

Г. Я. ФРАЙКИН, М. Е. ПОСПЕЛОВ, Л. Б. РУБИН
**ЭФФЕКТЫ ФОТОЗАЩИТЫ И ОБРАТИМОЙ ИНАКТИВАЦИИ
ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII*,
ИНДУЦИРУЕМЫЕ СВЕТОМ 313 нм**

(Представлено академиком Р. В. Хохловым 17 XII 1975)

Большинство работ по изучению биологических эффектов у.-ф. света посвящено выяснению механизмов летального действия коротковолнового у.-ф. Многочисленными исследованиями установлено, что вызываемая коротковолновым у.-ф. гибель клеток обусловлена главным образом фотохимическими повреждениями молекул ДНК. В значительной степени расшифрованы также механизмы репарации этих повреждений ⁽¹⁾. В то же время в литературе имеется весьма мало данных относительно природы фотобиологических эффектов, индуцируемых ближним у.-ф. светом. Следует отметить также, что изучались они в основном на бактериях ⁽²⁾ и простейших ⁽³⁾.

В настоящем сообщении приводятся результаты исследования эффектов действия ближнего у.-ф. света на дрожжевой организм *Candida guilliermondii*.

Культуру *C. guilliermondii* выращивали по схеме, описанной ранее ⁽⁴⁾. Для получения монохроматического у.-ф. света области 300–380 нм использовали ртутную лампу ДРШ-1000 и дифракционный спектрограф. Источником коротковолнового у.-ф. 254 нм служила бактерицидная лампа БУВ-30. После освещения клетки высевали на агаризованные пластинки и помещали в термостат при 30°. Определение выживаемости дрожжей проводили через 24 часа по методу микроколоний ⁽⁵⁾. О темпах размножения дрожжей судили на основании прямого подсчета количества клеток в процессе их роста. Спектры поглощения в у.-ф. области регистрировали на спектрофотометре «Gilford».

1. Инактивация и восстановление в непитательной среде. При исследовании действия ближнего у.-ф. на дрожжи *C. guilliermondii* было установлено, что свет 313 нм при определенных дозах вызывает их инактивацию. Летальный эффект проявлялся в потере способности клеток образовывать микроколонии и внешне не отличался от инак-

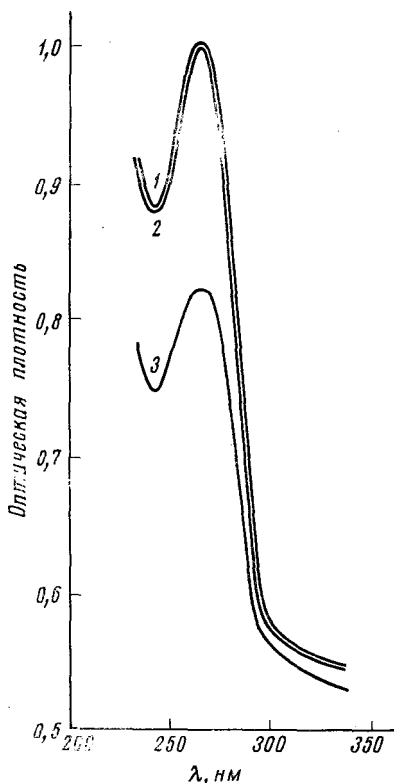


Рис. 1. Спектры поглощения суспензии дрожжей *C. guilliermondii* до (1) и после облучения летальными дозами 313 нм (2) и 254 нм (3)

тивации, вызываемой коротковолновым у.-ф. 254 нм. В связи с этим возникал вопрос, связано ли летальное действие света 313 нм с повреждением ДНК. Для решения этого вопроса дрожжи облучали инактивирующими дозами света 313 нм ($3 \cdot 10^{-5}$ эйнштейн/см²) и 254 нм ($2,7 \cdot 10^{-7}$ эйнштейн/см²), после чего регистрировали спектры поглощения нуклеиновых кислот *in vivo* (рис. 1). Видно, что в отличие от коротковолнового у.-ф. свет 313 нм при дозе, на два порядка большей, не вызы-

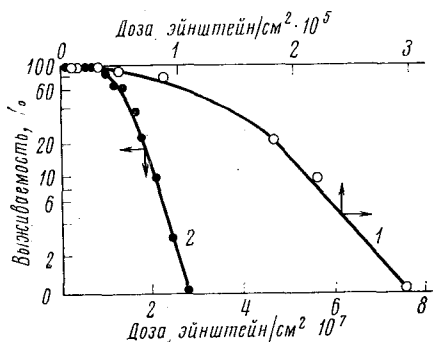


Рис. 2

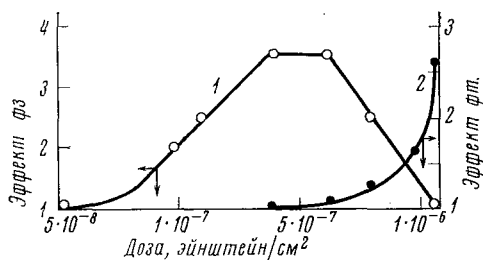


Рис. 3

Рис. 2. Кривые выживаемости дрожжей *S. guilliermondii*, облученных у.-ф. светом 313 нм (1) и 254 нм (2)

Рис. 3. Зависимость эффектов ф.з. (1) и ф.т. (2) от дозы света 313 нм. Величину эффекта ф.з. определяли как отношение процента выживаемости дрожжей в опыте (облучение 313 и 254 нм, интервал между воздействиями 2 часа) и контроле (облучение 254 нм). За эффект ф.т. принимали величину, обратную отношению числа клеток, облученных 313 нм, к числу необлученных клеток через 3 часа роста

вал никаких изменений в спектре поглощения нуклеиновых кислот. Следовательно, индуцированная освещением 313 нм гибель клеток не обусловлена повреждением ДНК. Дополнительное подтверждение этого вывода получено при снятии кривых доза — эффект для 313 и 254 нм, характер которых обнаружил существенные различия (рис. 2).

