., г. Киев, Украина*, 2010, p. 17.

441. Б. М. Владимирский, В. Я. Нарманский, and Н. А. Темурьянц, *Космические ритмы*. Симферополь, 1994.

442. P. Gromozova, E.; Voychuk, S.; Vishnevsky, V.; Ragulskaya, M.; Grigor’ev, “Cosmic Rays as Bio-regulator of Deep Time Terrestrial Ecosystems,” *Sun Geosph.*, V.7, N2, pp. 117–120, 2012.

443. Е. Н. Громозова, С. И. Войчук, Т. Л. Качур, М. М. Лычак, and В. Н. Шевченко, “Связь метахромазии волютиновых зерен *Saccharomyces cerevisiae* с гелиофизическими факторами,” in *VII Международная крымская конференция «Космос и Биосфера», - Судак, Крым, Украина 1-6 октября*,

2007, pp. 103–104.

444. Е. Н. Громозова, С. И. Войчук, and Т. . Качур, “Связь явления метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* с гелиофизическими факторами,” in *Кулаевские чтения по полифосфатам, 30 июня 2008, г. Пущино-на-Оке, Россия*, 2008, p. 17.

445. Е. Н. Громозова *et al.*, “Проявление реакции метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* в условиях экранирования различными материалами,” *Питання біоіндикації та екології*, V.15, N2, pp. 232–244, 2011.

446. В. С. Підгорський, О. М. Громозова, С. І. Войчук, Т. Ю. Щеголева, Н. В. Брюзгінова, and Б. Р. Масюк, “Тест-система на основі клітин дріжджів для експрес-аналізу дії електромагнітних випромінювань за допомогою КВЧ-діелектрометрії,” in *Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій / За ред. Г.В. Єльскької, В.Д. Походенка. – Київ: Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України*, 2006, pp. 165–172.

447. Т. Ю. Щеголева, Е. М. Громозова, С. И. Войчук, Н. В. Брюзгинова, Б. Р. Масюк, and П. С. Красов, “Разработка тест-систем для изучения влияния электромагнитного излучения на биологические объекты,” *Радиофизика и электроника*, V.13, N3, pp. 568–571, 2008.

448. Е. Н. Громозова, Н. И. Богатина, Н. В. Брюзгинова, Т. Л. Качур, С. И. Войчук, and Н. В. Щейкина, “Проявление реакции метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* в условиях экранирования различными материалами,” in *XI Международная Конференция по Бионике, Биокибернетике и Прикладной Биофозике, 4-6 ноября 2010, г. Киев, Украина*, 2010, pp. 33–34.

449. Е. Н. Громозова, П. Е. Григорьев, Т. Л. Качур, and С. И. Войчук, “Реакция метахромазии как модельная система для изучения механизмов взаимодействия клетки с космо-физическимим факторами,” in *XI Международная Конференция по Бионике, Биокибернетике и Прикладной Биофизике, 4-6 ноября 2010г, Киев, Украина.*, 2010, pp. 34–35.

450. E. N. Gromozova, S. I. Voychuk, and T. L. Kachur, “Research of structural

features of volutine granules of *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 by the method of confocal microscopy," in *12th International Congress on Yeasts, 11-15 August 2008, Kyiv, Ukraine*, 2008, p. 219.

451. Е. Н. Громозова, Т. Л. Качур, and С. И. Войчук, "Поиск факторов, вызывающих реакцию метахромазии волютиновых гранул дрожжевых клеток," in *Тезисы докладов: VIII Международная крымская конференция «Космос и Биосфера», Судак, Крым, Украина, 28 сент. - 3 окт.*, 2009, pp. 70–71.

452. E. N. Gromozova, P. Y. Grigoryev, T. L. Kachur, and S. I. Voychuk, "An influence of geocosmic and meteorological factors on the reaction of metachromasy of volutin granules of *Saccharomyces cerevisiae*," in *9th Int. Mycological Congress "The Biology of Fungi", 1-6 Aug. 2010, Edinburgh, UK.*, 2010.

453. С. И. Войчук, Е. Н. Громозова, and Т. Л. Качур, "Стохастичность биологического действия электромагнитных излучений," in *5-й Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 29.06.2009-03.07.2009, Россия*, 2009, p. 124.

454. S. I. Voychuk and O. M. Gromozova, "The functional role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases under stresses action and for adaptive response development," *Mikrobiol. Zh.*, V.82, N1, 2020.

455. J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, and A. Blázquez-Castro, "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives," *Acta Histochemica*, V.120, N3. 2018.

456. L. Wojtczak, A. B. Wojtczak, and L. Ernster, "The inhibition of succinate dehydrogenase by oxaloacetate," *BBA - Enzymol.*, V.191, N1, 1969.

457. E. B. KEARNEY, "Studies on succinic dehydrogenase. IV. Activation of the beef heart enzyme.," *J. Biol. Chem.*, V.229, N1, 1957.

458. M. J. Gray *et al.*, "Polyphosphate Is a Primordial Chaperone," *Mol. Cell*, V.53,

N5, 2014.

459. R. Gerasimaite and A. Mayer, “Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: Structure, enzymology and biological roles,” *Biochem. Soc. Trans.*, V.44, 2016.

460. M. Breker, M. Gymrek, and M. Schuldiner, “A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses,” *J. Cell Biol.*, V.200, N6, 2013.

461. Y. M. Chuang, N. K. Dutta, C. F. Hung, T. C. Wu, H. Rubin, and P. C. Karakousis, “Stringent response factors PPX1 and PPK2 play an important role in Mycobacterium tuberculosis metabolism, biofilm formation, and sensitivity to isoniazid In Vivo,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, V.60, N11, 2016.

462. D. Ricci and P. C. Braga, “Atomic force microscopy in biomedical research,” *Methods Mol. Biol.*, V.736, N1, 2011.

463. P. N. Lipke and R. Ovalle, “Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges,” *Journal of Bacteriology*, V.180, N15. 1998.

464. S. Voychuk, E. Gromozova, and V. Pidgorskiy, “Yeast cell wall polysaccharide content under action of RF EMF and chemical stresses,” in *Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2016, May 23-27, 2016, Niš, Serbia.*, 2016, p. 152.

465. M. Pinto, E. Coelho, A. Nunes, T. Brandão, and M. A. Coimbra, “Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach,” *Carbohydr. Polym.*, V.116, 2015.

466. Т. С. Калебина and И. С. Кулаев, “Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей,” *Успехи биологической химии*, V.41, pp. 105–130, 2001.

467. L. M. M. Purish, L. G. G. Asaulenko, D. R. R. Abdulina, S. I. I. Voychuk, and G. A. A. Iutynskaya, “Lectin-binding analysis of the biofilm exopolymeric matrix carbohydrate composition of corrosion-aggressive bacteria,” *Appl. Biochem. Microbiol.*, V.49, N5, 2013.

468. І. П. Бойко and С. І. Войчук, “Визначення полісахаридного складу клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою лектинів,

мічених колоїдним золотом," in *X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ», м. Київ, 22 квітня 2016.*, 2016, p. 111.

469. S. I. Voychuk and O. M. Gromozova, "The role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases in the stress-induced changes of the polysaccharide composition of cell wall and extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* cells," *Mikrobiol. Zh.*, V.82, N2, 2020.

470. K. Amano *et al.*, "Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, V.105, N9, 2008.

471. E. Cabib, N. Blanco, C. Grau, J. M. Rodríguez-Peña, and J. Arroyo, "Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to β(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall," *Mol. Microbiol.*, V.63, N3, 2007.

472. M. Eustice and L. Pillus, "Unexpected function of the glucanosyltransferase gas1 in the DNA damage response linked to histone H3 acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, V.196, N4, 2014.

473. Q. Y. Yin, P. W. J. De Groot, H. L. Dekker, L. De Jong, F. M. Klis, and C. G. De Koster, "Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages," *J. Biol. Chem.*, V.280, N21, 2005.

474. P. H. Hsu, P. C. Chiang, C. H. Liu, Y. W. Chang, and G. W. Jones, "Characterization of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates elucidates Hsp150p in virulence," *PLoS One*, V.10, N8, 2015.

475. Q. Y. Yin, P. W. J. De Groot, L. De Jong, F. M. Klis, and C. G. De Koster, "Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res.*, V.7, N6, 2007.

476. V. S. Pidgorskiy, S. I. Voychuk, and E. N. Gromozova, "The role of polyphosphates in the cell wall and cytoplasmic membrane reactions to the action of stress," *Microbiol. Z.*, N1, pp. 59–65, 2017.

477. L. Zelena, S. Voychuk, R. Oblap, and E. Gromozova, "Expression of flo11

gene in *Saccharomyces cerevisiae* under influence of high frequency electromagnetic radiation," in *Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting. July 31-August 5, 2012.Princeton, New Jersey, USA*, 2012, p. 146.

478. L. M. Douglas, L. Li, Y. Yang, and A. M. Dranginis, "Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion," *Eukaryot. Cell*, V.6, N12, 2007.

479. K. Voordeckers *et al.*, "Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology," *Mol. Microbiol.*, V.86, N1, 2012.

480. J. M. Francois, "Cell surface interference with plasma membrane and transport processes in yeasts," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, V.892, 2016.

481. V. Ansanay Galeote, H. Alexandre, B. Bach, P. Delobel, S. Dequin, and B. Blondin, "Sfl1p acts as an activator of the HSP30 gene in *Saccharomyces cerevisiae*," *Curr. Genet.*, V.52, N2, 2007.

482. H. F. De Melo, B. M. Bonini, J. Thevelein, D. A. Simões, and M. A. Morais, "Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations," *J. Appl. Microbiol.*, V.109, N1, 2010.

483. R. A. Ortiz-Merino *et al.*, "Transcriptional response to lactic acid stress in the hybrid yeast *Zygosaccharomyces parabailii*," *Appl. Environ. Microbiol.*, V.84, N5, 2018.

484. S. M. Bowman and S. J. Free, "The structure and synthesis of the fungal cell wall," *BioEssays*, V.28, N8. 2006.

485. E. Cabib and J. Arroyo, "How carbohydrates sculpt cells: Chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall," *Nature Reviews Microbiology*, V.11, N9. 2013.

486. M. G. Paulick and C. R. Bertozzi, "The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins," *Biochemistry*, V.47, N27. 2008.

487. S. I. Voychuk, A. M. Ostapchuk, and E. N. Gromozova, “Effects of electromagnetic field and nystatin on *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid composition,” in *The Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research (RAD 2014), May 27-30, 2014, Niš, Serbia*, 2014, pp. 223–226.

488. С. И. Войчук, Е. Н. Громозова, А. Н. Остапчук, and В. В. Клочко, “Изменение пула жирных кислот в клетках дрожжей под действием внешних факторов стресса,” *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, N1, pp. 19–20, 2009.

489. P. J. Trotter, “The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Annual Review of Nutrition*, V.21. 2001.

490. B. Michalik, W. Biel, R. Lubowicki, and E. Jacyno, “Chemical composition and biological value of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol,” *Can. J. Anim. Sci.*, V.94, N1, 2014.

491. B. Rodríguez-Porrata *et al.*, “Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, V.27, N1, 2011.

492. I. Khozin-Goldberg and Z. Cohen, “The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte Monodus subterraneus,” *Phytochemistry*, V.67, N7, 2006.

493. S. I. Voychuk, E. N. Gromozova, and M. G. Sadovskiy, “The model of fungal population dynamics affected by nystatin,” *Int. J. Quantum Chem.*, V.110, N1, 2010.

494. J. Nagai, S. Yokoe, M. Tanaka, H. Hibasami, and T. Ikeda, “Increased proportion of medium chain fatty acids in nystatin-resistant yeast mutants,” *Lipids*, V.16, N6, 1981.

495. A. Y. Zhang, W. L. Camp, and B. E. Elewski, “Advances in topical and systemic antifungals,” *Dermatologic Clinics*, V.25, N2. 2007.

496. M. Veen and C. Lang, “Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways,” *Biochem. Soc. Trans.*, V.33, N5, 2005.

497. X. Yang, W. Sheng, G. Y. Sun, and J. C. M. Lee, “Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α-secretase-dependent amyloid precursor protein processing,” *Neurochem. Int.*, V.58, N3, 2011.

498. L. O. Ingram, “Adaptation of membrane lipids to alcohols,” *J. Bacteriol.*, V.125, N2, 1976.

499. T. N. Dinh, K. Nagahisa, T. Hirasawa, C. Furusawa, and H. Shimizu, “Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size,” *PLoS One*, V.3, N7, 2008.

500. G. Y. Sun and A. Y. Sun, “Ethanol and membrane lipids,” *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, V.9, N2, 1985.

501. H. Sies, R. Bricelius, H. Wefers, A. Müller, and E. Cadenas, “Cellular redox changes and response to drugs and toxic agents,” *Toxicol. Sci.*, V.3, N4, 1983.

502. H. Sies, “Biological redox systems and oxidative stress,” *Cell. Mol. Life Sci.*, V.64, N17, 2007.

503. W. H. McBride *et al.*, “A sense of danger from radiation,” in *Radiation Research*, 2004, V.162, N1.

504. R. Rivabene, M. Napolitano, A. Cantafora, and E. Bravo, “Redox-dependent modulation of lipid synthesis induced by oleic acid in the human intestinal epithelial cell line Caco-2,” *Exp. Biol. Med.*, V.226, N3, 2001.

505. Z. Hu, B. He, L. Ma, Y. Sun, Y. Niu, and B. Zeng, “Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Indian Journal of Microbiology*, V.57, N3. 2017.

506. J. Chang *et al.*, “The molecular mechanism of a *cis*-regulatory adaptation in yeast,” *PLoS Genet.*, V.9, N9, 2013.

507. H. Ling and H. Chan, “Formulation and use of ergosta-7,22-dien-3*beta*-ol,” *Pat. 20090247497*.

508. G. F. Bammert and J. M. Fostel, “Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, V.44, N5,

2000.

509. G. H. Shin, M. Veen, U. Stahl, and C. Lang, “Overexpression of genes of the fatty acid biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Yeast*, V.29, N9, 2012.

510. D. Hoepfner *et al.*, “High-resolution chemical dissection of a model eukaryote reveals targets, pathways and gene functions,” *Microbiol. Res.*, V.169, N2–3, 2014.

511. H. S. Kim, N. R. Kim, and W. Choi, “Total fatty acid content of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is more responsible for ethanol tolerance than the degree of unsaturation,” *Biotechnol. Lett.*, V.33, N3, 2011.

512. J. A. Lewis, I. M. Elkon, M. A. McGee, A. J. Higbee, and A. P. Gasch, “Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance,” *Genetics*, V.186, N4, 2010.

513. Y. J. Lee, S. Wang, S. R. Slone, T. A. Yacoubian, and S. N. Witt, “Defects in very long chain fatty acid synthesis enhance alpha-synuclein toxicity in a yeast model of Parkinson’s disease,” *PLoS One*, V.6, N1, 2011.

