

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

ВОЙЧУК СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ



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

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

03.00.07 -мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

Львів – 2021 р.

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Науковий консультант: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Громозова Олена Миколаївна,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
старший науковий співробітник відділу фізіології промислових мікроорганізмів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Іваниця Володимир Олексійович
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
проректор з наукової роботи, професор кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

доктор біологічних наук, професор
Федорович Дарія Василівна
Інститут біології клітини НАН України,
провідний науковий співробітник відділу молекулярної генетики та біотехнології

доктор технічних наук, доцент
Тодосійчук Тетяна Сергіївна
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
завідувач кафедри промислової біотехнології

Захист дисертації відбудеться «06» травня 2021 р. о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.246.01, Інститут біології клітини НАН України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології клітини НАН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16.

Автореферат розісланий «02» квітня 2021 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.б.н



Т.М. Прокопів

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. 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 [Bienert *et al.*, 2006], цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) [Folmer *et al.*, 2008], цитоскелету [Levin, 2005; Harrison *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002], мітохондрій [Tehlivets *et al.*, 2007] 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 [Ene *et al.*, 2015]. 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 [Bienert *et al.*, 2006; Folmer *et al.*, 2008], етанольний стрес [Udom *et al.*, 2019], 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 біоплівки і факторів патогенності [Кулаев *і співавт.*, 2005]. Виявлені біохімічні реакції поліфосфорилування і досліджена участь поліфосфатів у синтезі манану КС [Albi and Serrano, 2016], а також у формуванні стійкості до зовнішніх стресів [Rao *et al.*, 1998; Rashid *et al.*, 2000].

В світлі нових знань щодо шляхів сигналіngu і формування клітинами відповіді на дію різних стресових чинників, на часі, пропонуються нові механізми дії вже добре відомих стресів таких як осмотичний шок [Schaber *et al.*, 2010], пероксидний стрес [Bienert *et al.*, 2006; Folmer *et al.*, 2008], етанольний стрес [Udom *et al.*, 2019], 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 [Voichuk and Gromozova, 2004]. 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) [IARC, 2011]. Механізм біологічної дії цього чинника залишається невідомим, так само як і характер сумісної дії його з іншими чинниками стресу [Giuliani

and Soffritti *et al.*, 2010; Volodin *et al.*, 2018; Singh and Kapoor, 2014]. 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 [Botstein and Fink, 2011; Gromozova *et al.*, 2012]. 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 клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани дріжджів» (2012–2016 роки), що виконувалась в рамках комплексної програми Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка 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 органомісних відходів із використанням наноматеріалів» (ДР №0115U004278, 2015-2019 рр.); проекту НАН України (ДР №0118U005400, 2018-2022 рр.) «Сенсорна система на основі люмінесцентних бактерій для екологічного моніторингу радіочастотного електромагнітного випромінювання»; проекту НАН України і Російського фонду фундаментальних досліджень (РФФД) (ДР №0115U005632, 2015 р.) «Моніторинг біотропних ефектів космічної погоди на клітинному рівні»; проекту НАН України і РФФД (№ 04.49, 2012-2013 рр.) «Основи направленої 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»; проекту НАН України (№ 87-09/11-09, 2009 р.) «Методологічні підходи вивчення міжмолекулярної взаємодії модельних еукаріотичних мікроорганізмів»; проекту 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 PRX1, 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 рН 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-діен-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 щирю 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 сверхслабые 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 (Пушино-на-Оке, 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, Ukraine, 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, біокібернетики 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 стратегии 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 522 посилання, з яких 483 іноземних авторів. Дисертаційна робота містить 21 таблицю та 90 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасний стан знань щодо впливу хімічних і фізичних чинників стресу на життєві процеси, які протікають в живих організмах. Наведено дані щодо біологічної дії РЧ-ЕМВ, вказано на його можливі медичні, біологічні і екологічні ризики, а також перспективи застосування. Одночасно з тим наголошено на суттєвій нестачі знань щодо механізмів дії цього чиннику стресу на живі організми, що унеможлиблює його безпечне використання у повсякденному житті і вимагає застосування специфічних обмежуючих норм. Узагальнено результати досліджень стосовно будови і ролі компонентів КС і ЦПМ клітин мікроорганізмів (на прикладі клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*) за дії чинників стресу, передачі відповідних сигналів, ініціюванні транскриптомної відповіді на рівні геному і у формуванні стійкості клітин до стресу. Показано, що в останні роки зріс науковий інтерес до КС і ЦПМ та їх ролі у різноманітних процесах життєзабезпечення, відмічається зміна наукового уявлення про роль цих структур в цілому і окремих її складових (зокрема, хітину, білків КС, ергостеролу, окремих ЖК, тощо) у формуванні стійкості до стресів. Показано, що більшість механізмів, які лежать в основі формування клітинами стійкості навіть до так званих «класичних» видів стресу (кислотний стрес, пероксидний стрес, осмотичний стрес, тощо) знаходяться лише на

початковому етапі вивчення і з літератури мало відомо про роль КС, ПКМ і ЦПМ у сприйнятті і стійкості до зовнішніх слабких неіонізуючих електромагнітних сигналів. Розглянуто поліфосфати і ферменти їх метаболізму (поліфосфатази) як можливі молекули, які можуть бути безпосередньо залучені у клітинну відповідь на дію чинників стресу.

Матеріали і методи досліджень. В роботі використано бактерії *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquefaciens* представників роду *Clostridium* і *Photobacterium phosphoreum*, а також дріжджі видів *S. cerevisiae* і *Candida albicans*.

Для вивчення ролі поліфосфатаз *PPN1* і *PPX1* були використані клітини дріжджів із відповідними делеціями генів (*Δppn1* і *Δppx1*).

Мутагенний потенціал чинників стресу (індукцію прямих мутацій, мітотичної рекомбінації і мітотичного кросинговеру) вивчали із використанням спеціальних штамів дріжджів *S. cerevisiae*: штам ПГ-60 (МАТа/α *ade1-ade2*), штами ПГ-61 (МАТа *rad2*) і ПГ-80 (МАТа *rad54*), штам Т2 (МАТа/α *ade2-192ade2-G45rad2 rad2*).

Стресові фактори. Пероксид гідрогену (в діапазоні від 0,1 мМ до 120 мМ), оцтова кислота (20-120 мМ), сорбітол (0,25-1М), доксорубіцин (5-100 мкг/мл). РЧ-ЕМВ дужевисокочастотного діапазону (ДВЧ, генератор «УВЧ-62») частотою 40,68 МГц, потужністю 15 Вт і 30 Вт, електричною напруженістю поля 27,5 В/м і магнітною напруженістю 22 А/м, а також РЧ-ЕМВ надзвичайновисокочастотного (НзВЧ) діапазону стандарту GSM-1800, частота випромінювання 1871 МГц, потужність 0,1, 2,5 і 10 Вт/м², і НзВЧ РЧ-ЕМВ сантиметрового діапазону (генератор «Луч-11») з частотою 2450 МГц і потужністю 15 Вт, а також НзВЧ РЧ-ЕМВ міліметрового діапазону (генератор «MRTA-02») з частотою випромінювання 57-62,5 ГГц і потужністю випромінювання 10⁻⁴ Вт. Наночастки металів (золото, срібло, залізо, церій, гадолій, ванадій) в концентрації 0,1 нМ - 1 мМ, нанобіокомпозитів на основі карагенану і галактоманану 0,1-1 мг/мл, новітніх похідних арилаліфатичних аміноспиртів (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенікси]-3-диметиламіно-2-пропанолу гідрохлорид) і адамантану ((1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(*N*-бензил, *N*-диметил-аміно)-2-пропанолу хлорид)) в концентраціях 0,5 і 1 МІК.

Вплив чинників стресу оцінювали на клітинах зі стадії логарифмічного росту або ж фази уповільненого росту безпосередньо у поживному середовищі або воді, залежно від умов експерименту. Клітини відмивали від діючого чинника і використовували для визначення фізіологічних показників росту, життєздатності, чутливості до антибіотиків полієнового і азолового ряду, для фракціонування і відокремлення фракції КС, виділення ДНК/РНК, білків (для аналізу методом SDS-PAGE), цукрів (для аналізу методом GC/MS і методом мічених лектинів), жирних кислот і стеролів (для аналізу методом GC/MS), для визначення активності ферментів дегідрогеназного комплексу (МТТ-тест) і каталаз (за асиміляцією пероксиду гідрогену при 240 нм), і для вимірів фізичних властивостей клітин (нанотвердість, гідрофобність, поверхневий заряд, шорсткість поверхні).

Адгезивні властивості клітин дріжджів вивчали на моделі біотичних (епітеліоподібні культури клітин ссавців) і абіотичних (Ni-Cr і Co-Cr сплави металів) поверхонь.

Блокування транскрипції виконували шляхом обробки клітин актиноміцином D (20 мкг/мл).

Величину генетичної відмінності визначали за допомогою програмного забезпечення NetWork 4.1.0.8 (Fluxus Technology, Суффолк, Великобританія) за довжиною продуктів ампліфікації ДНК, з праймерами до тетра nukлеотидного повтору (GACA)₄ і до гуанін-збагаченого повтору (GGG(TGGGG)₂TG).

Характер *генетичної взаємодії* між генами поліфосфатаз PPN1 і PPX1 визначали за допомогою фенотипового тесту (fitness-test).

Стабільність ДНК визначали методами гель-електрофорезу загальної ДНК і методом лужного гель-електрофорезу (метод комет).

Рівні експресії генів визначали методами кількісної ЗТ-ПЛР (*UBC6*, *FLO11*, *ELO1*, *OLE1* і *FAS1*) і в режимі мультиплексу, де одночасно оцінювали рівні експресії 15 генів, які включали три *housekeeping*-гени (*SEC21*, *ALG9*, *ACT1*), два гени поліфосфатаз (*PPN1* і *PPX1*), десять генів-маркерів специфічних стресів: *PDR12* (рН-специфічний індикатор), *RNR3* (маркер геномної нестабільності), *STI1* (маркер теплового шоку), *TRX12* (маркер оксидативного стресу), *GSY2* (маркер геномного стресу), *PHO84* (РЧ-ЕМВ чутливий білок), *CWP1* (маркер стресу КС), *HSP12*, *GRE2* і *GPD1* (відповідно, маркери гіперосмотичного стресу через *Msn2/4*, *Sko1* і *Hot1*).