Дальнейшие эксперименты, в которых инактивированные светом 313 нм дрожжевые клетки перед высевом на агар выдерживали некоторое время в непитательной среде, позволили обнаружить эффект восстановления их жизнеспособности. При этом было установлено отличие в уровнях репарации дрожжей, облученных 313 нм (восстановление до 100%) и 254 нм (восстановление до 60%).

2. Фотозащита. В этой серии экспериментов дрожжи подвергали воздействию света 313 нм дозами, не вызывавшими гибель клеток (меньше $1 \cdot 10^{-6}$ эйнштейн/см²), после чего сразу либо через определенные интервалы времени их облучали у.-ф. 254 нм дозой $2,7 \cdot 10^{-7}$ эйнштейн/см². Было установлено, что в том случае, если облучение 254 нм проводилось через определенное время (2–4 часа) после освещения клеток 313 нм, наблюдается увеличение их выживаемости в 3–4 раза. Снятие зависимости обнаруженного эффекта фотозащиты (ф.з.) от интенсивности и продолжительности действия света 313 нм показало выполнение правила взаимозаменяемости Бунзена — Роско при варьировании этих параметров в исследованных интервалах $1 \cdot 10^{-10}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ эйнштейн/см² · сек и 5–50 мин. соответственно. Был определен также характер зависимости величины ф.з. от дозы света 313 нм (рис. 3). Обращает на себя внимание факт уменьшения эффекта ф.з., начиная с дозы $7 \cdot 10^{-7}$ эйнштейн/см², и его полного исчезновения при дальнейшем увеличении дозы. Дополнительные исследования показали, что эти дозы вызывают фототорможение (ф.т.) размножения дрожжей в первые часы их роста, степень которого пропорциональна величине дозы 313 нм (рис. 3, 4).

Представленные выше результаты показывают, что разные дозы света 313 нм вызывают различные биологические эффекты: торможение размножения ($1,5 \cdot 10^{-6}$ эйнштейн/см²) и гибель ($3 \cdot 10^{-5}$ эйнштейн/см²) дрожжевых клеток, с одной стороны, и их фотозащиту ($5 \cdot 10^{-7}$ эйнштейн/см²) от летального у.-ф. — с другой. Установлен также эффект полного восстановления жизнеспособности инактивированных светом 313 нм дрожжей при выдерживании их в непитательной среде. До настоящего времени такое явление наблюдалось только в случае инактивации биологических объектов у.-ф. светом, вызывающим повреждение ДНК. Как известно, оно обусловлено ликвидацией этих повреждений благодаря функционированию в клетках ферментов темновой репарации (т.р.). Полученные в данной работе доказательства того, что причина гибели дрожжей *S. guilliermondii* под действием света 313 нм не связана с повреждением ДНК, позволяют предположить, что в обнаруженном эффекте их восстановления участвует какой-то другой неизвестный ранее механизм репарации.

Несомненный интерес представляют также данные об увеличении выживаемости облученных летальным у.-ф. дрожжей с помощью предварительного освещения 313 нм.

Особого внимания заслуживает тот факт, что для проявления эффекта ф.з. необходим интервал времени между воздействиями света 313 и 254 нм, что позволяет сделать предположение о фотоиндуцированном образовании в дрожжевых клетках какого-то соединения, защищающего их от летальных повреждений. Кроме того, максимальная эффективность ф.з. наблюдается при тех дозах света 313 нм, которые не вызывают ф.т. размножения дрожжей. Все это свидетельствует о принципиальном отличии эффекта ф.з. у дрожжей *S. guilliermondii* от описанной в литературе ф.з., механизм которой непосредственно связывается и обусловлен эффектом ф.т. (6).

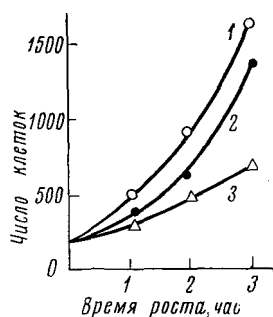


Рис. 4. Динамика размножения необлученных (1) и облученных 313 нм дозами $8 \cdot 10^{-7}$ эйнштейн/см² (2), $1,5 \cdot 10^{-6}$ эйнштейн/см² (3) дрожжей *S. guilliermondii*

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
11 XII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. Смит, Ф. Хэнеуолт, Молекулярная фотобиология, М., 1972. ² A. Eisenstark, Advances in Genetics, v. 16, 167 (1971). ³ К. А. Самойлова, В. А. Крыленков, Studia biophysica, v. 36/37, 191 (1973). ⁴ Г. Я. Фрайкин, Л. Б. Рубин и др., Прикл. биохим. и микробиол., т. 10, № 1, 5 (1974). ⁵ В. И. Корогодин, Биофизика, т. 3, 206 (1958). ⁶ J. Jagger, Photochem. and Photobiol., v. 3, № 4, 451 (1964).