514. X. Wu *et al.*, “Deletion of JJJ1 improves acetic acid tolerance and bioethanol fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* strains,” *Biotechnol. Lett.*, V.38, N7, 2016.

515. G. Daum *et al.*, “Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism,” *Yeast*, V.15, N7, 1999.

516. K. Furukawa, T. Yamada, H. Mizoguchi, and S. Hara, “Increased ethyl caproate production by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biosci. Bioeng.*, V.95, N5, 2003.

517. H. -J Schüller, A. Schütz, S. Knab, B. Hoffmann, and E. Schweizer, “Importance of general regulatory factors Rap1p, Abf1p and Reb1p for the activation of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2*,” *Eur. J. Biochem.*, V.225, N1, 1994.

518. H. J. Schüller, R. Schorr, B. Hoffmann, and E. Schweizer, “Regulatory gene *INO4* of yeast phospholipid biosynthesis is positively autoregulated and functions as a trans-activator of fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* from

Saccharomyces cerevisiae," *Nucleic Acids Res.*, V.20, N22, 1992.

519. I. A. Peretiazhko and S. I. Voychuk, "Influence of stress factors on initiation of apoptosis in strains defective on polyphosphatases PPN1 and PPX1," in *2nd International Scientific Conference "Microbiology and Immunology – the Development outlook in the 21st Century", Kyiv: DIA, 14-15 April*, 2016, pp. 82–83.

520. С. І. Войчук, О. М. Громозова, and В. С. Підгорський, "Вплив антропогенного електромагнітного випромінювання на клітини дріжджів," in *XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 24-30 травня 2009 р., Ужгород, Україна*, 2009, p. 41.

521. S. I. Voychuk, L. B. Zelena, E. N. Gromozova, V. S. Pidgorskyi, V. Y. Dumansky, and A. P. Bezverkhaya, "Possible role of polyphosphatases in yeast sensitivity to DCS-1800 electromagnetic fields," *Cytol. Genet.*, V.51, N4, 2017.

522. S. I. Voychuk, "Induction of adaptive response in yeast cells under influence of extremely high frequency electromagnetic field," *Int. J. Electron. Commun. Eng.*, V.4, N5, p. 112, 2017.

523. E. Gromozova, S. Voychuk, I. Gretsky, S. Dybkova, and N. Zholobak, "Genetic effects of non-ionizing electromagnetic fields action," in *Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2015, June 8-12, 2015, Budva, Montenegro*, 2015, p. 125.

524. S. I. Voychuk, L. B. Zelena, E. N. Gromozova, and V. S. Pidgorskyi, "*Saccharomyces cerevisiae* genomic instability under exposure to mobile phones radiation of DCS-1800MHz," in *19th Annual Southeastern Regional Yeast Meeting, 24-26 February 2012, Emory University, Atlanta, Georgia, USA*, 2012, p. 110.

525. S. G. Kreft and M. Hochstrasser, "An unusual transmembrane helix in the endoplasmic reticulum ubiquitin ligase Doa10 modulates degradation of its cognate E2 enzyme," *J. Biol. Chem.*, V.286, N23, 2011.

526. I. S. Pretorius, "The genetic analysis and tailoring of wine yeasts," 2003.

527. M. A. Vannier-Santos, A. Martiny, U. Lins, J. A. Urbina, V. M. Borges, and

W. De Souza, “Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in Leishmania acidocalcisomes,” *Microbiology*, V.145, N11, 1999.

528. C. Picazo, B. McDonagh, J. Peinado, J. A. Bárcena, E. Matallana, and A. Aranda, “*Saccharomyces cerevisiae* cytosolic thioredoxins control glycolysis, lipid metabolism, and protein biosynthesis under wine-making conditions,” *Appl. Environ. Microbiol.*, V.85, N7, 2019.

529. P. J. Verbelen, S. A. Depraetere, J. Winderickx, F. R. Delvaux, and F. Delvaux, “The influence of yeast oxygenation prior to brewery fermentation on yeast metabolism and the oxidative stress response,” *FEMS Yeast Res.*, V.9, N2, 2009.

530. E. N. Gromozova, S. I. Voychuk, and M. Sadovsky, “The process of complicated cooperative behaviour in the antibiotic-cell system,” in *NATO advanced research workshop “Molecular self-organization in micro-, nano, and macro dimensions: from molecules to water, to nanoparticles, DNA and Proteins” dedicated to A.S. Davydov 95th birthday. – June 8-12, 2008, Kyiv, Ukraine*, 2008, p. 162.

531. H. VanDen Bossche, P. Marichal, J. Gorrens, and M. C. Coene, “Biochemical basis for the activity and selectivity of oral antifungal drugs,” in *British Journal of Clinical Practice*, 1990, V.44, N9 SUPPL. 71.

532. P. D. Crowley and H. C. Gallagher, “Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future,” *Journal of applied microbiology*, V.117, N3. 2014.

533. С. И. Войчук and Е. Н. Громозова, “Изменение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам в присутствии электромагнитных полей,” in *Четвертый всероссийский конгресс по медицинской микологии, г. Москва, 24-25 марта*, 2006, pp. 164–165.

534. E. A. Izano *et al.*, “Poly-*N*-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*,” *Microb. Pathog.*, V.43, N1, 2007.

535. B. J. Chen, H. C. Causton, D. Mancenido, N. L. Goddard, E. O. Perlstein, and D. Pe’er, “Harnessing gene expression to identify the genetic basis of drug resistance,” *Mol. Syst. Biol.*, V.5, 2009.

536. S. I. Voychuk and O. M. Gromozova, “Influence of the radiofrequency electromagnetic field 40.68 MHz on adhesion of *Saccharomyces serevisiae* cells deficient in PPN1 polyphopshatase to dental alloys,” *Microbiol. Z.*, V.82, N3, pp. 3–13, 2020.

537. P. M. Lytvyn, E. N. Gromozova, S. I. Voychuk, Z. R. Ozhogan, O. M. Yakovyn, and I. V. Prokopenko, “The dental alloys complementary bioadhesive properties testing by physical and biological methods.,” in *The International Summer Scholl “Nanotechnology: from fundamental research to innovations” and International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2013)*, 2013, p. 391.

538. С. В. Маковій, С. І. Войчук, and О. М. Громозова, “Вплив електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону на адгезію дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*,” in *XI Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології», 15-19 квітня 2013, Львів.*, 2013, p. 148.

539. J. R. Norris and D. W. Ribbons, Eds., *Methods in Microbiology*, *Volume 1*. New York: Academic Press, 1969.

540. Ю. І. Сухоребський, З. Р. Ожоган, and О. С. Литвин, “Вплив методу литва на мікроструктуру стоматологічних Ni-Cr сплавів,” *Український стоматологічний альманах*, N1, pp. 26–30, 2007.

541. Ю. І. Сухоребський, З. Р. Ожоган, О. С. Литвин, and А. В. Гурін, “Вплив способу литва на структуру та корозійну стійкість стоматологічних Co-Cr сплавів,” *Український стоматологічний альманах*, N4, pp. 25–31, 2007.

542. D. Kregiel, J. Berlowska, and W. Ambroziak, “Adhesion of yeast cells to different porous supports, stability of cell-carrier systems and formation of volatile by-products,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, V.28, N12, 2012.

543. С. И. Войчук, Е. Н. Громозова, and Н. М. Жолобак, “Роль полифосфатаз эндо (PPN) и экзо (PPX) в процессах адгезии клеток дрожжей к клеткам млекопитающих,” *Проблемы медицинксокй микологии*, V.13, N2, pp. 68–69, 2011.

544. С. И. Войчук, Е. Н. Громозова, and Н. М. Жолобак, “Роль полифосфатаз в

процессах адгезии дрожжей к клеткам млекопитающих," in *Успехи медицинской микологии, Том XII / VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии. Москва, 8-10 апреля*, 2014, pp. 72–73.

545. R. L. Sandin, A. L. Rogers, R. J. Patterson, and E. S. Beneke, "Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells *in vitro*," *Infect. Immun.*, V.35, N1, 1982.

546. S. Brückner and H. U. Mösch, "Choosing the right lifestyle: Adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Microbiology Reviews*, V.36, N1. 2012.

547. R. G. Willaert, "Adhesins of yeasts: Protein structure and interactions," *Journal of Fungi*, V.4, N4. 2018.

548. S. He, B. K. Simpson, H. Sun, M. O. Ngadi, Y. Ma, and T. Huang, "*Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, V.58, N1, 2018.

549. C. Fred Brewer, R. D. Brown, and S. H. Koenig, "Metal ion binding and conformational transitions in concanavalin a: A structure-function study," *J. Biomol. Struct. Dyn.*, V.1, N4, 1983.

550. B. Nelson *et al.*, "Fus1p interacts with components of the Hog1p Mitogen-Activated Protein Kinase and Cdc42p Morphogenesis Signaling pathways to control cell fusion during yeast mating," *Genetics*, V.166, N1, 2004.

551. S. G. Martin, "Molecular mechanisms of chemotropism and cell fusion in unicellular fungi," *J. Cell Sci.*, V.132, N11, 2019.

552. І. А. Перетяжко and С. І. Войчук, "Вплив *Saccharomyces cerevisiae* дефектних за генами поліфосфатаз на цитоморфологічні властивості епітеліоподібних клітин ссавців," in *З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. Львів*, 2017, p. 143.

553. A. V. Shubin, I. V. Demidyuk, A. A. Komissarov, L. M. Rafieva, and S. V. Kostrov, "Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival," *Oncotarget*, V.7, N34, 2016.

554. M. J. Davies, "Protein oxidation and peroxidation," *Biochemical Journal*,

V.473, N7. 2016.

555. J. Arroyo, V. Farkaš, A. B. Sanz, and E. Cabib, "'Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity,'" *Cell. Microbiol.*, V.18, N9, 2016.

556. A. M. Ofiteru *et al.*, "Overexpression of the *PHO84* gene causes heavy metal accumulation and induces Ire1p-dependent unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae* cells," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V.94, N2, 2012.

557. Y. Zhang, S. S. Bharathi, M. E. Beck, and E. S. Goetzman, "The fatty acid oxidation enzyme long-chain acyl-CoA dehydrogenase can be a source of mitochondrial hydrogen peroxide," *Redox Biol.*, V.26, 2019.

558. F. Abe and T. Hiraki, "Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, V.1788, N3, 2009.

559. S. M. Thayil, N. Morrison, N. Schechter, H. Rubin, and P. C. Karakousis, "The role of the novel exopolyphosphatase MT0516 in *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and persistence," *PLoS One*, V.6, N11, 2011.

560. T. Matsumiya and T. Imaizumi, "How are STAT1 and cholesterol metabolism associated in antiviral responses?," *JAK-STAT*, V.2, N3, 2013.

561. C. D. Holyoak, D. Bracey, P. W. Piper, K. Kuchler, and P. J. Coote, "The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy- dependent mechanism," *J. Bacteriol.*, V.181, N15, 1999.

562. J. Hendry, G. Tan, J. Ou, C. Boone, and G. Brown, "Leveraging DNA damage response signaling to identify yeast genes controlling genome stability," *G3*, V.5, N5, pp. 997–1006, 2015.

563. T. A. Navas, Z. Zhou, and S. J. Elledge, "DNA polymerase ϵ links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint," *Cell*, V.80, N1, 1995.

564. J. Yale and H. J. Bohnert, "Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity," *J. Biol. Chem.*, V.276, N19, 2001.

565. M. Reidy, S. Kumar, D. E. Anderson, and D. C. Masison, "Dual roles for yeast

Sti1/Hop in regulating the Hsp90 chaperone cycle," *Genetics,* V.209, N4, 2018.

566. R. Gómez-Pastor, E. Garre, R. Pérez-Torrado, and E. Matallana, "Trx2p-dependent regulation of *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response by the Skn7p transcription factor under respiring conditions," *PLoS One,* V.8, N12, 2013.

567. M. A. Teste, M. Duquenne, J. M. François, and J. L. Parrou, "Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*," *BMC Mol. Biol.*, V.10, 2009.

568. A. Boorsma *et al.*, "Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast,* V.21, pp. 413–427, 2004.

569. C. Bai, M. Tesker, D. Melamed-Kadosh, D. Engelberg, and A. Admon, "Hog1-induced transcription of *RTC3* and *HSP12* is robust and occurs in cells lacking Msn2, Msn4, Hot1 and Sko1," *PLoS One,* V.15, N8 August, 2020.

570. M. Proft, A. Pascual-Ahuir, E. De Nadal, J. Arño, R. Serrano, and F. Posas, "Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress," *EMBO J.*, V.20, N5, 2001.

571. P. M. Alepuz, A. Jovanovic, V. Reiser, and G. Ammerer, "Stress-induced MAP kinase Hog1 is part of transcription activation complexes," *Mol. Cell*, V.7, N4, 2001.

572. M. Gomar-Alba, M. Á. Morcillo-Parra, and M. lí del Olmo, "Response of yeast cells to high glucose involves molecular and physiological differences when compared to other osmostress conditions," *FEMS Yeast Res.*, V.15, N5, 2015.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – *особистий внесок здобувача*)

Монографії (розділи)

1. Gromozova E.N., Voychuk S.I. Influence of radiofrequency EMF on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eukaryotic system // Biophotonics and Coherent Systems in Biology, L.V. Beloussov, V.L. Voeikov, V.S. Martynyuk, Printed in the USA by Springer Science Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. – 2007. – P. 167-175. (*Автором проведено дослідження з вивчення впливу на клітини дріжджів електромагнітного випромінювання ДВЧ-діапазону, здійснено аналіз літератури, узагальнення і представлення результатів дослідження*).

Статті у фахових виданнях

2. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Lytvyn P.M., Podgorsky V.S. Changes of surface properties of yeast cell wall under exposure of electromagnetic field (40.68 MHz) and action of nystatin // The Environmentalist. – 2005. – Vol. 25. – P. 139-144. (*Автором проведено підготовку і обробку клітин дріжджів різними видами стресів і для вивчення методом атомно-силової мікроскопії, здійснено аналіз літератури, узагальнення і представлення результатів дослідження*).
3. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Влияние излучений видеодисплейных терминалов на клетки эукариотического модельного организма *Saccharomyces cerevisiae* // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Серія: біологія. – 2007. – Вип. 5, № 768. – С. 52-56. (*Автором проведено дослідження впливу факторів, генерованих відеодисплейними терміналами, на фізіологічні показники росту клітин*

дріжджів, виконано статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів до друку).