Цитоморфологічні і субмікроскопічні зміни, індукцію апоптозу/некрозу в клітин дріжджів вивчали методами люмінесцентної мікроскопії із фарбуванням акридиновим помаранчевим, ДАФІ і пропідієм йодиду, методами електронної (трансмисійної і сканувальної) і атомно-силової мікроскопії у порівнянні з оптичними показниками клітин дріжджів, визначених методом проточної цитофлуориметрії.

Аналіз цифрових зображень проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.50i (National Institute of Health, USA).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм Microsoft Office Excel 2013 (Корпорація Майкрософт, США) і Statistica 10 (StatSoft Inc., США). В роботі застосовано методи параметричної і непараметричної статистики відповідно до типу отриманих даних, методи факторного дисперсійного аналізу з пост-хок аналізом і кластерний аналіз. Багатофакторні дослідження сплановано і виконано відповідні аналізи із використанням алгоритмів Бокса-Бенкена і центрального композиту для трьох і більше факторів. Відмінності між середніми значеннями вважали достовірними при рівні значущості $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфолого-структурні особливості клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів різних систематичних груп за дії факторів стресу хімічної і фізичної природи. При вивченні впливу на клітини бактерій і дріжджів новітніх антибіотичних сполук, наночасток металів, нанобіокомпозитів на основі карагенану і галактоманану, ЕМВ радіочастотного діапазону (40,68 МГц, 2450 МГц і 57-62,5 ГГц) і деяких генотоксичних чинників, були виявлені зміни на рівні ультраструктури КС, які характеризувалися зміною їх оптичної густини, товщини і розподілу на шари. Часто це супроводжувалося ознаками лізису і деградації поверхневих і внутрішньоклітинних структур, відшаруванням і інвагінаціями ЦПМ, а також змінами на рівні периплазматичного простору, нуклеоїду і ядерного апарату, тощо. Ефекти дії досліджуваних сполук залежали від природи діючого чинника і від виду мікроорганізму і для про- та еукаріотичних організмів відмічали різні цитоморфологічні зміни за дії однакових хімічних або фізичних чинників. Так, наприклад, лізис КС за дії похідного адамантану КВМ-114 в клітин бактерій *P. aeruginosa* відбувався лише як результат загальної загибелі клітин (Рис. 1Б), тоді як стан внутрішньоклітинних структур в клітин дріжджів *S. cerevisiae* залишався відносно інтактним (Рис. 1Г). Подібним чином відрізнялася й дія РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону (40,68 МГц) і НВЧ-діапазону (61,22 ГГц) на клітини бактерій *P. phosphoreum* і дріжджів *S. cerevisiae* (Рис. 1, Д-3), і в першому випадку зміни стосувалися розмірів периплазматичного простору (Рис. 1Е), а в другому випадку відбувалося утворення зовнішнього шару полісахаридної природи і зміни ультраструктури клітинної стінки (Рис. 1З). Відмінності в реакціях клітин різних видів, про- та еукаріотів, можуть бути пов'язані з різною локалізацією, чи будовою мішеней, на які направлена дія цих сполук в клітин про- та еукаріотів. Відмічені відмінності щодо шляхів реалізації ефектів РЧ-ЕМВ на клітини бактерій і дріжджів, спонукали зосередити увагу на вивченні шляхів і механізмів біологічної дії фізичних чинників стресу саме на модельному еукаріотичному організмі, яким є дріжджі *S. cerevisiae*.

Оцінка стресового характеру дії факторів хімічної і фізичної природи на клітини дріжджів.

Вплив стресових факторів на морфолого-структурні характеристики клітин дріжджів. Чинники хімічного стресу (пероксид гідрогену (0,1-120 мМ) і оцтова кислота, 20-120 мМ), а також вплив генотоксичного чинника (доксорубіцин, 5-100 мкг/мл) виступали індукторами пізнього апоптозу і некрозу в клітин дріжджів (Рис. 2, фракція Ф3 і Ф4). На відміну від них, дія РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону збільшувала число клітин в стадії раннього апоптозу на 58% (Рис. 2, фракція Ф1). Ефекти дії чинників стресу суттєво залежали від дефектності клітин за полі(Ф)азами РРН1 і РРХ1. Дія пероксидного і кислотного стресів була менш ефективною для клітин дріжджів дефектних за однією з полі(Ф)аз, тоді як ефективність дії РЧ-ЕМВ знижувалася лише в клітин дефектних за РРХ1. Проте ефективність дії

хімічних чинників стресу в цілому відновлювалася в клітин подвійного мутанту, тоді як здатність РЧ-ЕМВ запускати процеси раннього апоптозу в таких клітин зникала.

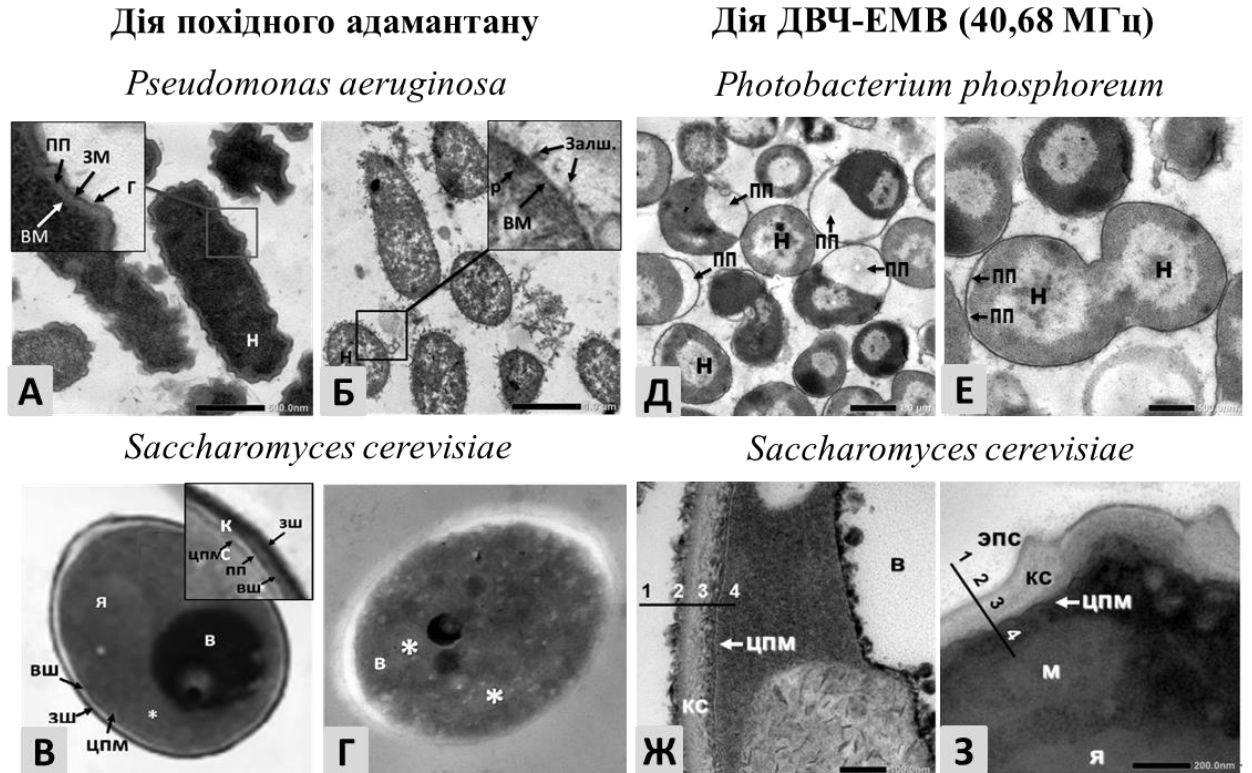


Рис. 1. Ультраструктура клітин *P. aeruginosa*, *P. phosphoreum* і *S. cerevisiae* за дії похідного адамантану (сполука КВМ-114) і за дії РЧ-ЕМВ (40,68 МГц, 15 Вт, 15 хв.). (А, В, Д і Ж) – клітини контрольних популяцій. (Б і Г) – клітини через 3 і 24 год, відповідно, дії сполуки в концентрації 1,0 МІК. (Е і 3) – клітини після дії випромінювання. Примітки: «н» - нуклеоїд, «я» - ядро, «цпм» - цитоплазматична мембрана, «пп» - периплазматичний простір, «зм» і «вм» - відповідно, зовнішня і внутрішня мембрани, «г» - глікокалікс, «р» - рибосоми, «*» - мітохондрія, «в» - вакуоль, «Залш.» - залишки лізованої клітинної стінки, «зш» і «вш» - відповідно, зовнішній і внутрішній шар клітинної стінки, «1, 2, 3, 4» - відповідно, позаклітинний простір, екзополімерний матрикс, клітинна стінка і цитоплазма.

Вплив стресових факторів на ферментні системи клітин дріжджів. Активність ферментів дегідрогеназного комплексу (загальна дегідрогеназна активність) не мала інформативного значення, бо суттєво варіювала в різних серіях дослідів і не виявляла закономірностей щодо дії чинників стресу.

Активність каталази збільшувалася майже в три рази вже за 15 хв дії РЧ-ЕМВ (Рис. 3). Ефект дії випромінювання знижувався із тривалістю експозиції і залежав від дефектності клітин за полі(Ф)азами, адже в клітин подвійного мутанта було відмічене лише дворазове підсилення каталазної активності через 30 хв опромінювання.

Отриманий результат вказує на збільшення пулу внутрішньоклітинного пероксиду за дії РЧ-ЕМВ ДВЧ-діапазону. Проте, той факт, що із збільшенням

тривалості експозиції активність каталаз знижується, може бути свідченням того, що утворення пероксиду є непрямим результатом дії цього типу випромінювання. Натомість це може бути результатом ушкодження ферментних, чи структурних елементів клітини, результатом порушення роботи АФК-редуючих систем, тощо, що й викликає збільшення вмісту пероксиду і вимагає тимчасової активації каталаз.

Фракція	<i>Wt</i>	<i>Appn1</i>	<i>Appx1</i>	<i>Appn1::Appx1</i>
Ф1	ЕМВ (58%)	ЕМВ (59%)	ЕМВ (36%)	Немає
Ф2	Немає	Немає	DOX (55%)	DOX (34%)
Ф3	H ₂ O ₂ (33%) Опт. к-та (47%)	Немає	Немає	H ₂ O ₂ (34%) Опт. к-та (55%) DOX (38%)
Ф4	H ₂ O ₂ (43%) Опт. к-та (34%)	H ₂ O ₂ (32%)	Немає	H ₂ O ₂ (30%)

Рис. 2. 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.