4. Громозова О.М, Войчук С.І., Брюзгінова Н.В., Красов П.С., Масюк Б.Р. Розробка тест-системи для вивчення впливу різних типів електромагнітного випромінювання на біологічні об'єкти // Біологія та валеологія (Збірник наукових праць). Випуск 9. Харків 2007. – С. 25-30. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіологічні показники росту клітин дріжджів, виконано статистичну обробку даних і їх узагальнення*).
5. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л., Горчев В.Ф., Карахим С.А. Особенности стронения волютиновых гранул в клетках низших полифосфат-аккумулирующих эукариот // Биотехнология. – 2010. – №4. – С. 55-61. (*Автором проведено підготовку клітин дріжджів для вивчення структури волютинових гранул методом конфокальної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів дослідження*).
6. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Влияние космофизических факторов на реакцию метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* // Геофизические процессы и биосфера. – 2010. – № 2. – С. 67-76. (*Автором проведено статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).
7. Громозова Е.Н., Богатина Н.И., Брюзгинова Н.В., Качур Т.Л., Войчук С.И., Шейкина С.И., Григорьев П.Е. Проявление реакции метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* в условиях экранирования различными материалами // Питання біоіндикації та екології. – 2011. – Вип. 15, №2. – С. 232-244. (*Автором проведено підготовку клітин дріжджів для вивчення реакції метахромазії в умовах екранування, виконано статистичні аналізи*).
8. Babenko L.P., Zholobak N.M., Ahcherbakov A.V., Voychuk S.I., Lazarenko L.M., Spivak M.Ya. Antibacterial activity of cerium colloids against

opportunistic microorganisms *in vitro* // Мікробіол. журн. – 2012. – Т.74, №3. – С.54-62. (*Автором проведено підготовку клітин мікроорганізмів для вивчення методом трансмісійної електронної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів відповідного етапу дослідження*).

9. Voychuk S.I., Gromozova E.N. Microbial growth fluctuating in response to solar-terrestrial activity variations // Мікробіол. журн. – 2012. – Т. 74, № 3. – С. 63-71. (*Автором проведено дослідження ростових параметрів клітин дріжджів і відповідні статистичні аналізи для виявлення кореляційних залежностей із активністю космо-фізичних і гео-атмосферних чинників, виконано узагальнення і представлення результатів дослідження*).
10. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И., Рязанова Л.П., Кулаковская Т.В. Новые аспекты плейотропного действия генов, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Мікробіол. журн. – 2012. – Т. 74, № 5. – С.26-31. (*Автором проведено підготовку клітин дріжджів для вивчення функціональної ролі волютинових гранул, здійснено узагальнення результатів*).
11. Klochko V.V., Zelena L.B., Voychuk S.I., Ostapchuk A.M. Peculiarities of *Alteromonas macleodii* strains reflects their deep/surface habitation rather than geographical distribution // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 58. - P: 129-135. (*Автором проведено підготовку клітин бактерій для вивчення їх полісахаридного складу методом електронної мікроскопії, виконано статистичні аналізи, узагальнення і представлення результатів дослідження*).
12. Сафронова Л.А., Войчук С.И., Сухов Б.Г., Подгорский В.С. Цитотоксическое и ДНК-повреждающее действие пребиотических субстанций // Biotechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, № 6. – С. 86-93. (*Автором проведено вивчення цито- і генотоксичної дії пребіотичних субстанцій, проведено узагальнення і представлення результатів дослідження*).

13. Дронова М.Л., Войчук С.І., Вринчану Н.О. Ультраструктура *Escherichia coli* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів // Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 26-29. (*Автором проведено дослідження ултраструктури клітин бактерій, узагальнення і представлення результатів*).
14. Войчук С.И. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как модельный организм для исследования канцерогенности неионизирующих электромагнитных полей и излучений // Мікробіол. журн. – 2014. – Т. 76, № 1. – С. 53-61. (*Автором проведено аналіз літератури, узагальнення і представлення результатів до друку*).
15. Dronova M. L., Voychuk S.I., Vrynchanu N. O. Antibacterial activity of 1-[4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl) phenoxy] -3- (*N*-benzyl-4-methylpiperidine)-2-propanol chloride // Ukrainian Biopharmaceutical J. – 2015. – Vol. 6, № 41. – P: 92-97. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин мікроорганізмів методом електронної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів дослідження*).
16. Дудікова Д.М., Войчук С.І., Вринчану Н.О. Ультраструктура *Candida albicans* при дії 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(*N*-бензил, *N*-диметиламіно)2-пропанол хлориду // Вісник морфології. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 300-303. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин дріжджів роду Кандіда методом електронної мікроскопії, виконано узагальнення і представлення результатів дослідження*).
17. Суворова З.С., Войчук С.І., Вринчану Н.О. Ультраструктура *S. cerevisiae* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспирті // "Вісник Вінницького національного медичного університету". – 2016. – Т. 20, № 2. – С: 347-351. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин дріжджів сахароміцетів методом електронної мікроскопії, здійснено узагальнення і представлення результатів дослідження*).

18. Garmasheva I., Kovalenko N., Voychuk S., Ostapchuk A., Livins'ka O., Oleschenko L. *Lactobacillus* species mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against opportunistic pathogens *in vitro* // Bioimpacts. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P: 219-223. (*Автором проведено ультраструктурні цитоморфологічні дослідження клітин бактерій методом електронної мікроскопії, виконано узагальнення і представлення результатів дослідження*).
19. Громозова О.М., Качур Т.Л., Войчук С.І., Харчук М.С. Дослідження реакції метахромазії *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Z. – 2016. – Т. 78, № 3. – С. 45-51. (*Автором проведено статистичні аналізи, узагальнення і представлення результатів дослідження*).
20. Pidgorskiy V.S., Voychuk S.I., Gromozova E.N. The role of polyphosphates in the cell wall and cytoplasmic membrane reactions to the action of stress // Microbiol. Z. – 2017. – № 1. – C. 59-65. (*Автором проведено дослідження з вивчення будови клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани клітин дріжджів, виконано узагальнення щодо ролі поліфофатаз і представлення результатів для друку*).
21. Voychuk S.I., Zelena L.B., Gromozova E.N., Pidgorskyi V.S., Dumansky V.Yu. , Bezverkhaya A.P. The possible role of polyphosphatases in yeast sensitivity to electromagnetic fields of DCS-1800 // Cytology and Genetics. – 2017. - № 4. – P: 282-290. (*Автором проведено дослідження з вивчення фізіолого-біохімічних особливостей клітин дріжджів, здійснено узагальнення, статистичну обробку даних і представлення результатів для друку*).
22. Дудікова Д., Войчук С., Вринчану Н. Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(n-бензил, n-диметил аміно)-2-пропанол хлориду на *Pseudomonas spp*. // ScienceRise: Biological Science. – 2018. – Vol. 4, № 13. – P: 35-41. (*Автором проведено дослідження ультраструктури клітин бактерій, здійснено узагальнення і представлення результатів*).

23. Skrotskyi S., Voychuk S., Khomenko L., Vasyliuk O., Pidgorskyi P. Influence of nanoparticles on the solventogenesis of bacteria *Clostridium beijerinckii* IMV B-7806, *Clostridium acetobutylicum* IMV B-7807 // Ukrainian Food Journal. – 2019. – Vol. 8, № 1. – P: 110-118. (*Автором проведено дослідження ультраструктури клітин бактерій під дією наночасток, узагальнення і представлення результатів*).
24. Voychuk S.I., Gromozova O.M. The functional role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases under stresses action and for adaptive response development // Microbiol. Z. – 2020. – T. 82, № 1. – C. 3-12. (*Автором проведено дослідження чутливості клітин дріжджів до дії різних стресових чинників, узагальнення щодо ролі поліфосфатаз і представлення результатів до друку*).
25. Voychuk S.I., Gromozova O.M. The role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases in the stress-induced changes of the polysaccharide composition of cell wall and extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* cells // Microbiol. Z. – 2020. – T. 82, № 2. – C. 3-13. (*Автором проведено дослідження щодо будови позаклітинного матриксу і клітинної стінки, чутливості клітин дріжджів до дії різних стресових чинників, здійснено узагальнення щодо ролі поліфосфатаз і представлення результатів до друку*).
26. Voychuk S.I., Gromozova O.M. Influence of the radiofrequency electromagnetic field 40.68 MHz on adhesion of *Saccharomce serevisiae* cells deficient in PPN1 polyphopshatase to dental alloys // Microbiol. Z. – 2020. – T. 82, № 3. – C. 3-13. (*Автором проведено дослідження щодо адгезивних властивостей клітин дріжджів під дією фізичних чинників стресу, статистичні аналізи, узагальнення щодо ролі поліфосфатаз і представлення результатів до друку*).
27. Safronova L.A., Voychuk S.I., Brovarska O.S. Influence of nanobiocomposites on the exopolysaccharide matrix of *Bacillus* strains // Доповіді НАН України. – 2020. – T. 8. – C. 81-91. (*Автором проведено дослідження будови позаклітинного матриксу клітин бактерій в результаті дії на них*

нанобіокомпозитів, визначено цитотоксичність нанобіокомпозитів, запропоновано гіпотетичні структурні формули полісахаридів бактерій, здійснено узагальнення і представлення результатів).

Статті в інших виданнях

28. Підгорський В.С., Громозова О.М., Войчук С.І., Щеголева Т.Ю., Брюзгінова Н.В., Масюк Б.Р. Тест-система на основі клітин дріжджів для експрес-аналізу дії електромагнітних випромінювань за допомогою КВЧ-діелектрометрії // Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій / За ред. Г.В. Єльскької, В.Д. Походенка. – Київ: Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України, 2006. – С. 165-172. (*Автором проведено дослідження з вивчення чутливості клітин дріжджів до електромагнітного випромінювання НзВЧ-діапазону, виконано відповідну статистичну обробку даних, оцінку і представлення результатів*).
29. Щеголева Т.Ю., Громозова Е.М., Войчук С.И., Брюзгинова Н.В., Масюк Б.Р., Красов П.С. Разработка тест-систем для изучения влияния электромагнитного излучения на биологические объекты // Радиофизика и электроника. – 2008. – Т. 13, № 3. – С. 568–571. (*Автором проведено дослідження впливу електромагніного випромінювання на фізіологічні і біохімічні показники росту клітин дріжджів, статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).
30. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Sadovskiy M.G. The model of fungal population dynamics affected by nystatin // Int J Quant Chem. – 2010. – Vol. 110, Issue 1. – P: 242-251. (*Автором проведено дослідження з чутливості клітин дріжджів до ністатину, узагальнення і представлення результатів до друку*).
31. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И., Григорьев П.Е. Результаты длительного мониторинга био-астрономического эффекта Чижевского-Вельховера // Физика сознания и жизни, космология и астрофизика. –

2011. – № 4. – С.12-14. (*Автором проведено статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).

32. Gromozova E., Voychuk S.I., Vishnevsky V., Ragulskaya M., Grigor'ev P. Cosmic rays as bio-regulator of deep time terrestrial ecosystems // Sun and Geosphere. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P:117-120. (*Автором виконано статистичну обробку даних, узагальнення і представлення результатів*).
33. Gromozova E.N, Voychuk S.I. Zelena L.B, Gretckey I.A. Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation // Safety Engineering. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P: 89-92. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів, здійснено узагальнення і представлення результатів до друку*).
34. Gromozova E.N, Voychuk S.I. Zelena L.B, Gretckey I.A. Microorganisms as a model system for studying the biological effects of electromagnetic non-ionizing radiation // Proceedings "The first international conference on radiation and dosimetry in various fields of research", Apr. 25-27, 2012, Niš, Serbia. – P: 137-139. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів, виконано узагальнення і представлення результатів до друку*).
35. Voychuk S.I., Ostapchuk A.M., Gromozova E.N. Effects of electromagnetic field and nystatin on *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid composition // Proceedings: The Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research (RAD 2014), May 27-30, 2014, Niš, Serbia. – P: 223-226. (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на склад жирних кислот клітин дріжджів, узагальнення і представлення результатів до друку*)

Патент на корисну модель

36. Корисна модель. Заявка № u 2011 01839 від 17.02.2011 р. Патент на корисну модель №62414 від 25.08.2011 р. Громозова О.М.,

Щеголева Т.Ю., Підгорський В.С., Войчук С.И., Брюзгінова Н.В «Оцінка впливу електромагнітного випромінювання методом Біо-КВЧ-діелектрометрії» (*Автором проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання на фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів*)

Тези доповідей

37. Подгорский В.С., Громозова Е.Н., Войчук С.И. Дрожжевые клетки как альтернативные объекты изучения влияния на потребителя физических факторов видеодисплейных терминалов // Тез. 2-го Міжнародного симпозіуму "Біоетика – шлях до світових стандартів", Харків, 4-7 жовтня 2005. - С. 43.
38. Громозова Е.Н., Войчук С.И. Гелиофизическая активность и устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков // Международный Симпозиум "Гелио-геофизические факторы и здоровье человека", Новосибирск, Центр клинич. и эксперим. медицины РА Мед. Наук, 15 - 16 ноября 2005. – С. 132
39. Подгорский В.С., Громозова Е.Н., Войчук С.И. Микроорганизмы как биосенсоры космофизических воздействий // Тез. 6-й Международной конференции "Космос и биосфера: Космическая погода и биологические процессы", Партенит, Крым, 26 сентября - 1 октября 2005. – С. 202.
40. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Изменение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам в присутствии электромагнитных полей / Четвертый всероссийский конгресс по медицинской микологии, г. Москва, 24-25 марта 2006. // «Успехи медицинской микологии», под ред. Ю.В. Сергеева. – М: Нац. Акад. Микологии, 2006. – Т. 7, глава 6. – С. 164-165.
41. Войчук С.И., Громозова Е. Н. Биологическое действие физических факторов видеодисплейных терминалов и радиочастотного электромагнитного поля // IV Международный Конгресс "Слабые и сверслабые поля и излучения в биологии и медицине"**,** 3-7 июля 2006, г. Санкт-Петербург. – С. 104.

42. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Podgorskiy V.S. Use of a model organism for an estimation of action of the physical factors of videodisplay terminals // Proceedings: 4th International Workshop "Biological Effects of EMFs", 16-20 October 2006, Crete, Greece. – P. 135-138.
43. Voychuk S.I., Gromozova E.N., Podgorskiy V.S. EMFs generated by video display terminals and EMF by frequency 40.68 MHz have opposite effects on viability of organisms // Book of Abstracts: 28th International Congress on Occupational Health, Milan, Italy, 11-16 June 2006. – P. 255.
44. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Изменение физиолого-биохимических свойств клеток *Sacchromyces cerevisiae* при слабых гравитационных вариациях вызваных процедурой центрифугирования / V Всероссийский Конгресс по Медицинской Микологии, Москва, Россия 24-25 марта 2007 // «Успехи медицинской микологии», под ред. Ю.В.Сергеева. – М: Нац. Акад. Микологии, 2006. – Т. 9, глава 1. – С. 6.
45. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л., Лычак М.М., Шевченко В.Н. Связь метахромазии волютиновых зерен *Saccharomyces cerevisiae* с гелиофизическими факторами // VII Международная крымская конференция «Космос и Биосфера», - Судак, Крым, Украина 1-6 октября 2007. – С. 103-104.
46. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л Связь явления метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* с гелиофизическими факторами // Кулаевские чтения по полифосфатам, 30 июня 2008, г. Пущино-на-Оке, Россия. – С.17.
47. Войчук С.И., Громозова Е.Н. Влияние центрифугирования на физиолого-биохимическое состояние клеток дрожжей // Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии, 2008. – С. 272.
48. Gromozova E., Voychuk S., Sadovsky M. The process of complicated cooperative behaviour in the antibiotic-cell system // Book of Abstracts: NATO advanced research workshop “Molecular self-organization in micro-, nano, and

macro dimensions: from molecules to water, to nanoparticles, DNA and Proteins" dedicated to A.S. Davydov 95th birthday. – June 8-12, 2008, Kyiv, Ukraine. – P. 162.

49. Громозова Е.Н., Войчук С.И. Дрожжевые клетки – как объекты изучения биологического действия электромагнитного излучения // Труды IV Междунар. Науч. Конф. «Электромагнитные излучения в биологии. Био-ЭМИ-2008». – Калуга, Россия, 21-23 октября 2008 г. – С. 109-113.
50. Gromozova E.N., Voychuk S.I., Kachur T.L. Research of structural features of volutine granules of *Saccharomyces cerevisiae* Y-517 by the method of confocal microscopy // 12th International Congress on Yeasts, 11-15 August 2008, Kyiv, Ukraine. – P. 219
51. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Качур Т.Л. Стохастичность биологического действия электромагнитных излучений // 5-й Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 29.06.2009-03.07.2009, Россия. – С. 124.
52. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И. Клеточные неорганические полифосфаты как акцепторы осцилляций геокосмических факторов // 5-й Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 29.06.2009-03.07.2009, Россия. – С. 166.
53. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Остапчук А.Н., Клочко В.В. Изменение пула жирных кислот в клетках дрожжей под действием внешних факторов стресса // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – № 1, 2009. – С. 19-20.
54. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л. Влияние космической погоды и антропогенного электромагнитного излучения на чувствительность дрожжевых клеток к антибиотикам // VI Международный симпозиум «Актуальные проблемы биофизической медицины», Киев 14-17 мая 2009г., Украина. – С. 33.

55. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И. Поиск факторов, вызывающих реакцию метахромазии волютиновых гранул дрожжевых клеток // Тезисы докладов: VIII Международная крымская конференция «Космос и Биосфера», Судак, Крым, Украина, 28 сент. - 3 окт., 2009. – С. 70-71.
56. Войчук С.І., Громозова О.М., Підгорський В.С. Вплив антропогенного електромагніт-ного випромінювання на клітини дріжджів // XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 24-30 травня 2009 р., Ужгород, Україна. – С. 41.
57. Громозова О.М., Качур Т.Л., Войчук С.І. Космічна погода та життєдіяльність мікроорганізмів. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 24-30 травня 2009 р., Ужгород, Україна. – С. 107.
58. Громозова О.Н., Григор'єв П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.І. Сучасний погляд на біо-астрономічний ефект Чижевського-Вельховера // Международная конференция, посвященная 165-летию обсерватории КГУ и 105-летию С.К. Всесвятского, 24-28 мая 2010 г., г. Киев, Украина. – С.17.
59. Gromozova E.N., Grigoryev P.Ye., Kachur T.L., Voychuk S.I. An influence of geocosmic and meteorological factors on the reaction of metachromasy of volutin granules of *Saccharomyces cerevisiae* // 9th Int. Mycological Congress "The Biology of Fungi", 1-6 Aug. 2010, Edinburgh, UK.
60. Громозова Е.Н., Богатина Н.И., Брюзгинова Н.В., Качур Т.Л., Войчук С.И., Щейкина Н.В. Проявление реакции метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* в условиях экранирования различными материалами // XI Международная Конференция по Бионике, Биокибернетике и Прикладной Биофозике, 4-6 ноября 2010, г. Киев, Украина. – С. 33-34.
61. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Реакция метахромазии как модельная система для изучения механизмов взаимодействия клетки с космо-физическимим факторами // XI

Международная Конференция по Бионике, Биокибернетике и Прикладной Биофизике, 4-6 ноября 2010г, Киев, Украина. – С. 34-35.

62. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Реакция метахромазии как модельная система для изучения механизмов воздействия космических факторов на клетки // Международный междисциплинарный симпозиум «Нанотехнология и ноосферология в контексте системного кризиса цивилизации», Симферополь, Ялта, 4-10 января 2011г. – С.43-45.
63. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Жолобак Н.М. Роль полифосфатаз эндо (PPN) и экзо (PPX) в процессах адгезии клеток дрожжей к клеткам млекопитающих // Проблемы медицинксокй микологии. – 2011, 13(2). – С. 68-69.
64. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Качур Т.Л. Влияние условий культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на результаты реакции метахромазии волютиновых гранул // Международная крымская конференция «Космос и биосфера», Алушта, 5-10 октября 2011г. – С. 174-175.
65. Voychuk S.I., Zelena L.B., Gromozova E.N., Pidgorskyi V.S. *Saccharomyces cerevisiae* genomic instability under exposure to mobile phones radiation of DCS-1800MHz // 19th Annual Southeastern Regional Yeast Meeting, 24-26 February 2012, Emory University, Atlanta, Georgia, USA. – P.110.
66. Zelena L., Voychuk S., Oblap R., Gromozova E. Expression of flo11 gene in *Saccharomyces cerevisiae* under influence of high frequency electromagnetic radiation // Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting. July 31-August 5, 2012.Princeton, New Jersey, USA. – P.146.
67. Громозова Е.Н., Качур Т.Л., Войчук С.И., Григорьев П.Е. Биоиндикация факторов космической погоды // Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», 11-16 июня 2012, г. Санкт-Петербург, Россия. С.149.

68. Войчук С.И., Зеленая Л.Б., Громозова Е.Н. Роль генов полифосфатаз *ppn1* и *ppx1* в устойчивости клеток дрожжей к действию стрессовых факторов // Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», 11-16 июня 2012, г. Санкт-Петербург, Россия. – С.141.
69. Громозова Е.Н., Войчук С.И., Зеленая Л.Б., Подгорский В.С. Влияние неионизирующего ЭМИ на стрессовые реакции *Saccharomyces cerevisiae* // Междисциплинарная научная конференция «Адаптационные стратегии живых систем», 11–16 июня 2012, Новый Свет, Крым, Украина. – С. 235.
70. Маковій С.В., Войчук С.І., Громозова О.М. Участь генів поліфосфатаз PPN і PPX в адаптації дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до дії стресових факторів // IX Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології», 15-19 квітня 2013, Львів. – С.71.
71. Маковій С.В., Войчук С.І., Громозова О.М. Вплив електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону на адгезію дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // XI Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології», 15-19 квітня 2013, Львів. – С.148.
72. Сафронова Л.А., Войчук С.И., Лесничая М.В., Сухов Б.Г., Подгорский В.С., Трофимов Б.А. Исследование цитотоксической и генотоксической активности галактосодержащих полисахаридов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии. – 2013. – С. 94–95.
73. Lytvyn P.M., Gromozova E.N., Voychuk S.I., Ozhogan Z.R., Yakovyn O.M., Prokopenko I.V. The dental alloys complementary bioadhesive properties testing by physical and biological methods. Abstract book. The International Summer Scholl “Nanotechnology: from fundamental research to innovations” and International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2013). August 25-September 1, 2013 / Ed. by Prof. Leonid Yatsenko. – Lviv: Eurosvit, 2013 – P: 391.
74. Сафронова Л.А., Войчук С.И., Пуриш Л.М., Сухов Б.Г., Подгорский В.С. Биологическая ативность новых пребиотических субстанций на основе

нанобиокомпозитов с полисахаридами // XIII З'їзд Товариства Мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 1-6 жовтня 2013, Ялта. – С. 323.

75. Ragulskaya M., Gromozova EN., Voychuk SI., Kachur TL. Ancient cellular structures and modern humans: change of survival strategies before prolonged low solar activity period // 40th COSPAR Scientific Assembly, Moscow, Russia from 2 - 10 August 2014. – F3.3-22-14 (ADS: 2014cosp...40E2686R).
76. Войчук С.И., Громозова Е.Н., Жолобак Н.М. Роль полифосфатаз в процессах адгезии дрожжей к клеткам млекопитающих // Успехи медицинской микологии, Том XII / VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии. Москва, 8-10 апреля 2014. – С. 72-73.
77. Gromozova E., Voychuk S., Gretsky I., Dybkova S., Zholobak N. Genetic effects of non-ionizing electromagnetic fields action // Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2015, June 8-12, 2015, Budva, Montenegro. – P. 125.
78. Voychuk S., Gromozova E., Pidgorskiy V. Yeast cell wall polysaccharide content under action of RF EMF and chemical stresses // Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2016, May 23-27, 2016, Niš, Serbia. – P. 152.
79. Бойко І.П., Войчук С.І. Визначення полісахаридного складу клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою лектинів, мічених колоїдним золотом // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ», м. Київ, 22 квітня 2016. – С. 111.
80. Литвиненко Д.М., Войчук С.І., Громозова О.М., Маринченко Л.В. Вплив СВЧ опромінення та концентрації бутанолу на синтез полярних та нейтральних ліпідів // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ», м. Київ, 22 квітня 2016. – С. 128

81. Peretiazhko I.A., Voychuk S.I. Influence of stress factors on initiation of apoptosis in strains defective on polyphosphatases PPN1 and PPX1 // 2nd International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development outlook in the 21st Century”, Kyiv: DIA, 14-15 April 2016. – P. 82-83.
82. Перетяжко І.А., Войчук С.І. Вплив *Saccharomyces cerevisiae* дефектних за генами поліфосфатаз на цитоморфологічні властивості епітеліоподібних клітин ссавців // З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. Львів, 2017. – С. 143.
83. Voychuk S.I. Induction of Adaptive Response in Yeast Cells under Influence of Extremely High Frequency Electromagnetic Field // Conference Proceedings of ICEA 2017: 19th International Conference on Electromagnetics and Applications, Rome Italy May 04-05, 2017 / In International Journal of Electronics and Communication Engineering. – 2017, 4(5). – P. 112.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

вул. Немировича-Данченка, 2, м. Київ, 01011, тел./факс: 280-05-12, тел. 256-84-23
E-mail: knutd@knutd.edu.ua Web: http://www.knutd.edu.ua Код ЄДРПОУ 02070890

02.02.2021 № 06-73/137 На № _____ від _____

АКТ
впровадження результатів наукового дисертаційного дослідження у навчальний процес

На базі кафедри біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну в період з 01.11.2020 р. по 01.12.2020 р. в навчальний процес підготовки фахівців спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» бакалаврського (освітня програма – Біотехнологія) та магістерського (освітня програма – Біотехнологія високомолекулярних сполук) рівнів впроваджені результати наукового дисертаційного дослідження Войчука Сергія Івановича на тему «Молекулярно-генетичні та біохімічні шляхи реалізації ефектів дії стресових факторів на структурні компоненти клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів».

З дисципліни «Загальні мікробіологія та вірусологія» 12.11.2020 р. проведено лекційне заняття для студентів груп ББТ-18 та ББТск-19 на тему «Вплив факторів зовнішнього середовища на мікроорганізми».

З дисципліни «Сучасні біотехнології високомолекулярних сполук» 12.11.2020 р., 26.11.2020 р. проведено серію лабораторних робіт для групи МгБТ-20, які включали дослідження з оптимізації процесів синтезу продуктів мікробного походження факторами фізико-хімічної природи згідно розділів 3 і 4 дисертаційної роботи: «Морфолого-структурні і фізіолого-біохімічні особливості реакції клітин мікроорганізмів на дію факторів стресу» і «Вивчення компонентного складу зовнішніх клітинних оболонок клітин дріжджів під дією факторів стресу».

Використання результатів наукового дисертаційного дослідження Войчука Сергія Івановича забезпечило формування сучасних наукових знань під час підготовки фахівців-біотехнологів.

Проректор з науково-педагогічної діяльності
(освітня діяльність) КНУТД О. Б. Моргулець

Виконавець Мокроусова О. Р.,
тел. 050-463-95-97

ДОДАТОК 3

УКРАЇНА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

03056, м. Київ, пр-т Перемоги, 37; тел. (+38 044) 204-94-52 тел./факс (+38 044) 204-83-12
http://biotech.kpi.ua e-mail: biotech@kpi.ua ЄДРПОУ 02070921

28.01.21р № 3300/2-06
на № _____ від _____

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
В.о. декана факультету біотехнології і біотехніки
Національного технічного університету України
«КПІ імені Ігоря Сікорського»
д.б.н., проф. _____ Олексій ДУГАН

АКТ
про впровадження результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Дійсним актом підтверджується впровадження результатів дисертаційної роботи заступника директора з наукової роботи Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Войчука Сергія Івановича на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія на тему «Молекулярно-генетичні та біохімічні шляхи реалізації ефектів дії стресових факторів на структурні компоненти клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів» у навчальний процес студентів, що навчаються за програмами підготовки бакалавра та магістра спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» на факультеті біотехнології і біотехніки.

Отримані в результаті виконання дисертаційної роботи наукові та науково-методичні дані щодо біологічних механізмів формування стійкості мікробних клітин до дії чинників стресу фізичної і хімічної природи використані в рамках лекційних та лабораторних занять з дисциплін «Генетика», «Загальна мікробіологія та вірусологія» та «Теорія і практика біотехнологічного експерименту».

Відповідальна за впровадження:
Завідувач кафедри промислової
біотехнології , д.т.н., доц. Тетяна ТОДОСІЙЧУК

ДОДАТОК 4.

Відкритий
міжнародний *УНІВЕРСИТЕТ*
розвитку людини *"УКРАЇНА"*

Open
International *UNIVERSITY*
of Human Development *"UKRAINE"*

«16» 12 2020 р № 30

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біомедичних технологій
Університету "Україна
_____В.О. Мовчан

АКТ
про впровадження результатів дослідження
Войчука Сергія Івановича у навчальний процес

Основні положення, висновки і пропозиції дисертаційної роботи заступника директора з наукової роботи Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Войчука Сергія Івановича на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія на тему «Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів» впроваджені у навчальний процес із викладання дисциплін «Метаболізм мікроорганізмів» і «Агромікробіологія» для підготовки студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за спеціальністю «091 Біологія» спеціалізації «Мікробіологія; імунологія» та дисципліни «Метаболізм мікроорганізмів з основами промислової мікробіології» для підгототовки студентів другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю «091Біологія» зі спеціалізації «Мікробіологія - імунологія» в Інституті біомедичних технологій Відкритого міжнародного Університету розвитку людини "Україна" на кафедрі мікробіології, сучасних біотехнології та імунології. Впровадження відповідних матеріалів передбачає ознайомлення майбутніх фахівців спеціальності «091Біологія» з біологічними механізмами формування стійкості мікробних клітин до дії чинників стресу фізичної і хімічної природи.