Зважаючи на це ми вивчили рівні експресії *UBC6*, гену, який кодує один з білків убіквітинового комплексу знешкодження дефектних білків. Рівні експресії цього гену збільшувалися в 1,5-2,1 раза ($p \leq 0,05$) під дією на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ, що опосередковано вказує на активацію цього ферментного комплексу і може бути непрямим доказом того, що збільшення вмісту пероксиду за дії РЧ-ЕМВ, може бути результатом деградації білків.

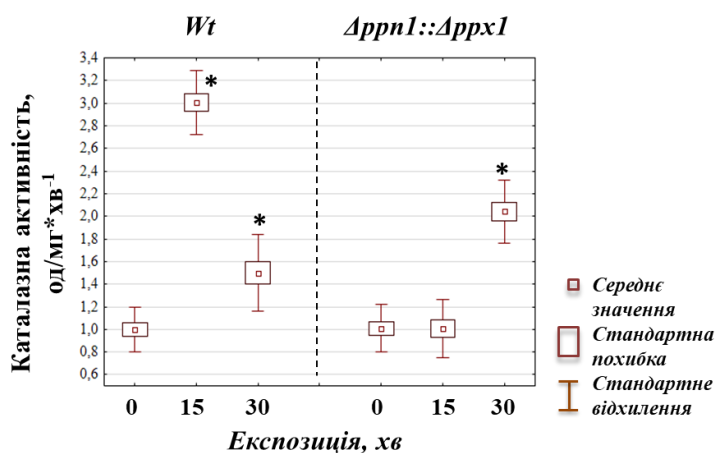


Рис. 3. Активність каталаз в клітинах дріжджів за дії РЧ-ЕМВ (40,68 МГц). Відмічені «*» ефекти відрізняються від відповідних значень за експозиції 0 хв при $p \leq 0,05$.

Вплив стресових факторів на стабільність геному. Дія чинників стресу призводила до морфологічних змін в будові ядерного апарату (утворення гетерохроматину) і викликала геномну мінливість (Рис. 4).

Загальні геномні профілі відрізнялися для різних чинників стресу і залежали від штамових особливостей клітин дріжджів і від дефектності клітин за полі(Ф)азами.

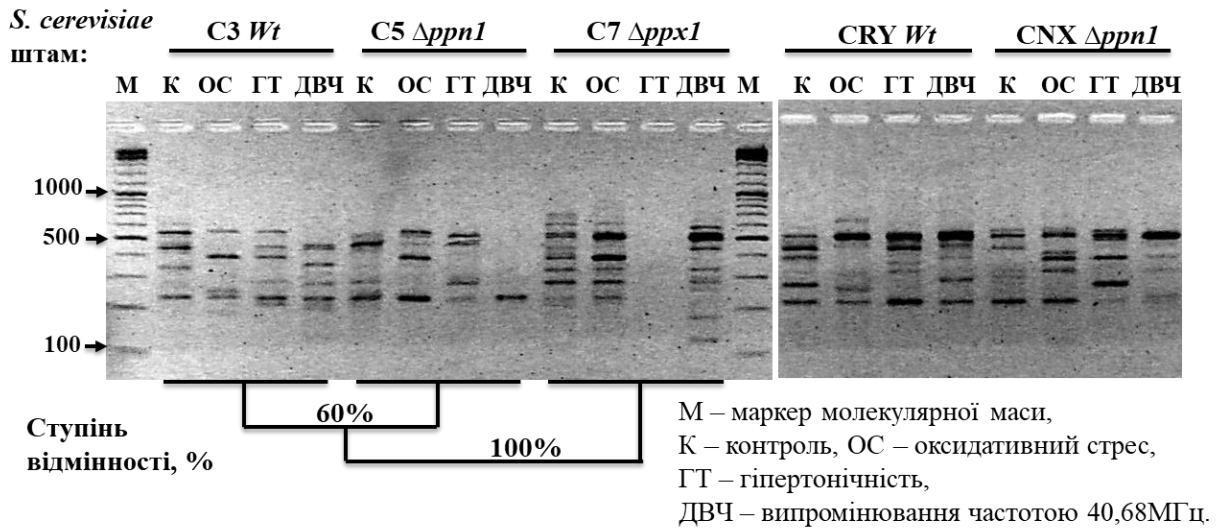


Рис. 4. Електрофореграми продуктів ампліфікації з праймером до гуанін-збагаченого повтору (GGG(TGGGG)₂TG).

Здатність чинників стресу викликати геномну мінливість була необерненою, проте не виявляла зв'язку з можливою мутагенною дією цих чинників, адже серед досліджених типів ЕМВ лише НЗВЧ-випромінювання з частою 62,5 ГГц було індуктором мітотичної рекомендації і прямих мутацій. В той же час ДВЧ-випромінювання (40,68 МГц) не мало мутагенної дії. НЗВЧ-випромінювання сприяло утворенню дволанцюгових розривів молекули ДНК і посилювало подібну ж дію для УФ-випромінювання, яке в нормі викликало лише одностанцюгові розриви.

Вплив стресових факторів на активність стрес-індукованих генів.

Аналіз рівнів експресії генів-маркерів стресової дії показав, що дефектність за полі(Ф)азами впливає на рівні експресії цих генів за нормальних умов культивування (Рис. 5А). Загалом, дефектність клітин за полі(Ф)азами викликає посилення експресії гену *STII*, який кодує білок кошаперону *hsp90* і рН-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 рН, які мають місце в клітинах дріжджів дефектних за цими полі(Ф)азами. Дефектність за *PPN1* додатково викликає ще й зміну внутрішньоклітинної тонічності.

Під дією чинників стресу в клітинах дріжджів відбувається посилення експресії генів *GSY2*, *RNR3*, *GRE2*, *GPD1* і *HSP12* (Рис. 5Б), що може вказувати на реплікативний стрес. Одночасно з цим, в клітин дефектних за *PPX1* за дії

окисного стресу відбувається додаткове посилення експресії *STI1*, що вказує на активацію синтезу альфа-амілоїдних білків і на фоні підвищеної активності *HSP12* може свідчити про стрес на рівні ЦПМ. В клітин дефектних за обома полі(Ф)азами за дії пероксиду гідрогену, відбувається посилення активності *CWP1*, що вказує на стрес на рівні КС. Залежність виявлених ефектів від дефектності клітин за полі(Ф)азами вказує на існування різних шляхів формування стресових реакцій в дефектних клітинах, які опосередковані активністю ферментів *PPN1* і *PPX1*.

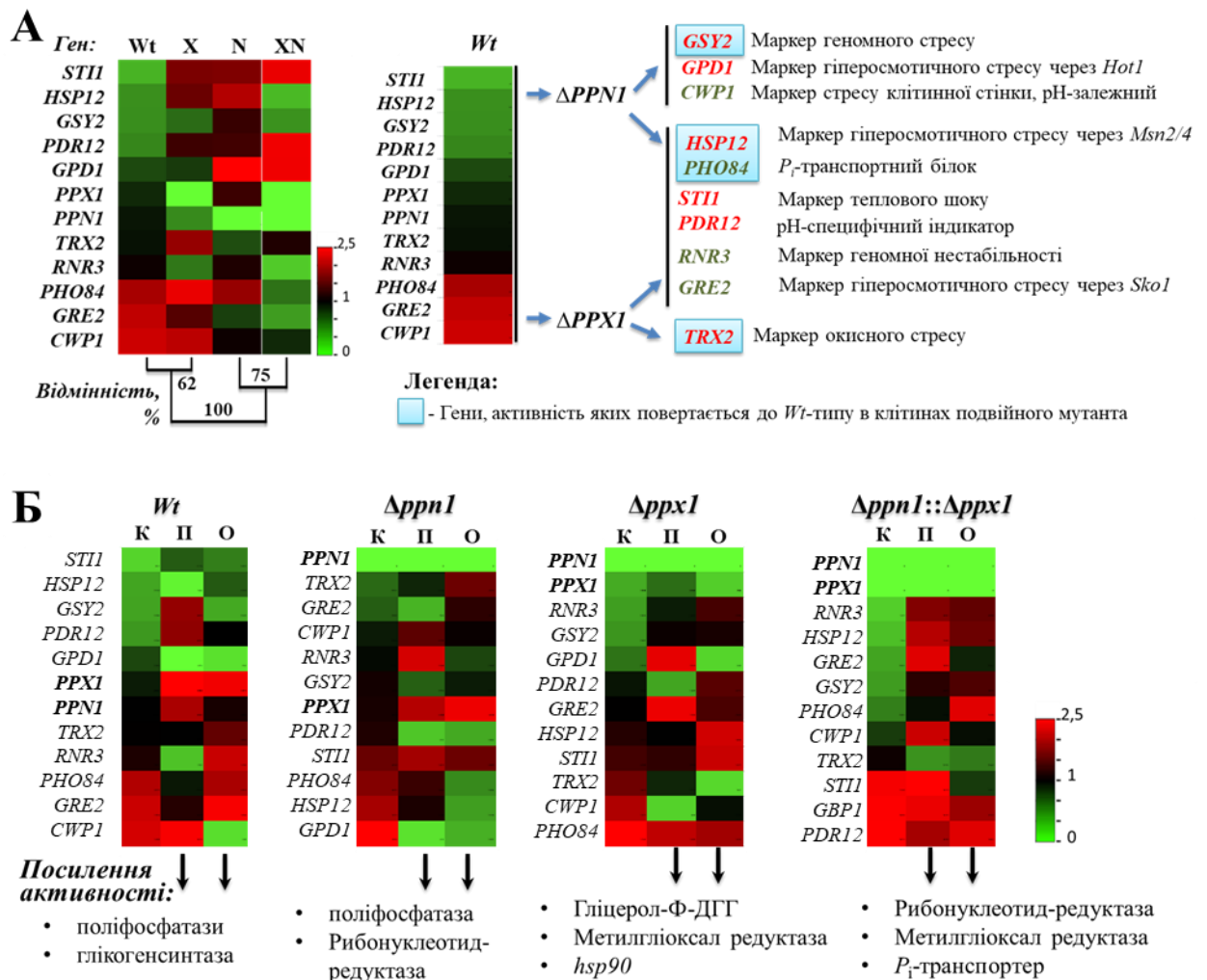


Рис. 5. Величина експресії генів-маркерів стресового навантаження в клітинах дріжджів дефектних за полі(Ф)азами *PPN1* і *PPX1* в нормі (А) та за умов стресового навантаження (Б). Представлено рівні експресії генів відносно *housekeeping*-генів. «X, N, XN» - відповідно, клітини дефектні за *PPX1*, *PPN1* і подвійний мутант, «К» - контроль, «П» - пероксид гідрогену 10 мМ, «О» - оцтова кислота 150 мМ.

Проведений аналіз цитоморфологічних, біохімічних і генетичних показників клітин дріжджів за дії хімічних і фізичних факторів показав, що РЧ-ЕМВ є чинником клітинного стресу. Ефекти дії випромінювання проявляються на всіх ланках структурної організації клітин і залежать від біологічних властивостей живих організмів і фізичних параметрів

випромінювання. Залежність ефектів дії чинників стресу від дефектності клітин за поліфосфатазами може вказувати на роль цих ферментів і одночасно на роль полі(Ф)-ланцюгів, які, за даними літератури, мають певні іонообмінні властивості і, відповідно, їх довжина може визначати стійкість клітин до ряду хімічних сполук [Albi and Serrano, 2016]. Згідно отриманих нами даних довжина полі(Ф)-ланцюгів може відігравати роль при формуванні стійкості клітин дріжджів до кислотного стресу, тоді як дефектність за полі(Ф)азами мала вагому роль у стійкості клітин до всіх досліджених чинників стресу.

Склад клітинної стінки та позаклітинного матриксу в нормі та за дії стресового навантаження.

Цукри клітинної стінки і позаклітинного матриксу за дії стресів. За результатами проведених нами досліджень, 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 (Рис. 6). Ефекти мали дозову і часову залежність і були опосередковані дефектністю клітин за полі(Ф)азами і дією ДВЧ-ЕМВ.

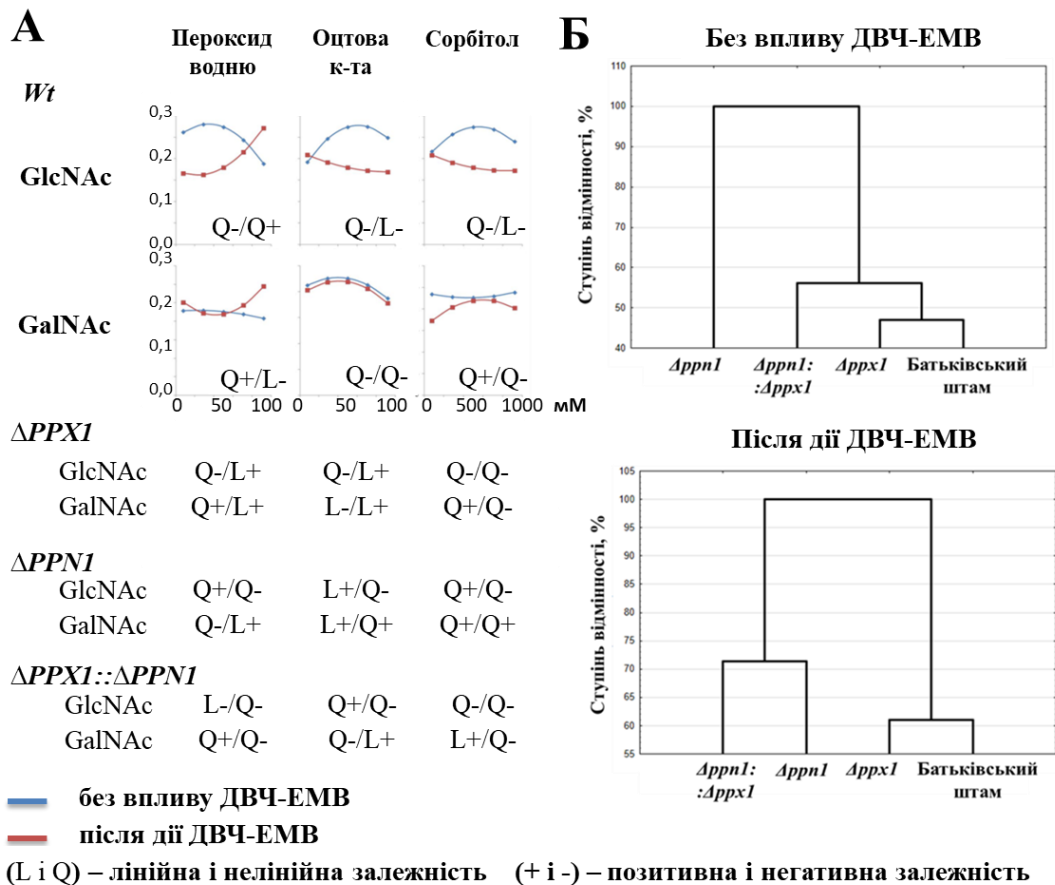


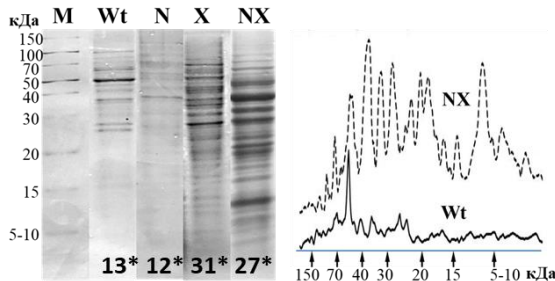
Рис. 6. Вплив факторів стресу на вміст *N*-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) і *N*-ацетилгалактозаміну (GalNAc) в КС дріжджів дефектних за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1. (А) – Ефекти дії стресів. Символ «/» розділяє ефекти без обробки ДВЧ-ЕМВ (з лівої сторони) і після обробки ДВЧ-ЕМВ (з правої сторони). (Б) – Кластеризація штамів за ступенем подібності доза-залежних кривих.

Дефектність клітин за полі(Ф)азами не впливала на вміст мажорних складових КС – манози (46%-52%) і глюкози (46%-53%) але призводила до зменшення вмісту глюкозаміну в 2,5-3,0 рази в клітин з поодинокими мутаціями (від $2,1 \pm 0,2\%$ в клітин дикого типу до $0,7\%-0,8\%$ в клітин дефектних за РРХ1 і РРН1, відповідно) і майже в 5 разів в клітин із подвійною делецією (до $0,4 \pm 0,1\%$). Під дією чинників стресу вміст глюкозаміну зменшувався в клітин дефектних за РРН1 і зростав в клітин дефектних за РРХ1, тоді як в клітин із подвійною делецією ефект залежав від типу стресу (Рис. 6А). Також КС клітин дефектних за РРХ1 і, відповідно, клітин подвійного мутанту, не містили рибози, рівень якої становив $0,5-0,6\%$ в клітин батьківського штаму і клітин дефектних за РРН1.

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.

Білки клітинної стінки за дії стресів. Вміст білків в КС виявив залежність від дефектності клітин за полі(Ф)азами (Рис. 7). Дефектність за РРХ1 найбільш впливала на профіль білків із луго-чутливими зв'язками ($R = 52\%$), 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 РРН1 (Рис. 7). Проте, дефектність за РРН1 впливає на профілі білків із нековалентними зв'язками ($R = 19\%$), що здебільшого стосувалося їх кількісного вмісту.

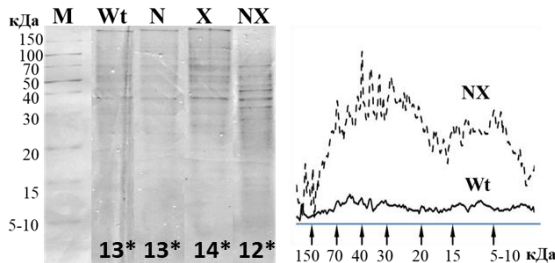
БКС, зв'язані через луго-чутливі зв'язки



Кореляція (R, %) і кластерний аналіз:

Штам	Wt	$\Delta ppn1$	$\Delta ppx1$	$\Delta ppn1::\Delta ppx1$	Відмінність
Wt	-	68 $p=0,01$	52 $p=0,01$	16 $p=0,01$	
$\Delta ppn1$	68 $p=0,01$	-	49 $p=0,01$	3 $p=0,55$	100%
$\Delta ppx1$	52 $p=0,01$	49 $p=0,01$	-	31 $p=0,01$	
$\Delta ppn1::\Delta ppx1$	16 $p=0,01$	3 $p=0,55$	31 $p=0,01$	-	

БКС, зв'язані через дисульфідні містки або нековалентні зв'язки



Штам	Wt	$\Delta ppn1$	$\Delta ppx1$	$\Delta ppn1::\Delta ppx1$	Відмінність
Wt	-	19 $p=0,01$	60 $p=0,01$	51 $p=0,01$	
$\Delta ppn1$	19 $p=0,01$	-	23 $p=0,01$	39 $p=0,01$	62%
$\Delta ppx1$	60 $p=0,01$	23 $p=0,01$	-	23 $p=0,01$	
$\Delta ppn1::\Delta ppx1$	51 $p=0,01$	39 $p=0,01$	23 $p=0,01$	-	

Рис. 7. Профілі білків клітинної стінки (БКС) дріжджів. Примітка: «Wt» – білки з клітин батьківського штаму, «N», «X» і «NX» – білки з клітин дефектних за полі(Ф)азами РРН1, РРХ1 і клітин з подвійною делецією, відповідно. «М» – маркер молекулярної маси білків (у кДа). «*» - цифра вказує кількість смуг на електрофоретичній доріжці.

Електрофоретичні профілі білків не змінювалися суттєвим чином під дією досліджуваних факторів стресу. Зважаючи на такий результат ми вивчили рівні експресії окремих генів, які кодують білки КС. Як модель, було обрано ген *FLO11*, який кодує білок-флокулін [Voordeckers *et al.*, 2012], і ген *CWP1*, який кодує структурний білок, рівень експресії якого є маркером стресу КС [Boorsma *et al.*, 2004; Kapteyn *et al.*, 2001].

Рівні експресії цих генів виявили значну залежність від дефектності клітин за полі(Ф)азами, а також суттєво реагували на дію факторів стресу (Рис. 8). Транскрипційна активність *FLO11* збільшувалася за дії ДВЧ-випромінювання і зменшувалася за дії пероксидного і кислотного стресів. Зважаючи на вагому роль білку Flo11p у процесах флокуляції, міжклітинній взаємодії, кворумсенсінгу, при гіфальному рості, тощо [Voordeckers *et al.*, 2012], збільшення його активності за дії ДВЧ-ЕМВ може бути однією з причин відміченого нами посилення адгезивних властивостей опромінених клітин дріжджів. Зменшення ж рівня експресії *CWP1* за дії кислотного стресу, вказує на загальний стрес КС за цих умов.