Завідувачка кафедри мікробіології,
сучасних біотехнології та імунології
Інституту біомедичних технологій
Університету «Україна»
доктор біологічних наук, професор Т.І. Тугай

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ

ДОДАТОК 5.

«Затверджую»
Директор ДУ «Інститут фармакології та
токсикології НАМН України»
член. -кор. НАМН України
_____ Г.А. Бухтіарова
« 18 » 03 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень Войчука С.І.
в наукову-дослідну роботу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** *«Методи виділення загальної ДНК і РНК з клітин мікроорганізмів і фотоколориметричне визначення цукрового складу клітинної стінки мікроорганізмів з використанням лектинів мічених колоїдним золотом»*

2. **Установа-розробник, автор:** Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, заступник директора з наукової роботи, здобувач.

3. **Джерело інформації:** Матеріали дисертаційної роботи Войчука С.І. *«Механізми дії стресових факторів на біосинтез компонентів клітинної стінки, позаклітинного матриксу та цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів»*, статті, тези:

- Voychuk S.I., Gromozova O.M. The role of PPN1 and PPX1 polyphosphatases in the stress-induced changes of the polysaccharide composition of cell wall and extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Mikrobiol. Z. 2020, 82(2):3-13.
- Safronova L.A., Voychuk S.I., Brovarska O.S. Influence of nanobiocomposites on the exopolysaccharide matrix of Bacillus strains. Dopov. Nac. Akad. Nauk Ukr. 2020. 8:81-91.
-Voychuk S., Gromozova E., Pidgorskiy V. Yeast cell wall polysaccharide content under action of RF EMF and chemical stresses // Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2016, May 23-27, 2016, Niš, Serbia. - P.152.
- Бойко І.П., Войчук С.І. Визначення полісахаридного складу клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою лектинів, мічених колоїдним золотом // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», НТУУ «КПІ», м. Київ, 22 квітня 2016. – С. 111.

- Gromozova E., Voychuk S., Gretsky I., Dybkova S., Zholobak N. Genetic effects of non-ionizing electromagnetic fields action // Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2015, June 8-12, 2015, Budva, Montenegro. - P.125.

4. **Де і коли впроваджено:** В лабораторії фармакології протимікробних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» у практичній роботі при проведенні наукових досліджень за темою *«Вивчення особливостей формування біоплівок Pseudomonas aeruginosa та Quorum Sensing регуляції за дії похідних адамантану»* (АМН 05.21, державний реєстраційний номер 012109291).

5. **Результати застосування:** Комісія під головуванням завідувача лабораторії фармакології протимікробних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» підтверджує, що запропоновані методи виділення ДНК/РНК з клітин мікроорганізмів і визначення цукрового складу клітинної стінки мікроорганізмів використовуються при виконанні досліджень за темою *«Вивчення особливостей формування біоплівок Pseudomonas aeruginosa та Quorum Sensing регуляції за дії похідних адамантану»*. Застосування результатів наукових досліджень Войчука С.І. дозволяють деталізувати механізми антимікробної дії похідних адамантану щодо планктонних клітин та біоплівкових мікроорганізмів.

6. **Зауваження та пропозиції:** *не внесено*

Обговорено та затверджено на засіданні лабораторії фармакології протимікробних засобів, протокол № 3 від «17» березня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

м.н.с. лабораторії фармакології протимікробних засобів засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» Н.І. Гринчук

Завідувач лабораторії фармакології протимікробних засобів засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», д.мед.н. Н.О. Вринчану

ДОДАТОК 6.

Штами мікроорганізмів використані в дослідженні

А. Штами дріжджів дефектні за поліфосфатазами PPN1 і PPX1

Таблиця. Особливості генотипу клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* отриманих з лабораторії під керівництвом д.б.н. І.С. Кулаєва, інституту біохімії і фізіології мікроорганізмів ім. Скрябіна (Пущіно, Росія).

Штам	Генотип	Посилання
CRY	*MAT*a *ade2 his3 leu2 trp1 ura3*	[375]
CRN	*MAT*a *ade2 his3 ura3 ppn1Δ*::*CgTRP1*	[259]
CRX	*MAT*a *ade2 his3 trp1 ura3 ppx1Δ*::*LEU2*	[375]
CNX	*MAT*a *ade2 his3 ura3 ppn1Δ*::*CgTRP1* *ppx1Δ*::*LEU2*	[259]

Талиця. Особливості генотипу клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* отриманих з лабораторії д.б.н. А. Корона, Ягелонського Університету (**ЯУ**) (Краків, Польща).

Код штаму	Номер штаму в колекції ЯУ	Тип	Генотип
C1	**024-60***	**Wt**, аналог BY4742	*MATα* his3 leu2 lys2 ura3 +
C2	**024-59***	**Wt**	MATa his3 leu2 lys2 ura3 +
C3	**024-57***	**Wt**, аналог BY4741	MATa his3 leu2 + ura3 met15
C4	**025-72**	***Δ*PPN1**	*MATα his3 leu2 lys2 ura3 + ppn1Δ::NatMX4*
C5	**025-70**	***Δ*PPN1**	*MATa ppx1Δ::KanMX4*
C6	**025-71**	***Δ*PPX1**	MATa *his3 leu2 lys2 ura3 + ppn1Δ::NatMX4*
C7	**025-74**	***Δ*PPX1**	*MATα ppx1Δ::KanMX4*
C8	**025-76**	***Δ*PPN1/PPX1**	*MATα ppn1Δ::NatMX4 ppx1Δ::KanMX4*
C9	**025-77**	***Δ*PPN1/PPX1**	*MATα ppn1Δ::NatMX4 ppx1Δ::KanMX4*

С10	**025-78**	**⊿PPN1/PPX1**	*MATa ppn1⊿::NatMX4 ppx1⊿::KanMX4*

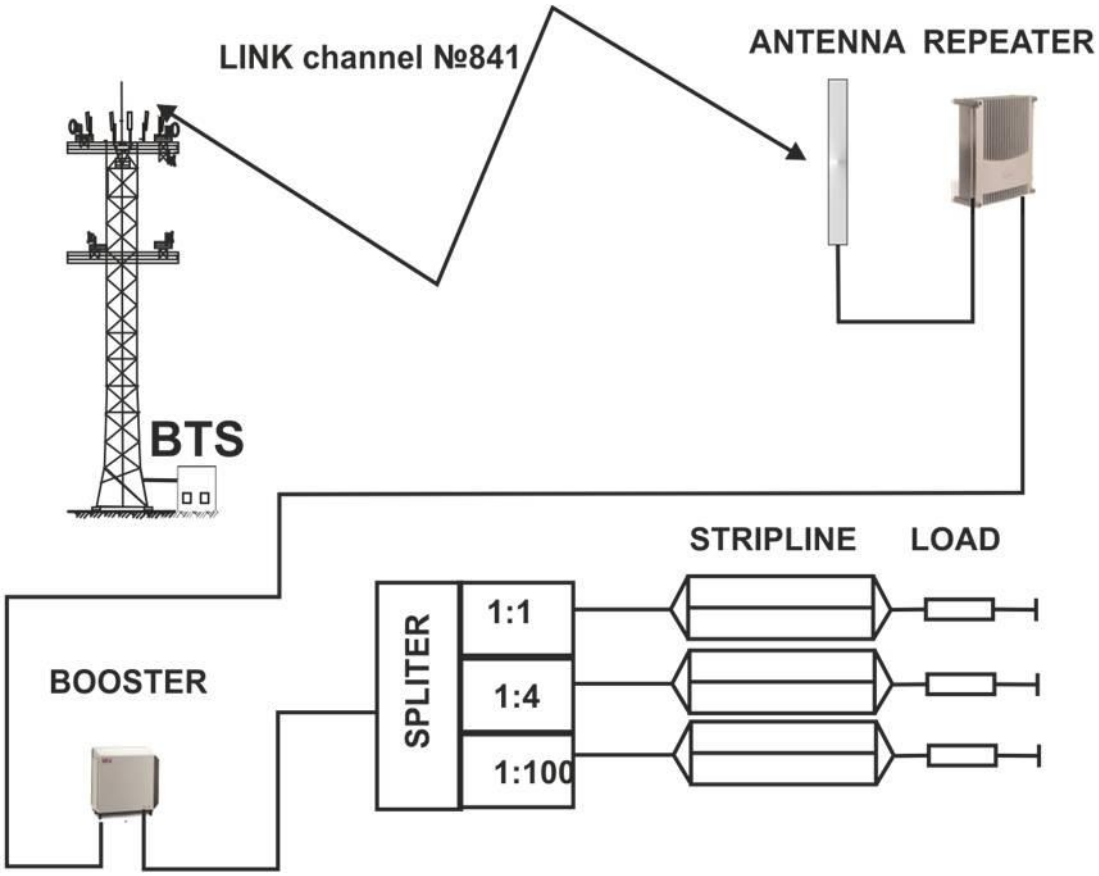
Б. Штами дріжджів S. cerevisiae для вивчення процесів індукованого мутагенезу і рекомбінації

Штам	Генотип	Призначення
ПГ-60	MAT*α* ade1-ade2 (чутливий до УФ-випромінювання)	Індукція мітотичної рекомбінації
1-ПГ-61	MAT*α* rad2 (чутливий до УФ-випромінювання)	Для вивчення індукції прямих мутацій
1-ПГ-80	MAT*α* rad54 (чутливий до гамма-випромінювання)	
ПГ-155 (Т2)	MATa/*α* ade2-192ade2-G45rad2 rad2 (чутливий до УФ-випромінювання)	Для вивчення індукції мітотичного кросинговеру

Рис.. Зміна кольору колоній тестових штамів *S. cerevisiae* при виникненні порушень в структурі ДНК.

ДОДАТОК 7.

Схема випромінювача стандарту GSM-1800



Джерелом електромагнітного випромінювання слугував канально-селективний передавач AR2100 (Allong Systems AB, Швеція) з підсилювачем потужності 20 дБ і смугою частот UL 1710-1785 СГц, та смугою частот DL 1850-1880 МГц. Смуга пропускання фільтру стновлиа 200 КГц. Вихідна потужність +33 дБм. Канал зв'язку №841 з частотою 1871 МГц цифрових систем зв'язку стандарту GSM-1800 був наданий оператором мобільного зв'язку АТ «Київстар» (Київ, Україна).

Позначення на схемі:

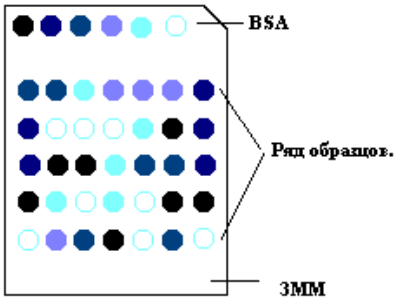
- **BTS –** базова станція телефонного зв'язку;
- **Antenna –** антена телефонного зв'язку;
- **Repeater** – передавач сигналу AR2100 (Allong Systems AB, Швеція);
- **Booster** – підсилювач потужності сигналу LGP01002 GSM 1800 з джерелом живлення 48 В постійного струму (LGP Telecom AB, Швеція);
- **Splitter** – розгалужувач з трьома виходами і розподілом за потужністю 1:1, 1:4 і 1:100 для трьох смугових ліній (striplines).
- **Stripline** – смугові лінії для опромінювання дослідних зразків, встановлені в безехових радіочастотних камерах.

Визначення концентрації білку (10 нг – 10 мкг) на папері

Найбільш зручний метод, коли мова йде про оцінку концентрації білка в великій кількості зразків (наприклад, фракції з колонки). Забарвлення 0,5-1 мкл зразку детектується і помітно змінюється в діапазоні від 10 мкг/мл (тобто 10 нг – 10 мкг у краплині) для BSA. Якщо на папері плям немає, то, швидше за все, і на гелі після фореза нічого видно не буде (а значить, таку пробу потрібно преципітувати перш ніж використовувати для гель-електрофорезу).

- **Основной недостаток метода** - низкая точность оценки количества белка: зависимость экспоненциальная и линейная зависимость прослеживается при концентрациях ниже 2мг/мл.
- **Достоинства** - быстро, просто, дёшево, позволяет анализировать одновременно десятки образцов. Очень слабо чувствителен к раствору, в котором находится белок. Этот метод - альтернатива точных методов, когда речь идет об измерении концентрации белка, растворенного в неудобном буфере.

ПРОЦЕДУРА:



1. на бумагу нанести ряд 2х кратных разведений BSA (по ~1µl).
2. нанести образец:
   качественная оценка в ряде образцов:
   нанести ряд образцов (по ~1µl)
   количественное измерение:
   нанести 2х разведения измеряемого белка (по 1µl)
3. высушить *open air* 5мин, либо 65°C 10мин.
4. смочить в ацетоне, высушить.
5. красить 5мин в Staining Solution (*если окраски нет, приготовьте свежий ра-р кумасси*), отмывать в проточной воде или Dest. solution 5-15мин (*степень отмывки контролировать визуально*).
6. высушить, вклеить в журнал.

РАСТВОРЫ: *хранить при NT в плотно закрытой посуде*

Staining solution

	Конц.	Сток	100ml
Coomassie Blue R250	0.25%	тв.	0.25g
Метанол	45%	100%	45ml
H_2O	45%	mQ	45ml
Уксусная к-та	10%	ледяная	10ml

- Растворять краситель на бактериальном шейкере, затем фильтровать через бумажный фильтр.