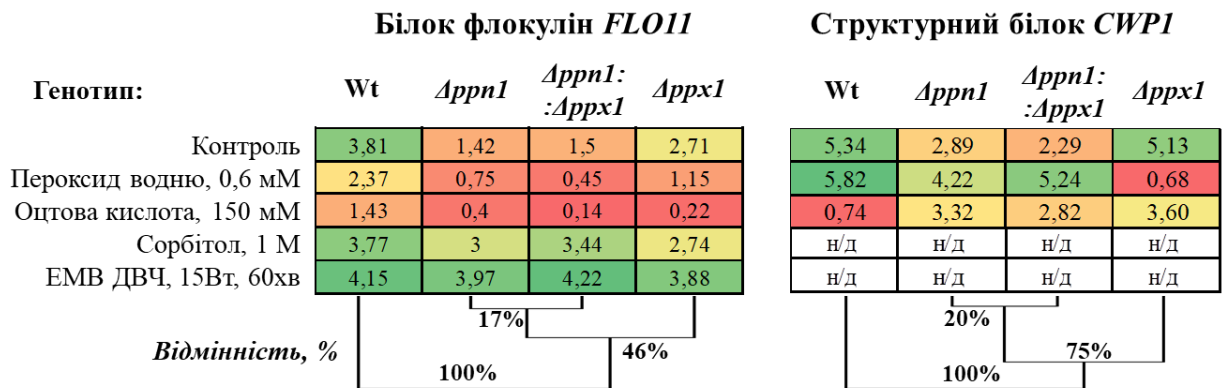


Рис. 8. Вплив стресових факторів на рівні експресії генів *FLO11* (qRT-PCR) і *CWP1* (RT-PCR).

Загалом, рівні експресії цих генів не виявляли достовірної залежності із стійкістю клітин дріжджів до дії чинників стресу, проте мали надвисокі кореляційні індекси (97%-99% при $p < 0,03$) із показником наножорсткості КС. Величина наножорсткості КС, в свою чергу, виказувала певну залежність із життєздатністю клітин дріжджів за дії осмотичного шоку (73% при $p = 0,27$) і пероксидного стресу. В останньому випадку ефект набував більшої достовірності із збільшенням концентрації пероксиду: 72% ($p = 0,28$) при концентрації пероксиду гідрогену 0,3 мМ і 86% ($p = 0,14$) при концентрації пероксиду гідрогену 10 мМ. Зважаючи на те, що жорсткість КС визначає стійкість клітин дріжджів до деяких стресів, роль білків може вважатися опосередкованою саме через зміну фізичних параметрів КС.

Вплив факторів стресу на цитоплазматичну мембрану клітин дріжджів. Аналіз вмісту ЖК клітин дріжджів показав, що ця величина є динамічною, нелінійно змінюється з часом (Рис. 9А) і залежить від рівня життєздатності клітин (Рис. 9Б). Склад ЖК не залежав від дефектності клітин за полі(Ф)азами (Рис. 9В) проте достовірно змінювався за дії окремих

стресових факторів (ДВЧ-ЕМВ і антибіотика ністатина). Обидва чинники стресу знижували вміст пальмітинової (C16:0) ЖК і у випадку ністатину такий ефект може бути пов'язаним із загальним зниженням рівню життєздатності клітин дріжджів під дією цього чиннику (Рис. 9Б). У випадку ж дії ДВЧ-ЕМВ відбувається послаблення певних етапів біосинтезу ЖК, про що свідчить майже дворазове зниження рівнів експресії гену десатурази ЖК *OLE1* (Рис. 10), на фоні стабільної активності інших генів: *ELO1* (елонгази ЖК) і *FAS1* (синтетази ЖК).

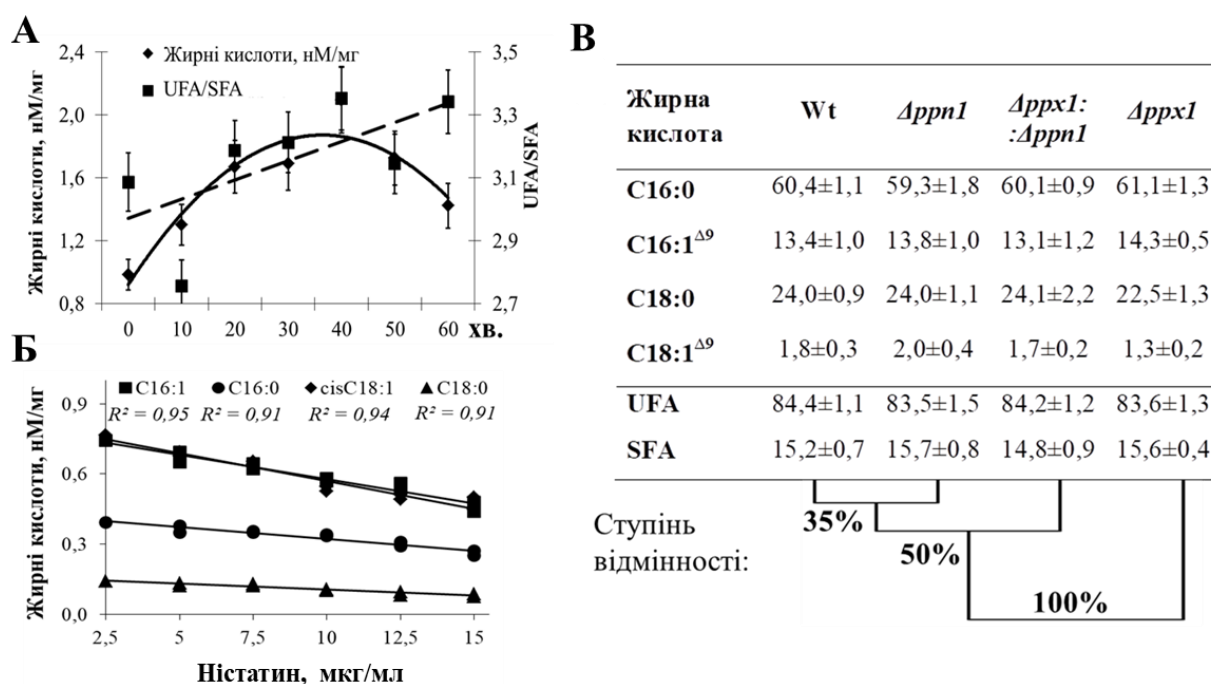


Рис. 9. Вміст жирних кислот в клітинах дріжджів. (А) – часова динаміка зміни загального пулу ЖК і співвідношення ненасичених ЖК до насичених ЖК («UFA/SFA»). (Б) – вміст ЖК за дії ністатину. (В) – вміст ЖК (у %) в клітинах дріжджів дефектних за генами полі(Ф)аз *PPN1* і *PPX1*.

	Десатураза <i>OLE1</i>		Елонгаза <i>ELO1</i>		Синтетаза <i>FAS1</i>	
	Контроль	ДВЧ-ЕМВ	Контроль	ДВЧ-ЕМВ	Контроль	ДВЧ-ЕМВ
<i>Wt</i>	1,78	0,85	1,45	1,32	2,99	3,29
<i>Appn1</i>	1,88	1,04	1,31	1,43	2,83	3,14
<i>Appx1</i>	1,72	1,08	1,44	1,66	2,78	2,60
<i>Appn1::Appx1</i>	1,72	0,82	1,35	1,44	3,10	2,90

Рис. 10. Вплив ДВЧ-випромінювання (40,68МГц, 30 Вт, 60 хв) на експресію генів, що кодують ферменти синтезу ЖК. Наведено значення величини експресії (2-ΔΔC_t).

Результати кореляційного аналізу показали, що рівень C18:x ЖК має обернену залежність із стійкістю клітин дріжджів до кислотного стресу ($R = 93\%-99\%$ при $p \leq 0,01-0,07$). Натомість вміст C16:x ЖК виявляв позитивний зв'язок із стійкістю клітин до пероксидного стресу ($R = 89\%-91\%$, $p \leq 0,10$).

На відміну від ЖК, показники вмісту стеролів варіювали в широкому діапазоні значень залежно від дефектності клітин дріжджів за полі(Ф)азами (Табл.), а також під дією факторів стресу. Вміст окремих проміжних продуктів на шляху біосинтезу ергостеролу (silane,[[[(3.beta.,22E)-ergosta-7,22-dien-3-yl]oxy]trimethyl- i 5.Xi.-Ergost-7-ene,3.beta.-(trimethylsiloxu)-) виявляв досить високі кореляційні залежності із стійкістю клітин до кислотного стресу, пероксидного стресу і гіпертонічності. Під дією ДВЧ-ЕМВ відбувалася загальна активація синтезу ергостеролу, однак ефект не мав універсального характеру адже не виявлявся в клітин дефектних за полі(Ф)азами. Це вказує одночасно на вагомую роль полі(Ф)аз в процесах біосинтезу стеролів і на шляхах реалізації біологічної дії ЕМВ.

Таблиця.

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	Appn1	Appn1: Appx1	Appx1	Wt	Appn1	Appn1: Appx1	Appx1
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.-(trimethylsiloxu)-	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:			33%				68%			
			100%				100%			
			10%				44%			

Вплив факторів стресу на фенотипові показники клітин дріжджів. Виявлені зміни на рівні КС, ПКМ і ЦПМ, так само як і зміни ферментативних і транскрипційних процесів можуть суттєво вплинути на різноманітні фенотипові показники, серед яких величина адгезії і стійкість до антибіотиків

полієнового і азолового ряду безпосередньо пов'язані із властивостями КС, ПКМ і ЦПМ.

Стійкість клітин дріжджів до фунгіцидних антибіотиків. Стійкість клітин дріжджів до антибіотиків полієнового і азолового ряду визначається особливостями будови ЦПМ і доступністю білків-мішеней, власне ланостерол 14 α -деметиلاзи [VanDen Bossche et al. 1990]. Проведений аналіз показав, що стійкість клітин до антибіотиків зростає за дії пероксидного стресу і випромінювання ДВЧ (40,68 МГц) і НЗВЧ (1871 МГц) діапазонів. Гіперосмотичний шок збільшував стійкість до антибіотиків в клітин дефектних за полі(Ф)азою PPN1 і, відповідно, в клітин подвійного мутанта. Дія ж кислотного стресу в багатьох випадках мала протилежний характер і збільшувала чутливість клітин до антибіотиків.