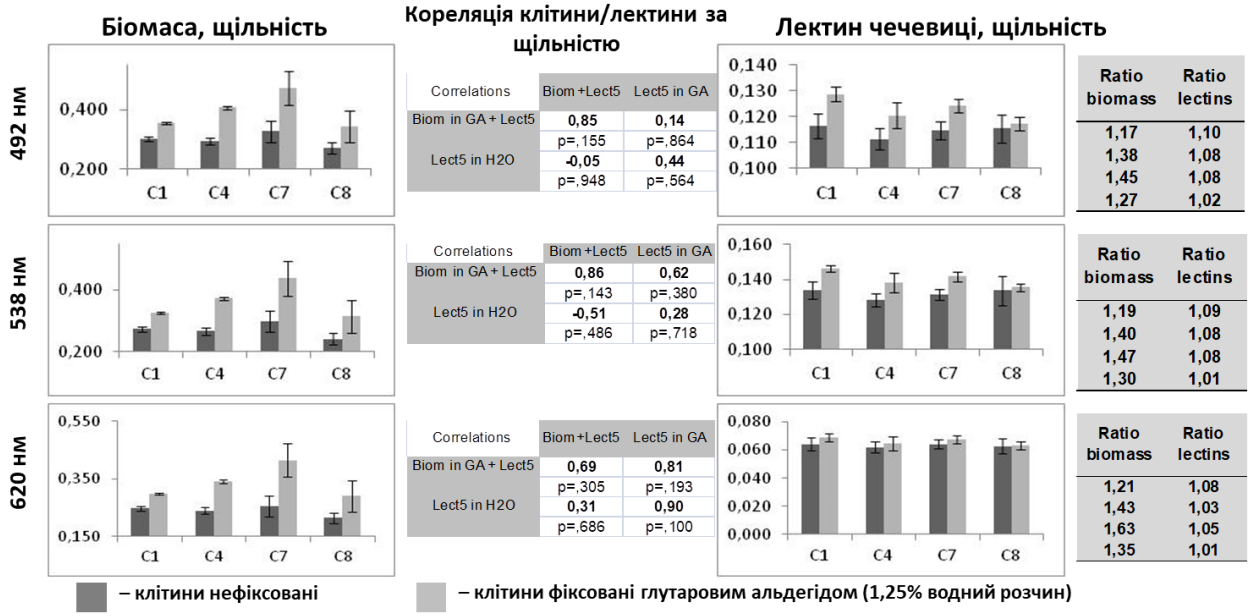
Destaining solution: двухфазна система, состоящая на **10-20% из бутанола и на 90-80% из:**

	Конц.	Сток	100ml
Уксусная к-та	5%	ледяная	5ml
H_2O	95%	mQ	95ml

ДОДАТОК 9.

Оптимізація параметрів для напівкількісного визначення незв'язаних лектинів за величиною оптичної густини

Для напівкількісного визначення лектинів незв'язаних із клітинами дріжджів оцінювали кілька довжин хвиль оптичного діапазону на предмет найкращого диференціювання клітин дріжджів без лектинів від клітин, на поверхні яких закріпилися лектини, а також на предмет найбільш вагомих оптичних змін за найменших змін у концентрації лектинів в суміші.



На рисунку наведено один з результатів проведених досліджень, який демонструє ефективність довжини хвилі **538 нм** для виявлення найбільшої негативної кореляції між щільністю клітин оброблених лектином (щільність клітин збільшувалася разом із збільшенням зв'язаних лектинів) і оптичною щільністю розчинів вільних лектинів (щільність розчинів зменшується разом із збільшенням зв'язування лектинів на поверхні клітин). При цьому, за довжини хвилі **492 нм** були відмічені найбільші відмінності між різними концентраціями лектинів. А довжина хвилі **620 нм** дозволяла охарактеризувати лише відмінності в концентрації біомаси і мала найменший внесок для виявлення зв'язаного на поверхні клітин лектину.

Обробка клітин дріжджів глутаровим альдегідом зменшувала ефективність зв'язування лектинів.

Результат: довжина хвилі 492±10 нм виявилася найбільш прийнятною для кількісного визначення зв'язаних із клітинною стінкою лектинів. При цьому, оптимальною була концентрація клітин 10^8 кл/мл і бажано використовувати нативні, нефіксовані клітини дріжджів у дистильованій воді.

ДОДАТОК 10.

Фізико-хімічні параметри нікель-хромових і кобальт-хромових стоматологічних сплавів металів

Показник	Ni-Cr сплави			Co-Cr сплави		
	WIRON 99	**VIROCER PLUS**	**GIALLOY CB/N**	**WIRONIT**	**WIROBOND 280**	**GIALLOY PA**
Склад (%)	Ni 65.0, Cr 22.5, Mo 9.5, Co 1.0, Si 1.0, Fe 0.5	Ni 65.2, Cr 22.5, Mo 9.5, Si, Fe, Nb, Mn	Ni 62.0, Cr 25.0, Mo 11.0, Si 1.5, C 0.1	Co 64.0, Cr 28.0, Mo 5.0, Fe 0.5, C 0.35, Si	Co 60.2, Cr 25.0, Mo 4.8, W 6.2, Ga 2.9, Si, Mn	Co 64.0, Cr 30.0, Mo 5.0, C 0.5
Тип	Надміцний (4)	Надміцний (4)	н/в	н/в	Надміцний (4)	н/в
Колір	сріблястий	сріблястий	сріблястий	сріблястий	сріблястий	сріблястий
Біосертифікат	+	н/в	н/в	+	+	н/в
Щільність (г/см^3)	8,2	8,2	8,2	8,2	8,5	8,35
Величина твердості за Віккерсом (HV10)	180	190	200	350	280	370
Відносне подовження (Rp 0,2) (MPa)	330	340	н/в	600	540	н/в
Пластичність при текучості (A5) (%)	25	14	н/в	6,2	14	н/в
Модуль пружності орієнтовний (MPa)	205,000	200,000	200,000	211,000	220,000	212,000
Межі плавлення (°C)	1250-1310	1320-1365	1260-1350	1320-1350	1360-1400	1360-1460
Температура виплавки (°C)	1420	1450	н/в	1460	1470	н/в
Температура попереднього каління (°C)	900-950	950-1000	н/в	н/в	950-1000	н/в
Коефіцієнт термічного розширення (10^{-6})						
20-600 °C	14,0	14,0	н/в	н/в	14,2	н/в
25-500 °C	13,8	13,8	н/в	н/в	14,0	н/в

ДОДАТОК 11.

Алгоритм аналізу результатів фенотипового тесту (fitness-test)

Фізіолого-біохімічні зміни показників росту і життєдіяльності клітин дріжджів (фенотипові зміни), які відбуваються в результаті видалення чи блокування експресії окремого гену, свідчать про його залученість у забезпечення відповідних життєвих процесів. Фенотипові ж зміни у клітин з подвійними делеціями є кількісною характеристикою генетичної взаємодії (ε) між відповідною парою генів [392].

Генетична взаємодія може бути негативною і позитивною. Найчастіше, негативні значення величини генетичної взаємодії ($\varepsilon < 0$) спостерігаються між генами, продукти яких задіяні у різних метаболічних шляхах. Такий тип взаємодій є найбільш цікавим, адже дозволяє виявити гени, які впливають на спільну біологічну функцію. Крайній прояв негативної величини генетичної взаємодії – це летальні мутації. Натомість, позитивна генетична взаємодія ($\varepsilon > 0$) найчастіше об'єднує представників з одного білкового комплексу чи метаболічного шляху. Позитивна генетична взаємодія може бути симетричною (Рис. b), чи асиметричною (Рис. c) і мати різні біологічні тлумачення [392].

На сьогодні, це один з найбільш розповсюджених підходів для створення карт генетичної взаємодії. Наприклад, гени з близькими біологічними функціями проявляють генетичні зв'язки з високим ступенем вірогідності, ніж це було б в разі випадковості даного явища [391].

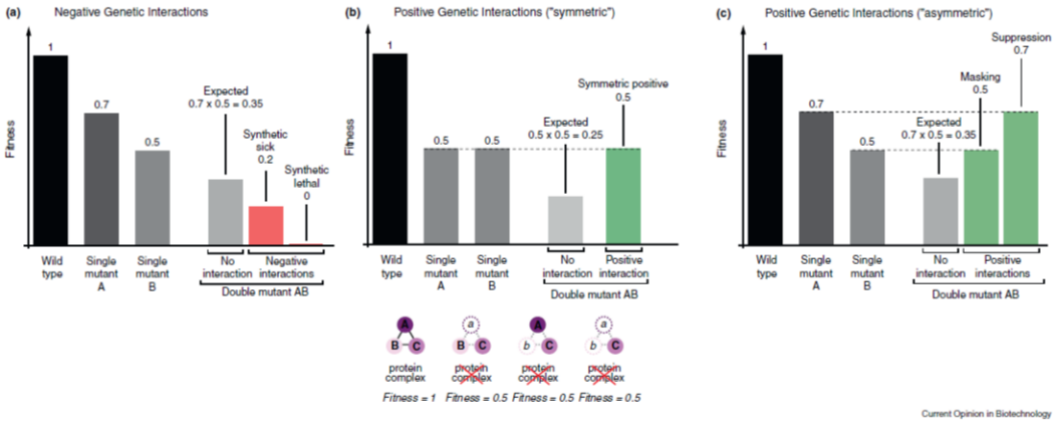
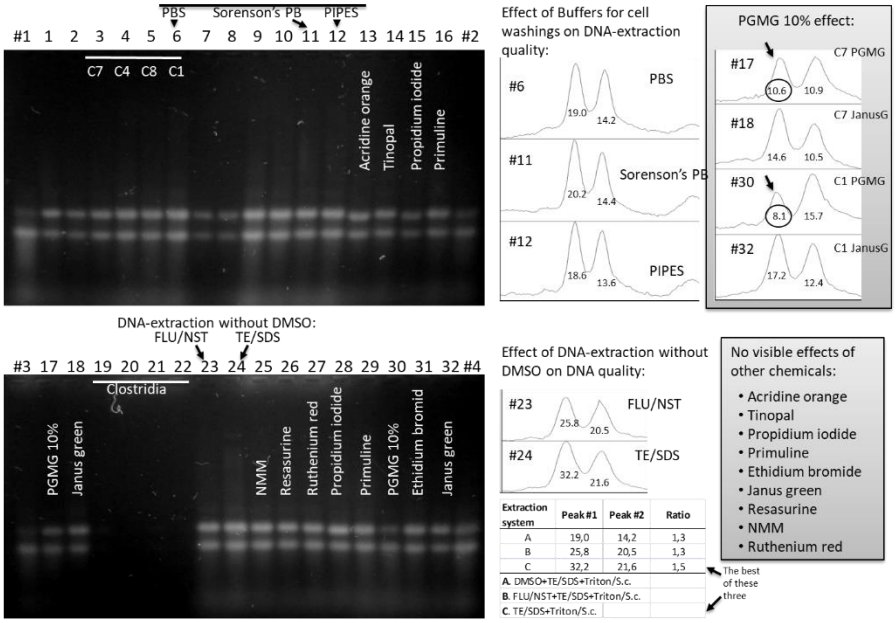


Рис.. Графічне представлення розуміння механізмів генетичної взаємодії між парою генів при оцінці кількісних фенотпових ознак [392]. (a) Негативна взаємодія: визначений фенотип подвійного мутанта нижчий за очікуваний (expected). (b) Симетрична позитивна взаємодія: визначений фенотип подвійного мутанта вищий за очікуваний. (c) Асиметрична позитивна взаємодія може бути маскуючою (masking) і супресорною (suppression).

ДОДАТОК 12.

Оптимізація протоколу виділення суцільної ДНК з клітин дріжджів

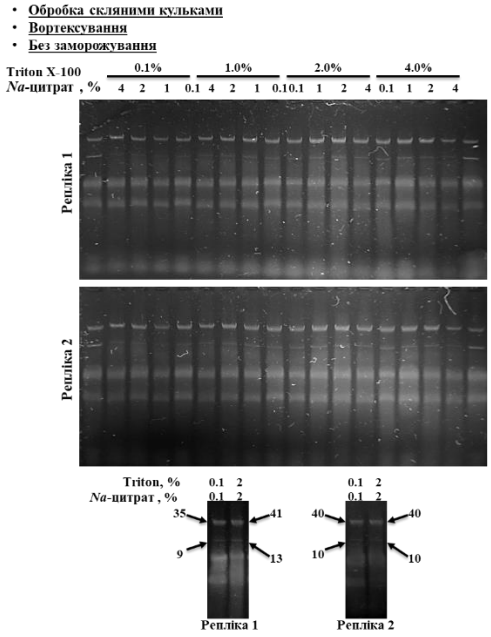
Етап 1: Підбір основних і допоміжних компонентів буферної системи для виділення ДНК



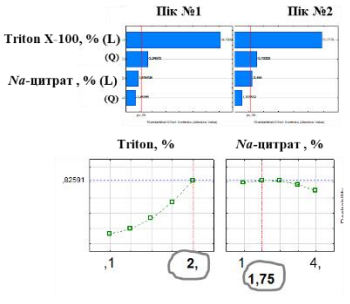
Extraction system	Peak #1	Peak #2	Ratio
A	19,0	14,2	1,3
B	25,8	20,5	1,3
C	32,2	21,6	1,5

A. DMSO+TE/SDS+Triton/S.c.
B. FLU/NST+TE/SDS+Triton/S.c.
C. TE/SDS+Triton/S.c.

Етап 2: Оптимізація концентрацій відібраних реагентів буферу для екстракції ДНК



Track N	Triton X100	Sod. Citrate	Repeat N1 Peak 1	Repeat N1 Peak 2	Repeat N2 Peak 1	Repeat N2 Peak 2
1	Control	Control	2,5	1,5	2,8	1,6
2	0,1	4	2,1	0,8	2,3	1,1
3	0,1	2	2,4	1,1	2,4	1,2
4	0,1	1	1,8	1,0	2,0	0,9
5	0,1	0,1	2,4	1,1	2,7	1,2
6	1	4	2,6	1,1	2,7	1,1
7	1	2	3,7	1,4	3,7	1,5
8	1	1	3,3	1,5	3,6	2,2
9	1	0,1	4,6	2,1	4,7	2,1
10	2	0,1	5,1	2,5	4,6	2,2
11	2	1	6,5	3,0	6,1	2,9
12	2	2	7,3	3,6	5,7	2,8
13	2	4	5,0	2,7	6,2	2,3
14	4	0,1	5,5	2,1	5,3	2,7
15	4	1	5,4	2,1	5,2	1,8
16	4	2	4,7	1,4	4,3	1,4
17	4	4	2,4	1,0	2,5	1,1
18	Control	Control	1,5	1,2	1,9	1,4



Етап 3: Перевірка ефективності підібраної буферної системи із комерційними наборами

Етап 4: Оцінка ефективності екстракції ДНК з клітин бактерій, ссавців, рослин, грибів.

Результат: Створено буферну систему і протокол виділення ДНК/РНК: клітини обробляють послідовно по 60 сек розчином 10мМ ТЕ(pH7,2) з 1% SDS і розчином 0,1% Triton X-100/*Na*-цитрат, додають 1:1 за об'ємом скляні кульки і рівний об'єм суміші хлороформ:кислий фенол (1:1). Після ретельного вортексування, додають 200 мкл ТЕ (pH 8,0) і центрифугують при 15000rpm 10 хв. Відбирають верхню фракцію, яка містить ДНК і РНК. Зберігають при мінус 20°С.

ДОДАТОК 13.