Згідно отриманих нами даних ключовими елементами для формування мікробної стійкості до антибіотиків виступають рівень глюкозаміну КС і ергостеролу ЦПМ, а також рівень експресії *PHO84*, гену, який кодує білок трансмембранного каналу транспорту фосфату (Рис. 11). Одночасно з цим, під дією чинників стресу можуть відбуватися зміни конформації білків-мішеней азолових антибіотиків. Усе разом це може сприяти зменшенню проникності антибіотиків в клітину або ж зменшувати доступність білків-мішеней, що в обох випадках матиме позитивний ефект для підвищення рівня життєздатності клітин дріжджів.

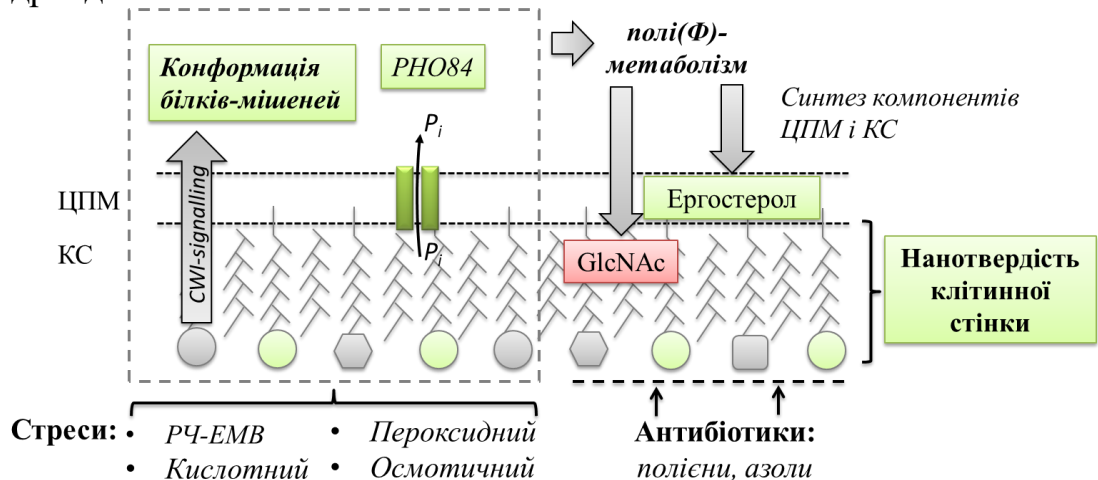


Рис. 11. Схема дії факторів стресу на чутливість клітин дріжджів до антибіотиків. «ЦПМ» - цитоплазматична мембрана, «КС» - клітинна стінка, «GlcNAc» - *N*-ацетилглюкозамін, «РЧ-ЕМВ» - радіочастотне електромагнітне випромінювання.

Проведений аналіз підтвердив, що за дії чинників стресу відбуваються структурні зміни в КС і ЦПМ, які можуть бути безпосередньою причиною збільшення стійкості клітин дріжджів до антибіотиків.

Адгезивні властивості клітин дріжджів до абіотичних поверхонь. Для вивчення адгезивних властивостей клітин дріжджів до абіотичних поверхонь як модель було обрано нікель-хромові і кобальт-хромові сплави, які широко використовуються для виготовлення зубних протезів. Проблема

контамінації зубних протезів мікроорганізмами, в тому числі й дріжджами, є однією з найбільш гострих у сфері протезування.

Відібрані сплави відрізнялися за хімічним складом, методом литва і типом плавки. Результати проведених аналізів показали, що величина адгезії клітин дріжджів на поверхні цих сплавів визначається штамовими особливостями і властивостями самих сплавів (Рис. 12). В результаті дії на клітини дріжджів ДВЧ-ЕМВ, адгезивні властивості клітин збільшувалися, але вагомість штамових особливостей відходила на другий план і на перше місце виходили фізичні параметри сплавів (Рис. 12). Проте серед можливих фізичних чинників адгезії (шорсткість поверхні сплавів, їх гідрофобність і мікроадгезивні сили) найбільш вагомим виявився лише хімічний склад сплавів.

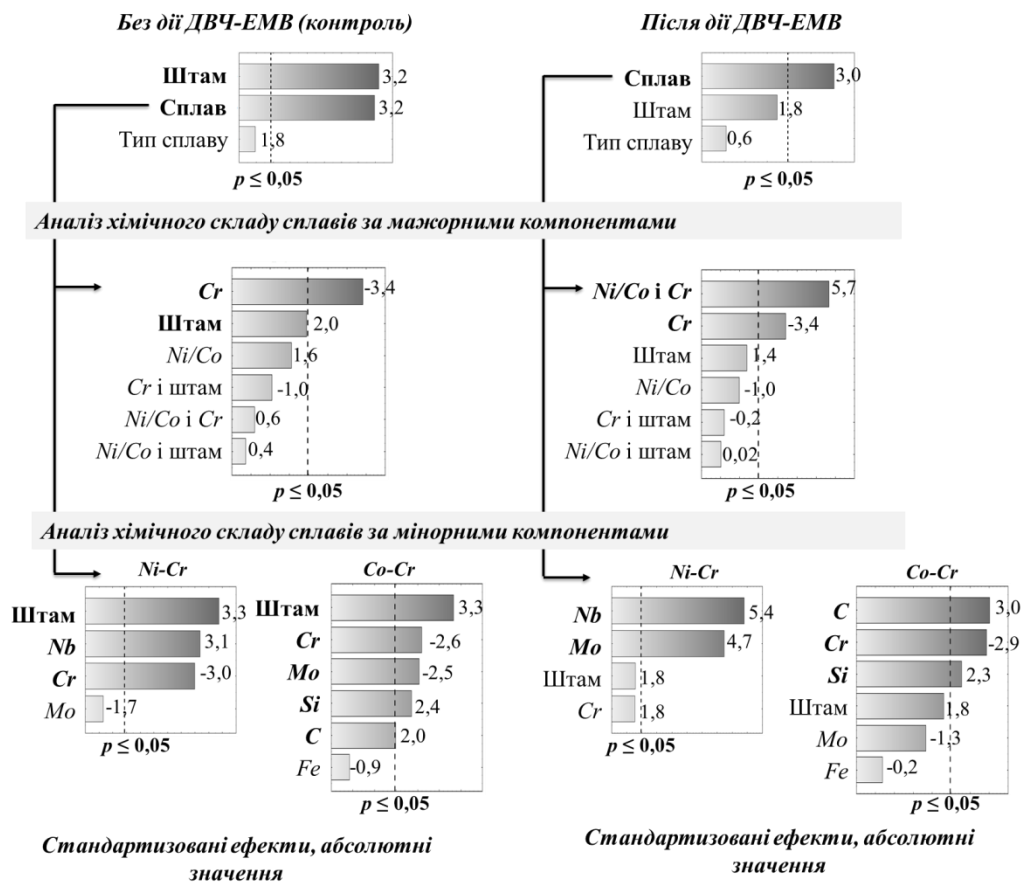


Рис. 12. Вплив біотичних і абіотичних чинників на величину адгезії клітин дріжджів до нікель-хромових і кобальт-хромових сплавів. Примітка: жирним шрифтом виділено фактори, вплив яких на величину адгезії клітин дріжджів є достовірним при $p \leq 0,05$.

Отриманий результат дозволяє припустити, що збільшення адгезивних властивостей клітин дріжджів в результаті опромінювання може відбуватися за рахунок збільшення стійкості клітин дріжджів до токсичних іонів металів (Ni^{2+} , Cr^{3+}), які можуть утворюватися на поверхні в результаті хемокорозії.

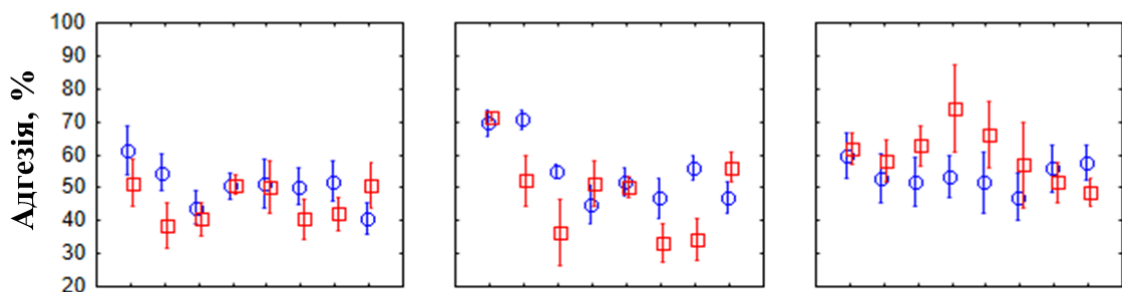
Процес міжклітинної взаємодії, адгезія до біотичних поверхонь. Для вивчення адгезивних властивостей клітин дріжджів до біологічних об'єктів було обрано культури епітеліоподібних клітин і клітин фібробластів. Такі

взаємодії активно вивчаються, зважаючи на патогенність деяких видів дріжджів і шляхи їх потраплення в організм людини. Проте застосування непатогенних модельних клітини дріжджів є зручною моделлю для вивчення природи і механізмів, які лежать в основі подібних взаємодій.

Результати інгібіторного аналізу показали (Рис. 13), що величина адгезії клітин дріжджів може змінюватися за рахунок впливу ДВЧ-ЕМВ на синтез поверхневих білків адгезинів, чутливих до іонів кальцію і заліза, до ЕДТА і ряду цукрів. Вплив ДВЧ-ЕМВ на синтез адгезинів чутливих до іонів заліза і до цукрів опосередкований активністю полі(Ф)ази PPN1 (Рис. 13).

Відмічені зміни величини адгезії були результатом активації процесів транскрипції і, відповідно, синтезу білків *de novo* у відповідь на дію ДВЧ-ЕМВ. Проте це жодним чином не впливало на загальний заряд (*дзета*-потенціал) і гідрофобність поверхні клітин дріжджів.

Клітини тестикули свиней (ST)



Клітини фібробластів мишей (L-929)

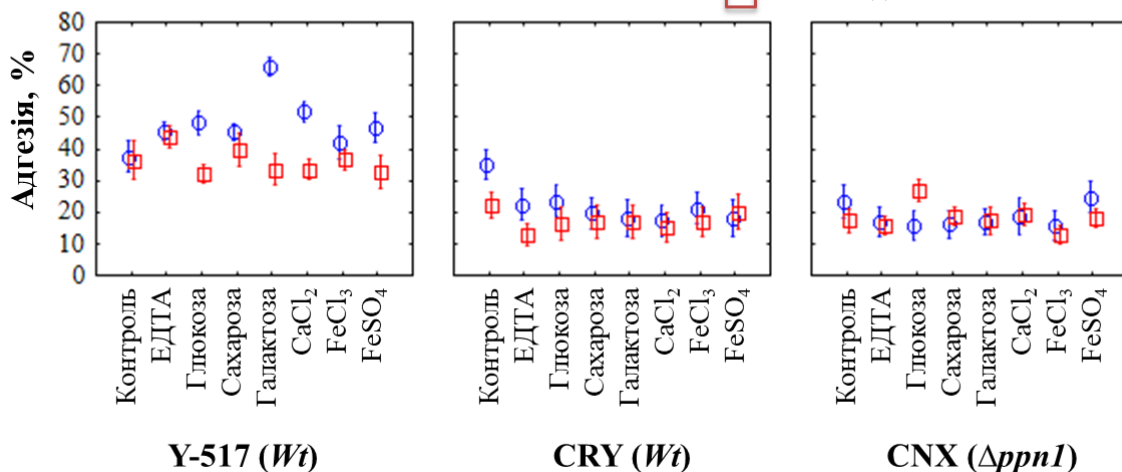


Рис. 13. Адгезія (%) клітин дріжджів штамів Y-517 (*Wt*), CRY (*Wt*) і CNX ($\Delta ppn1$) до моношару епітеліоподібних клітин тестикули поросят (ST) і клітин фібробластів мишей (L-929). Представлено середні значення і похибка середнього визначені за результатом дисперсійного аналізу (ANOVA) даних отриманих з трьох незалежних серій експериментів ($N \geq 11$).

В цілому, отримані результати підтверджують, що клітини дріжджів активно реагують на дію з боку ДВЧ-ЕМВ. За дії цього чинника стресу відбувається індукція транскрипційних процесів, які призводять до змін у складі поверхневих адгезинів.

Аналіз і узагальнення отриманих результатів. Усі хімічні чинники стикаються і взаємодіють з компонентами поверхневих структур (КС, ПКМ і ЦПМ), перш ніж потрапити в клітину. Водночас, ці клітинні структури не чинять перешкод для дії неіонізуючого ЕМВ радіочастотного діапазону. Цей тип випромінювання (на відміну, наприклад, від випромінювання оптичного діапазону, яке може поглинатися молекулами пігментів) 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 порушення перебігу хімічних реакцій, розриву хімічних зв'язків, тощо. 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 чутливість опромінених клітин до дії інших видів стресу.

Представлена на Рис. 14 схема демонструє зв'язки між дослідженими нами ланками внутрішньоклітинних процесів і каскадом взаємозалежних реакцій, які призводять до фенотипових і фізіологічних проявів на клітинному і популяційному рівнях. За результатами наших досліджень, компонентний склад КС, ПКМ і ЦПМ і активність певних ферментативних процесів визначають стійкість клітин дріжджів до хімічних стресів (пероксидного стресу, гіперосмотичного шоку і кислотного стресу), до генотоксичних чинників (доксорубіцин) і до антибіотиків (полієнів і азолів).

Перш за все ми виявили, що кількісний вміст окремих компонентів КС, ПКМ і ЦПМ знаходяться в прямій залежності один від одного. Порушення цілісності однієї зі структур вимагатиме пропорційних змін в будові інших для протидії чиннику стресу і забезпечення цілісності внутрішнього простору клітини. Процеси синтезу білків і цукрів КС і ПКМ, вміст 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.

Нами були виявлені окремі структурні компоненти, які можуть вважатися чинниками загальної стійкості до стресів. До таких можна віднести вміст *N*-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) в КС і рівень експресії *PNO84* (*P*_і-транспортний канал ЦПМ). Обидва показники виявляли високу (понад 90%) кореляційну залежність із стійкістю клітин до факторів стресу в цілому. Частково, це може бути пов'язано із особливостями надекспресії *PNO84*, яка за невідомим механізмом збільшує стійкість клітин до деяких хімічних чинників, таких як важкі метали [Ofiteru *et al.*, 2012]. Механізм, за яким GlcNAc може збільшувати стійкість клітин до різних чинників стресу невідомий, проте він може бути опосередкований через зміни пулу С18:х ЖК, з якими виявляє пряму кореляційну залежність. В свою чергу вміст С18:х ЖК може впливати на стійкість клітин дріжджів до кислотного стресу і гіпертонічності. Відсутність залежності між цими показниками і величиною

нанотведості 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.

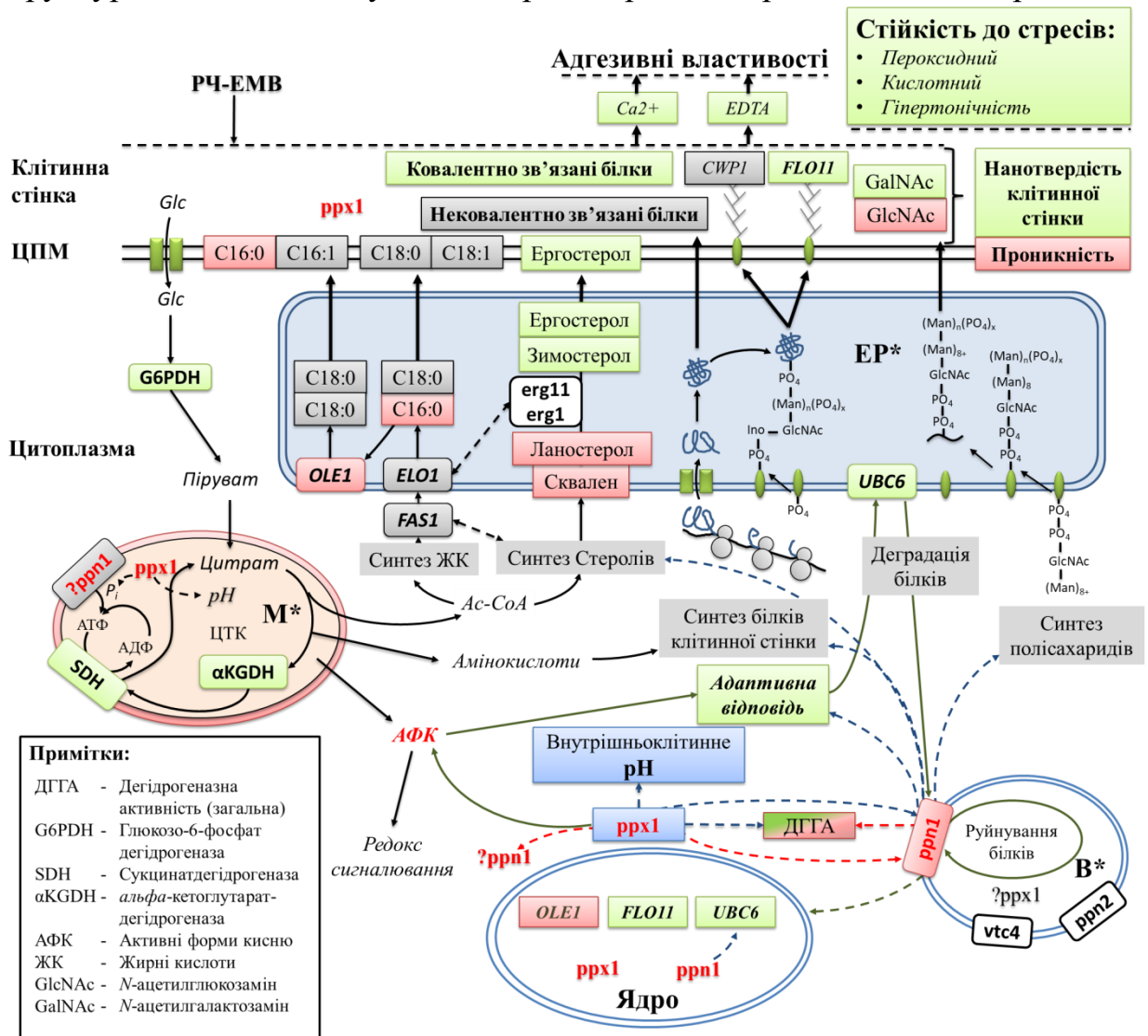


Рис. 14. Схема дії РЧ-ЕМВ на клітини дріжджів. Примітки: Зелений і червоний кольори, позначають елементи, активність яких відповідно підвищується чи знижується за дії ЕМВ, а сірим кольором – елементи, активність яких залишається незмінною. «ЕР*» – ендоплазматичний ретикулум, «В*» – вакуоля, «М*» – мітохондрія.

Чинниками загальної стійкості до стресів можуть бути також окремі попередники на шляху синтезу ергостеролу: сілан, [(3- β -22E)-ергоста-7,22-дієн-3-іл]окси]триметил- і 5-Хі-ергост-7-ен-3- β -(триметилсілокси)-. Обидві сполуки раніше вже були визначені в клітинах дріжджів [Le Fur *et al.*, 1999], проте біологічна їх роль не встановлена. За результатами наших досліджень вміст цих сполук показав достовірно високі кореляційні індекси із стійкістю клітин дріжджів до всіх вивчених факторів стресу, а тому вони можуть бути долучені до формування загальної відповіді на стреси. На противагу цим двом сполукам, пул ергостеролу виявляв лише близьку до достовірної ($p \leq 0,07$) залежність із стійкістю клітин до кислотного стресу.

Зважаючи на те, що ефекти дії досліджених чинників стресу суттєвим чином залежали від дефектності клітин за полі(Ф)азами PPN1 і PPX1. Ці ферменти також можна вважати факторами загальної відповіді на стреси і їх роль може полягати у регуляції внутрішньоклітинного рН і тоничності, підтримці редокс-потенціалу, тощо. Окрім іншого нами виявлено, що запуск процесів АВ відбувається завдяки активності PPN1 і цей фермент може займати проміжне положення на шляху передачі сигналу від Hog1 до процесів формування АВ [Alonso-Monge *et al.*, 2001].