Гени-маркери стрес-індукуємих внутрішньоклітинних шляхів

Маркери стресу:		Посилання
PDR12	pH-специфічний індикатор	[561]
RNR3	Маркер геномної нестабільності	[562, 563]
STI1	Маркер теплового шоку	[564, 565]
TRX2	Маркер оксидативного стресу	[566]
GSY2	Маркер геномного стресу	[567]
PHO84	РЧ-ЕМВ індукуємий P_i-транспортний білок	[194]
CWP1	Маркер стресу клітинної стінки, pH-залежний, через Slt2	[287, 568]
HSP12	Маркер гіперосмотичного стресу через Msn2/4	[568, 569]
GRE2	Маркер гіперосмотичного стресу через Sko1	[90, 570]
GPD1	Маркер гіперосмотичного стресу через Hot1	[568, 571]
Референтні гени «housekeeping genes»		
SEC21	Транспортний білок	[572]
ALG9	Фермент глікозилтрансфераза	[567]
ACT1	Білок актин	[567]
Ферменти поліфосфатази		
PPN1	Ендополіфосфатаза	[259]
PPX1	Екзополіфосфатаза	[9]

Праймери для вивчення рівнів експресії стрес-активуємих генів метдом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Ген		Послідовність (5'-->3')	Розмір амплікону, bp
HSP12	F	ATAACGCTGAAGGTCAAGGTGAATC	100
	R	CCGGAAACATATTCGACGGCAT	
TRX2	F	GTGGGCCATGTAAAATGATTGCAC	132
	R	TAGGCATGGAAGAAACTTCAGCTTTT	
GPD1	F	AAGTTGGTGCTAAAGGTGTCCAATT	163
	R	TCGCCTCTGAAATCCTTTGGAATG	
GRE2	F	CTAACGGGTTCATTGCCCAACA	208
	R	ATCTTGATATCCTTGCCGTGCTTTT	
CWP1	F	GGCCATCTAAACTACAAGAGCTCTTC	243
	R	GGTCTCGACAGATTCTATACTCGAACTA	
PHO84	F	GAATACGCAAACTCTGGTGCTGA	417
	R	GTTTAAACTCAACCCGTAGAAAGCAAC	

Продовження таблиці на наступній сторінці

Ген		Послідовність (5'-->3')	Розмір амплікону, bp
STI1	F	GAAAAAGGCGAATACGAGACAGCTA	454
	R	CAATGGCTTTGTTACAATCTGCGATAG	
GSY2	F	ACTACGGTGTCACAAATAACTGCTTT	494
	R	AATTCCGTCGTCAGTCCATTGTG	
RNR3	F	CAGGTTTAGATGATGTGTGGGGTG	575
	R	ACAGGAGGCTTCAAGAGTAGCAT	
PDR12	F	TATCCCGTCACCTTTCAAACATTCTTT	611
	R	TTTTAGGGCAAAATCGATTGTTTCCTTC	
Гени поліфосфатаз			
PPN1	F	TTTCCACATAACATGTTTGCACTAGGA	531
	R	TTCAGTTTCTTCGTCCTCTTCATTACTG	
PPX1	F	ACACAAAGGGTTAGAGATTGGTCTTTC	362
	R	CTTCCAGGTTTGAGTACGCTTCC	
Референтні гени			
SEC21	F	GAGCCACCATTGCACTAGAATTCA	645
	R	CGGATGGTAATAATCTGTCCACTTGTAG	
ACT1	F	CCAGATGGTCAAGTCATCACTATTGG	273
	R	TGGAGGAGCAATGATCTTGACCT	
ALG9	F	TAGCCGTCTACGAGCAATTTTCTTC	303
	R	TTGGGGCGACGATGTCAATAAAAT	

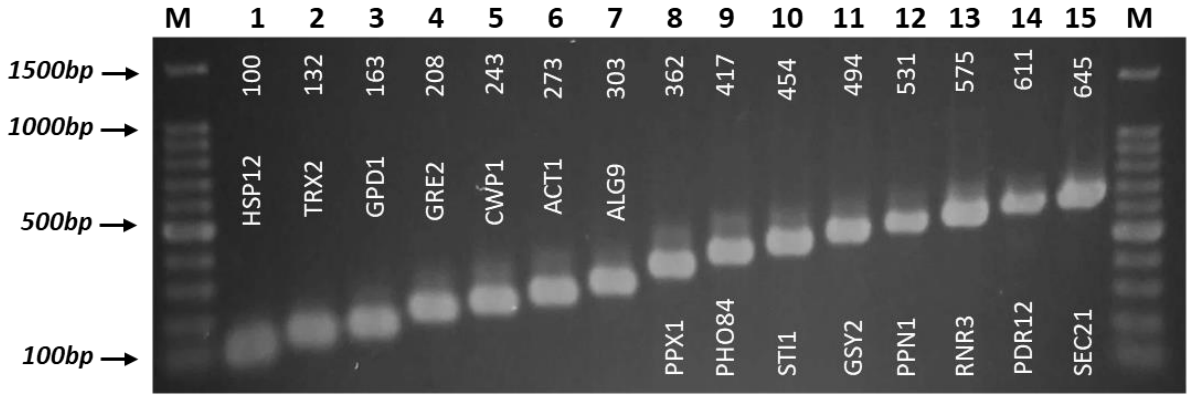
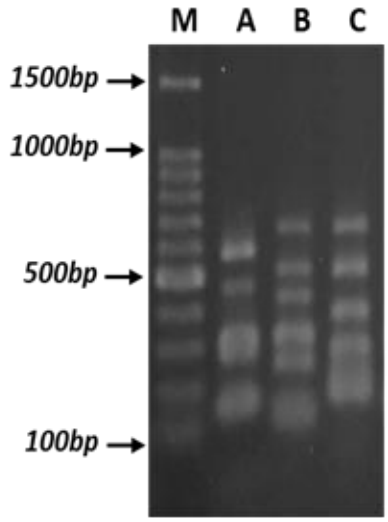


Рис.. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК, виділеної з клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штам С1, з праймерами специфічними до відповідних (вказаних на треках) генів.

Примітки: На кожному з треків вказана назва гену і відповідна довжина ПЛР-продукту. «М» – ДНК маркер.



Група А		Група В		Група С	
Ген	Амплікон, bp	Ген	Амплікон, bp	Ген	Амплікон, bp
PDR12	611	**SEC21**	**645**	**SEC21**	**645**
RNR3	575	GSY2	494	PPN1	531
STI1	454	PHO84	417	PPX1	362
ALG9	**303**	**ALG9**	**303**	**ACT 1**	**273**
ACT 1	**273**	CWP1	243	GRE2	208
TRX2	132	HSP12	100	GPD1	163

Рис.. Електрофореграма продуктів мультиплексної ампліфікації РНК, виділеної з клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штам С1, з наборами праймерів специфічними до відповідних (вказаних в таблиці) генів.

Примітки: «М» – ДНК маркер; «А», «Б» і «С» – відповідні мультиплексні групи генів наведені у таблиці.

Характеристики відібраних стрес-індукуємих генів

Для дріжджів сахароміцетів встановлено близько 900 генів, які активно реагують на дію таких стресових факторів як осмотичний шок, зміна кислотності середовища, підвищення температури культивування. Близько 300 з них активно реагують на всі перелічені фактори, в той час як інші 600 виявилися більш специфічними до дії лише окремих факторів. Тому фактично кожен з цих генів може виступати генетичних маркером для встановлення стресового характеру дії того чи іншого фактору. Серед цих генів є такі, які запускають не один а кілька каскадів стресових реакцій, а тому мають меншу специфічність до діючого фактору і відповідно можуть бути більш універсальними маркерами стресу. В той час як інші, які активуються лише за дії певних відомих чинників є ідеальними кандидатами для встановлення шляхів, якими реалізуються стресова дія досліджуваних факторів. Нижче наведено відібрані гени, які можуть слугувати маркерами індукції в клітинах специфічних для окремих видів стресів внутрішньоклітинних шляхів. Деякі з обраних генів запропоновані згідно даних літератури як маркери стресу, інші ж відібрані нами в результаті аналізу транскриптомних профілів характерних для клітин дріжджів за дії відповідних факторів стресу.

Референтні гени:

ACT1 Кодує білок актину. Актин являється консервативним елементом цитоскелету, необхідним для багатьох клітинних процесів. Актин – це АТФ-зв'язувальний білок, який існує як у мономерній (G-актин), так і в нитчастій (F-актин) формах [47]. Рівень експресії ACT1 доволі часто використовують як референтний.

ALG9 Кодує манозилтрансферазу, яка приймає участь у процесі глікозилювання білків за рахунок переносу залишків манози [48]. Профілі експресії цього гену за дії різних факторів стресу залишалися стабільно високими, а тому цей ген було обрано як референтний.

SEC21 Кодує гамма-субодиницю коатомерного білкового комплексу COPI, який залучений у транспортування сполук від апарату Гольджі до ендоплазматичного ретикулуму. Профілі експресії цього гену за дії різних факторів стресу залишалися стабільно високими, а тому цей ген було обрано як референтний.

Гени-маркери стресу

TRX2 Кодує цитоплазматичний тіоредоксин. Частина системи тіоредоксину, яка захищає клітини від оксидативного та редуктивного стресу. Виступає в ролі кофактора для Tsa1p і необхідний для транспортування та утворення везикул з продуктами, утвореними в ендоплазматичній сітці та апараті Гольджі. Рівень експресії цього гену збільшується при стресовій реплікації ДНК. TRX2 має паралог, TRX1, що виник при дуплікації [https://www.yeastgenome.org/locus/S000003441].

HSP12 Кодує плазматичний мембранний білок, який бере участь у процесі формування мембрани. Експресія цього гену посилюється за дії температурного шоку, оксидативного і осмотичного стресів, в стаціонарній фазі, при ліміті за джерелом вуглецю, за дії олеату і алкоголю, а також у відповідь на реплікативний стрес. Регуляція відбувається через HOG і Ras-Pka сигнальні шляхи [https://www.yeastgenome.org/locus/S000001880].

CWP1 Білок клітинної стінки, який відноситься до структурних білків клітинної стінки, є необхідним для забезпечення стійкості до пропіонової кислоти. Активується за порушення цілісності клітинної стінки. [https://www.yeastgenome.org/locus/S000001579]

GRE2 Кодує 3-метилбутаналредуктазу та НАДФН-залежну метилгліоксал редуктазу. Рівень експресії посилюється за дії осмотичного і оксидативного стресів, за іонного дисбалансу, за дії теплового шоку та в присутності важких металів. Регуляція активності відбувається через HOG-шлях. Вміст відповідного білку зростає у відповідь на реплікативний стрес [https://www.yeastgenome.org/locus/S000005511].

GPD1 НАД-залежна гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа. Ключовий фермент синтезу гліцерину, який є внутрішньоклітинним осмопротектором. Експресія регулюється через HOG-шлях. Кількість білка зростає у відповідь на реплікативний стрес. [https://www.yeastgenome.org/locus/S000002180].

PHO84 Кодує білок, який має функцію високоспецифічного переносника фосфору і низькоспецифічного переносника мангану. Регулюється транскрипційними факторами Pho4p і Spt7p. Надекспресія цього гену викликає стійкість клітин дріжджів до важких металів, а дефектність унеможливлює транспорт фосфору і синтез полі(Ф)-ланцюгів. Активність гену збільшується за дії радіочастотного електромагнітного випромінювання [194]. [https://www.yeastgenome.org/locus/S000004592].

STI1 Кодує кошаперон Hsp90. Регулює просторову організацію амілоїдних білків у цитозолі, тим самим буферизуючи протеотоксичність, викликану амілоїдними білками. Взаємодіє з Ssa-групою цитозольних шаперонів Hsp70 і посилює активність їх АТФази (Ssa1p), в одночас взаємодіє з шаперонами Hsp90 і гальмує їх АТФазну активність [https://www.yeastgenome.org/locus/S000005553].

GSY2 Глікогенсинтаза, експресія якої активується при температурному стресі і при ліміті за вуглецем і азотом. Рівень експресії цього гену регулюється цАМФ-залежними Snf1p- і Pho85p-кіназами, а також фосфатазами Gac1p-Glc7p. Має паралог – GSY1. Переходить з цитоплазми до плазматичної мембрани при реплікативному стресі. [https://www.yeastgenome.org/locus/S000004248].

RNR3 Мала ізоформа великої субодиниці рибонуклеотиддифосфатредуктази. Комплекс RNR каталізує реакції, які обмежують швидкість синтезу дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP). RNR3 має паралог – RNR1. [https://www.yeastgenome.org/locus/S000001328].

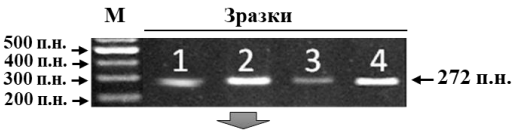
PDR12 Мембранний АТФ-зв'язуючий ABC-транспортний білок. Забезпечує стійкість до дії слабких органічних кислот. Активується за дії сорбату і бензоату. Регулюється фактором транскрипції War1p. [https://www.yeastgenome.org/locus/S000005979].

ДОДАТОК 14.

Протокол визначення кількості ПЛР-продуктів (в нг) на електрофореграмах

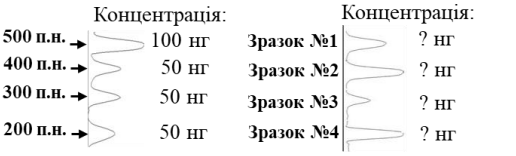
Основою для визначення кількості ПЛР-продукту є порівняння інтенсивності світіння ПЛР-продуктів невідомої концентрації відносно ампліконів відомої концентрації. Для цього використовували ДНК-маркер з відомою концентрацією референтних ДНК-фрагментів.

А



Отримання цифрового зображення ампліконів на електрофореграмі із відповідними маркерами відомої концентрації (в нг).

Б



Обробка цифрового зображення за допомогою плагіну для аналізу гелів в програмі ImageJ.

Отримання цифрових даних щодо площі ампліконів на графіках градації сірого, проведення математичних і статистичної обрахунків для визначення конценрації ампліконів в досліджуваних зразках.

В

Оцінюваний амплікон	Площа амплікону				Відома концентрація амплікону, нг	Визначена концентрація амплікону, нг				Точність визначення концентрації амплікону, %
	Вимірювання		Сер. знач.	Ст. відх.		Вимірювання		Сер. знач.	Ст. відх.	
	1	2				1	2			
M 500	8952,012	8791,77	8871,9	113,31	**100**	100,9	99,1	**100,0**	**1,28**	100
M 400	4152,234	4050,698	4101,5	71,80	**50**	46,8	45,7	**46,2**	**0,81**	92
M 300	4295,355	4181,527	4238,4	80,49	**50**	48,4	47,1	**47,8**	**0,91**	96
M 200	4506,426	4505,426	4505,9	0,71	**50**	50,8	50,8	**50,8**	**0,01**	100
Зразок №1	7146,669	7005,962	7076,3	99,49	?	80,6	79,0	**79,8**	**1,12**	-
Зразок №2	10618,96	10319,43	10469,2	211,80	?	119,7	116,3	**118,0**	**2,39**	-
Зразок №3	4258,184	4274,184	4266,2	11,31	?	48,0	48,2	**48,1**	**0,13**	-
Зразок №4	8976,77	9146,305	9061,5	119,88	?	101,2	103,1	**102,1**	**1,35**	-

ДОДАТОК 15.

Фізіолого-біохімічні показники клітин дріжджів дефектних за поліфосфатазами

Порівняльний аналіз низки фізіолого-біохімічних показників клітин дріжджів отриманих з колекцій Ягелонського університету (Краків, Польща) і Інституту біохімії і фізіології мікроорганізмів ім. Скрябіна (Пущіно, Росія)

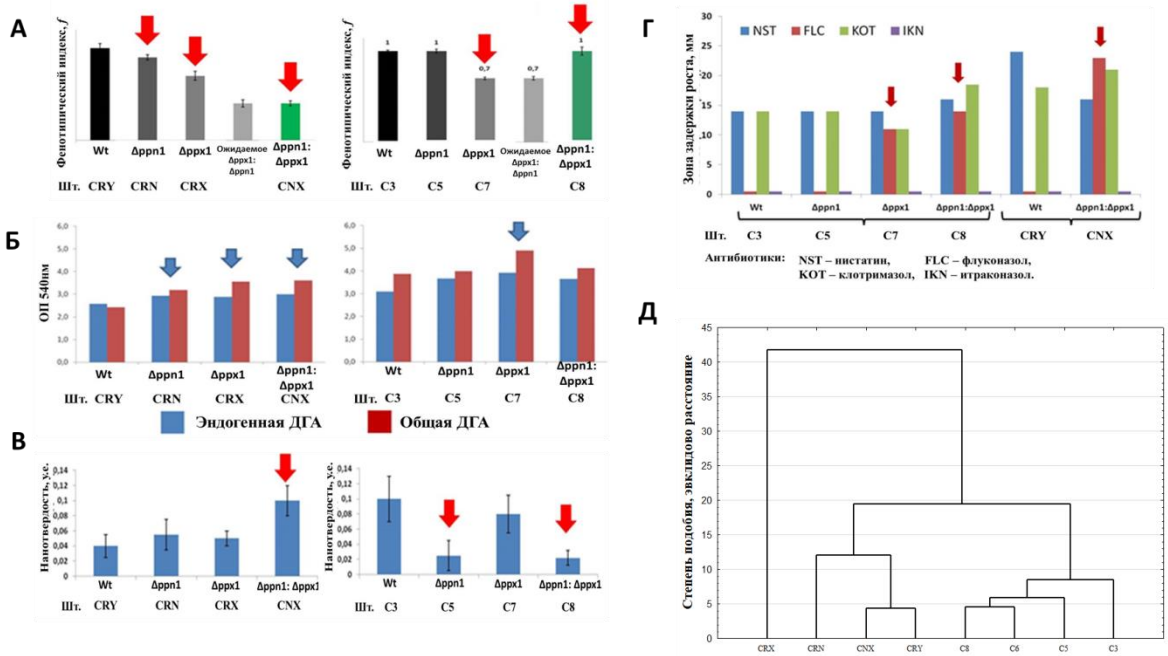


Рис.. Розмір колоній при рості на агаризованому поживному середовищі (А). Загальна дегідрогеназна активність (Б). Твердість клітинної поверхні (нанотвердість) (В). Чутливість до фунгіцидних антибіотиків (Г). Ступінь подібності вивчених штамів відповідно до вмісту жирних кислот (Д).

Результат: клітини досліджених штамів дріжджів, отримані з двох різних колекцій, мають однакові заявлені мутації за поліфосфатазами PPN1 і PPX1, однак відмінні за всіма визначеними параметрами.

ДОДАТОК 16.

Вміст жирних кислот в клітинах дріжджів за дії комплексу стресів

Дослідження сформоване за методом Бокса-Бенкена і містить 13 варіантів співвідношення досліджуваних факторів із трьома центральними точками (репліками, №№13-15).

Таблиця. Зміни вмісту жирних кислот (ЖК) в клітинах дріжджів при дії комплексу стресів (радіочастотне електромагнітне випромінювання (ДВЧ) частотою 40,68 МГц, потужністю 15 Вт, фунгіцидний антибіотик поліенового ряду ністатин (НСТ), в мкг/мл, і температура (Т), в °С). Показано зміни вмісту ЖК відносно відповідних значень визначених в клітинах дріжджів без обробки факторами стресу.

№	Незалежні фактори			Вміст жирних кислот							
	ДВЧ	НСТ	Т	%				нМ/мл			
				C16:1	C16:0	cisC18:1	C18:0	C16:1	C16:0	cisC18:1	C18:0
1.	15	5	37	-2,79	7,76	-4,83	-0,14	0,04	0,18	0,01	0,01
2.	45	5	37	-0,07	7,23	-6,78	-0,39	0,17	0,25	0,03	0,02
3.	15	15	37	-1,34	5,05	-6,12	2,41	0,11	0,16	0,02	0,07
4.	45	15	37	-3,26	3,25	-3,10	3,11	-0,18	-0,01	-0,20	0,02
5.	15	10	28	-1,24	9,47	-10,45	2,22	0,23	0,33	0,04	0,10
6.	45	10	28	7,70	1,63	-8,02	-1,31	0,68	0,25	0,24	0,04
7.	15	10	46	3,56	4,60	-7,94	-0,22	0,24	0,18	0,02	0,03
8.	45	10	46	7,16	2,44	-7,77	-1,82	1,07	0,46	0,55	0,08
9.	30	5	28	-2,2	6,17	-5,67	1,70	-0,01	0,12	-0,07	0,03
10.	30	15	28	11,8	2,40	-14,69	0,48	0,32	0,09	-0,19	0,03
11.	30	5	46	7,30	2,94	-8,53	-1,71	0,55	0,24	0,17	0,02
12.	30	15	46	3,01	3,10	-5,40	-0,71	-0,36	-0,16	-0,45	-0,08
13.	30	10	37	6,99	2,34	-7,89	-1,43	0,58	0,24	0,21	0,03
14.	30	10	37	4,15	3,52	-7,22	-0,45	0,56	0,31	0,28	0,07
15.	30	10	37	1,49	4,57	-6,97	0,91	0,53	0,36	0,32	0,12
Mean ±Sd	30	10	37	38,47 ±3,90	21,87 ±2,93	31,63 ±2,86	8,03 ±1,97	0,30 ±0,37	0,20 ±,015	0,06 ±0,24	0,04 ±0,04
Min	15	5	28	33	18,57	26,51	5,86	-0,36	-0,16	-0,45	-0,08
Max	45	15	46	46,64	27,19	36,8	11,5	1,07	0,46	0,55	0,12

ДОДАТОК 17.

Кореляційні зв'язки між вмістом жирних кислот в клітинах дріжджів, фізіолого-біохімічним станом і генетичною активністю

Таблиця. Кореляція (*R*, %) вмісту жирних кислот в клітинах дріжджів дефектних за поліфосфатазами PPN1 і PPX1, з фізіолого-біохімічними і генетичними показниками.

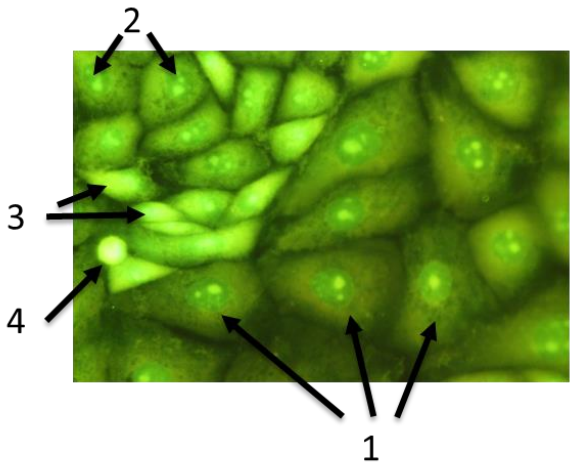
Визначений показник	Жирні кислоти					
	C16:0	**C16:1$^{?9}$**	**C18:0**	**C18:1$^{?9}$**	**UFA**	**SFA**
Нанотвердість	71	34	-46	-44	29	18
	p=0,29	p=0,65	p=0,54	p=0,56	p=0,71	p=0,81
Цукри клітинної стінки (за методом GC/MS)						
Маноза	-93	-02	48	78	-51	42
	p=0,07	p=0,98	p=0,52	p=0,22	p=0,49	p=0,58
Глюкоза	90	07	-57	-88	32	-43
	p=0,10	p=0,93	p=0,43	p=0,11	p=0,68	p=0,56
Глюкозамін	11	-14	22	26	54	02
	p=0,88	p=0,85	p=0,77	p=0,74	p=0,46	p=0,97
Цукри клітинної стінки (середнє значення за методом мічених лектинів)						
Маноза/Глюкоза	-87	-79	**97**	89	32	-41
	p=0,12	p=0,20	**p=0,03**	p=0,10	p=0,68	p=0,58
а-Маноза/а-Глюкоза	83	72	**-97**	**-96**	-39	28
	p=0,17	p=0,27	**p=0,03**	**p=0,04**	p=0,61	p=0,72
Галактоза	**-99**	-33	75	**95**	-17	15
	p=0,01	p=0,66	p=0,24	**p=0,05**	p=0,82	p=0,84
GlcNAc	-16	-74	45	06	44	-86
	p=0,84	p=0,25	p=0,55	p=0,94	p=0,56	p=0,13
GalNAc	73	63	-68	-56	-03	44
	p=0,26	p=0,37	p=0,31	p=0,44	p=0,96	p=0,55
5NAAc	76	41	-79	**-94**	-22	-08
	p=0,24	p=0,58	p=0,21	**p=0,06**	p=0,78	p=0,92
Цукри клітинної стінки (медіанне значення за методом мічених лектинів)						
Наведено для порівняння із відповідними показаниками за середнім значенням						
Маноза/Глюкоза	**-94**	-67	**94**	**96**	18	-23
	p=0,06	p=0,33	**p=0,06**	**p=0,04**	p=0,81	p=0,76
а-Маноза/а-Глюкоза	-08	86	-57	-17	**-99**	89
	p=0,92	p=0,14	p=0,42	p=0,82	**p=0,01**	p=0,11
Галактоза	-92	-05	46	72	-53	34
	p=0,08	p=0,95	p=0,54	p=0,27	p=0,46	p=0,65
GlcNAc	-74	-89	**1,00**	86	54	-54
	p=0,26	p=0,11	**p=0,01**	p=0,14	p=0,45	p=0,46
GalNAc	54	47	-43	-28	10	42
	p=0,46	p=0,53	p=0,57	p=0,72	p=0,90	p=0,57
5NAAc	71	36	-74	-91	-21	-12
	p=0,29	p=0,63	p=0,26	p=0,09	p=0,78	p=0,87

Визначений показник		Жирні кислоти					
		C16:0	C16:1$^{?9}$	C18:0	C18:1$^{?9}$	UFA	SFA
Позаклітинні цукри (середнє значення за методом мічених лектинів)							
Маноза		90	72	-90	-84	-17	37
		p=0,10	p=0,27	p=0,10	p=0,16	p=0,82	p=0,62
альфаМаноза		-65	-56	56	42	-03	-44
		p=0,35	p=0,44	p=0,43	p=0,57	p=0,96	p=0,56
GlcNAc		75	28	-44	-47	36	09
		p=0,24	p=0,72	p=0,55	p=0,52	p=0,63	p=0,91
GalNag		17	11	03	16	32	27
		p=0,83	p=0,89	p=0,96	p=0,83	p=0,68	p=0,73
5NAAc		-67	-16	31	36	-46	-02
		p=0,33	p=0,83	p=0,69	p=0,64	p=0,54	p=0,97
Експресія генів за дії факторів стресу:							
CWP1	**Контроль**	71	49	-56	-48	13	33
		p=0,28	p=0,51	p=0,44	p=0,52	p=0,86	p=0,67
	H2O2, 0,6мМ	-57	-91	**96**	77	72	-60
		p=0,42	p=0,09	**p=0,04**	p=0,22	p=0,28	p=0,39
	Оцтова к-та, 150мМ	-05	54	-48	-32	-85	41
		p=0,94	p=0,45	p=0,51	p=0,67	p=0,15	p=0,58
FLO11	**Контроль**	61	11	-23	-28	49	01
		p=0,39	p=0,88	p=0,76	p=0,72	p=0,50	p=0,99
	H2O2, 0,6мМ	36	02	-01	00	50	06
		p=0,64	p=0,98	p=0,98	p=0,99	p=0,50	p=0,93
	Оцтова к-та, 150мМ	04	-25	33	33	60	-06
		p=0,95	p=0,75	p=0,67	p=0,66	p=0,40	p=0,94
	Сорбітол, 1М	-14	-85	73	45	94	-71
		p=0,85	p=0,15	p=0,27	p=0,55	p=0,06	p=0,29
	ЕМВ ДВЧ	-22	**-98**	77	39	88	-92
		p=0,77	**p=0,02**	p=0,23	p=0,61	p=0,12	p=0,08

ДОДАТОК 18.

Алгоритм морфометричного аналізу кольорових цифрових зображень клітин ссавців

Фарбування клітин ссавців при їх взаємодії з клітинами дріжджів флуоресцентним барвником акридиновим помаранчевим дозволило оцінити клітини ссавців за вмістом ДНК/РНК, адже молекули ДНК (дволанцюгові молекули) фарбуються в зелений колір, а РНК (одноланцюгові молекули) – в червоний. Кількісний аналіз клітин за розподілом основних кольорів (RGB, «*Red*, *Green*, *Blue*») на цифрових зображеннях зразків проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ.



Тип	Red	Green	Blue
1	77	134	12
2	95	175	18
3	124	209	32
4	192	249	95

Тип	Співвідношення		
	R/G	G/B	R/B
1	0,6	11,5	6,6
2	0,5	9,5	5,2
3	0,6	6,5	3,9
4	0,8	2,6	2,0

Рис. Морфологічні типи клітин в популяції культури клітин ссавців. Клітини профарбовані акридиновим оранжевим.

RGB-аналіз дозволив виявити чотири основних морфолого-фізіологічних групи клітин (вказані на рисунку цифрами 1-4). Виявлені групи відповідають різним етапам перетворення нормальних клітин (тип 1) в некротичні (тип 4).

Співвідношення кольорів виявилося найбільш інформативним показником для визначення загального стану популяції клітин ссавців і за результатом аналізу, стан популяції на наведеному рисунку відповідає другому типу (тип 2), тобто це перехідна стадія від клітин розплющеного морфотипу (тип 1) до клітин компактних, витягнутих (тип 3), що може бути свідченням індукції процесів відмирання клітин в популяції.

Результат: Аналіз співвідношення RGB дозволяє досить швидко оцінити великі масиви клітин ссавців і виявити відповідні морфолого-фізіологічні зміни.