Вузькоспецифічними чинниками стійкості до окремих видів стресу можуть бути віднесені наномеханічні властивості (жорсткість) КС. Ця величина впливає на стійкість клітин до осмотичних пертурбацій і механічних деформацій [Levin, 2011; Cabib, 2009; Klis *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2016]. Проте ми виявили зв'язок між жорсткістю КС і стійкістю клітин до дії пероксидного стресу. Подібний зв'язок був відмічений й іншими дослідниками, які назвали, як можливу причину такої залежності, механічне розтягуванні мембрани внаслідок дії осмотичного стресу, що створює фізичний бар'єр для дифузії пероксиду гідрогену [Mathai and Sitaramam, 1994; Dupont *et al.*, 2011]. Результати наших досліджень виступають в підтримку такого припущення зважаючи на те, що зміни величини нанотвердості і зменшення проникності ЦПМ [Voichuk and Gromozova 2004], які виникають за дії РЧ-ЕМВ, можуть бути гомеостатичною протидією саме осциляціям внутрішньоклітинного тиску.

Основними чинниками механічної стійкості КС вважають полісахариди [Levin 2011; Cabib 2009] і особливу роль в цьому відводять хітину [Klis *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2016]. Однак ми виявили, що ключовим чинником нанотвердості є комплекс, який складається з GalNAc КС і ПКМ, N-ацетилнейрамінової кислоти ПКМ, а також GPI-білків КС (*Cwp1* і *Flo11*). Для вказаних цукрів, за даними літератури, не виявлено можливої ролі у забезпеченні механічної сили КС, так само, як і білкам КС приписують зовсім інші функції не пов'язані із механічною пружністю [Orlean, 2012; Klis *et al.*, 2006; Levin, 2005; Klis *et al.*, 2002; Levin, 2011]. 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 непрямыми.

Тим не менше, механізм біологічної дії РЧ-ЕМВ суттєво відрізняється від дії хімічних чинників стресу. Дія ЕМВ (зважаючи на мікроскопічні розміри клітин) відбувається одразу по всій площині клітини, на всіх рівнях її структурної організації і зачіпає енергетичні і конструктивні процеси гліколізу і циклу Кребса, біосинтез ЖК і стеролів, процеси транскрипції і трансляції,

тощо. КС, ПКМ і ЦПМ не мають специфічних структур, які могли б перешкоджати дії РЧ-ЕМВ. Проте, під дією цього фактору відбувається посилення експресії генів, які кодують GPI-білки КС (*Flo11*), а також білку *Ubc6*, який входить до складу убіквітинового комплексу деградації дефектних білків, зменшується рівень експресії десатурази ЖК *Ole1*, а також відбуваються зміни в складі поверхневих адгезинів. Все це разом вказує на те, що структура КС, ПКМ і ЦПМ змінюється під дією РЧ-ЕМВ, а в цитоплазмі збільшується пул дефектних білків. Залежність ефективності дії РЧ-ЕМВ від активності полі(Ф)аз вказує на існування внутрішньоклітинного триггеру, який запускає клітинну відповідь на дію цього чинника стресу через метаболічні шляхи опосередковані активністю полі(Ф)аз. Загальний механізм дії РЧ-ЕМВ може розпочинатися із загального збудження всіх внутрішньоклітинних молекул, що викликає перешкоди для їх нормальній роботі і призводить до збільшення вмісту внутрішньоклітинних АФК, принаймні пероксиду. АФК порушують функції білків, а також впливають на структуру і стабільність ДНК. Це призводить до зміни внутрішньоклітинної осмолярності і рН, що слугує сигналом для активації відповідних сигнальних шляхів і запуску репараційних процесів.

Такий механізм дії РЧ-ЕМВ передбачає, що біологічний прояв дії цього чинника стресу буде цілком залежати від того, які ланки клітинної організації і які ферменти системи постраждали більше за все і, відповідно, які репараційні чи метаболічні процеси були активовані для відновлення їх структури і функцій. А тому це пояснює існування нестабільності і стохастичності біологічних ефектів дії різних типів РЧ-ЕМВ.

Утворення АФК і власне пероксиду, як одного з основних механізмів біологічної дії неіонізуючого випромінювання, узгоджується з даними літератури, де показано збільшення внутрішньоклітинного пероксиду і АФК в цілому, під дією різних типів випромінювання (від низькочастотного до високочастотного) на еволюційно різних об'єктах (від клітин бактерій до ссавців) [Castello *et al.*, 2014; Kivrak *et al.*, 2017]. І результати нашої роботи вказують на збільшення рівня АФК, як на основний чинник біологічних ефектів.

Індукція АФК може бути причиною незворотних змін на рівні геному, які виникали при тривалому хронічному опромінюванні клітин дріжджів. Адже, зважаючи на те, що природне магнітне поле Землі також є індуктором синтезу внутрішньоклітинного пероксиду [Martino and Castello, 2011], можна допустити, що за умов штучно сформованого хронічного опромінення клітини потрапляють під постійну чи періодичну дію індуктора внутрішньоклітинного пероксиду і, відповідно, адаптуються до нових умов, що й відображається на зміні в структурі геному.

Окрім того, РЧ-ЕМВ є явним індуктором АВ і за даними літератури, в основі такої здатності лежать механізми, спільні з дією слабого пероксидного стресу [Gareyev *et al.*, 2014]. Хоча процес АВ може запускатися й за дії інших чинників стресу, які виявляють вплив на внутрішньоклітинний тургор і

запускають процеси знешкодження дефектних білків, як наприклад гіперосмотичний стрес [Alonso-Monge *et al.*, 2001] і температурний шок [Dunayevich *et al.*, 2018; Wieser *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 2007], все ж активація АВ відбувається через *Hog1* (однієї з MAP-кіназ НОГ-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 [Levin, 2005]. Тобто, об'єднуючою ланкою між всіма цими процесами може бути саме пул внутрішньоклітинного пероксиду, який за даними наших досліджень зростає за дії РЧ-ЕМВ. Окрім того, під дією РЧ-ЕМВ відбувається посилення транскрипції *Ubc6*, направленої на деградацію дефектних білків, які можуть з'являтися в результаті пероксидного окиснення [Davies, 2016]. Одночасне посилення активності щонайменше цих двох ферментних систем (каталаз і ферментів убіквітинового комплексу) буде сприяти формуванню більшої стійкості клітин до послідувочої дії щонайменше пероксиду ззовні. Окрім того, пероксидний шлях активації НОГ-шляху може бути результатом дії РЧ-ЕМВ, який призводить до змін у структурі КС і, відповідно, до збільшення стійкості опромінених клітин до антибіотиків, металів, тощо.

Хоча процес АВ вважається неспецифічним по відношенню до наступного сильного стресового чинника, однак на нашу думку, ефективність АВ визначається специфічністю репараційних систем, які запускаються в клітинах в результаті переддії слабого стресу. Підтвердженням цьому є здатність НЗВЧ випромінювання, яке має мутагенний потенціал, сприяти збільшенню стійкості опромінених клітин дріжджів до УФ-випромінювання, тоді як ДВЧ-випромінювання, яке не має мутагенного потенціалу, не викликає такого ефекту, і набута стійкість клітин обмежується пероксидним, кислотним і гіперосмотичним стресами.

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, [[$(3-\beta-22E)$ -ергоста-7,22-дієн-3-іл]окси]триметил- і 5-Хі-ергост-7-єн-3- β -(триметилсілокси)-) і рівень експресії *PNO84* (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*-ацетилнейраміною 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/см²) 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 ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ 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. Belousov, 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.І., 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.И., Вринчану Н.О. Ультраструктура *Escherichia coli* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів // Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 26-29. (Автором проведено дослідження ультраструктури 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-tetramethylbutyl) 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.И., Вринчану Н.О. Ультраструктура *Candida albicans* при дії 1-[4-(1-адамантил)-феноксид]-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.И., 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 метакромазії *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. – С. 59-65. (Автором проведено дослідження з вивчення будови клітинної стінки і цитоплазматичної мембрани клітин дріжджів, виконано узагальнення щодо ролі поліфосфатів і представлення результатів для друку).
21. Voychuk S.I., Zelena L.B., Gromozova E.N., Pidgorskiy 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-(п-бензил, п-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. Skrotskiy S., Voychuk S., Khomenko L., Vasyliuk O., Pidgorskiy 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 наночастинок, 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. – Т. 82, № 1. – С. 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. – Т. 82, № 2. – С. 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 *Saccharomcce serevisiae* cells deficient in PPN1 polyphopshatase to dental alloys // *Microbiol. Z.* – 2020. – Т. 82, № 3. – С. 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 нанобіокомполімерів, визначено цитотоксичність нанобіокомполімерів, 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. Єльської, 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.І., Брюзгінова Н.В., Масюк Б.Р., Красов П.С. Разработка тест-систем для изучения влияния

- електромагнітного излучения на биологические объекты // Радиофизика и электроника. – 2008. – Т. 13, № 3. – С. 568–571. (Автором проведено дослідження впливу електромагнітного 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 симпозиуму "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 *Sacchromyces 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 // 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 метакромазии воллотиновых 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.И., 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.И. 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.И. 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 метакромазии воллотиновых 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 космо-физическими 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 медицинско-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 волутиновых 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. Ragulskaaya 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., Gretskey 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.

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – Мікробіологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертацію присвячено вивченню фізико-хімічних, структурних та функціональних особливостей будови 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-складових цих структур факторами фізико-хімічної природи. Виявлено високу (до 99%) скоординованість процесів синтезу білків КС, цукрів КС і ПКМ, жирних кислот і стеролів в мембранах, що дозволяє розглядати ці структури, як єдину систему захисту клітин від широкого спектру чинників стресу. Встановлено окремі компоненти КС, ПКМ і ЦПМ, які формують механічні властивості клітин, сприяють осмотолерантності і стійкості клітин до пероксидного і кислотного стресів, до генотоксичних чинників і антибіотичних сполук. Показано, що ферменти поліфосфатази PPN1 і PPX1 необхідні для формування фенотипової і адаптивної відповіді клітин на дію факторів стресу. Виявлено, що за умови одночасної дії комплексу стресових факторів біологічна відповідь формується на чинник з найбільшим цито- і генотоксичним потенціалом. Встановлено біологічні ланки, чутливі до дії РЧ-ЕМВ метрового, сантиметрового і міліметрового діапазонів. Показано залежність ефектів від частоти, потужності і тривалості опромінювання. Запропоновано механізм дії РЧ-ЕМВ, в основі якого лежить здатність випромінювання сприяти утворенню активних форм кисню.

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

SUMMARY

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" - Manuscript.

The dissertation for a doctoral degree in biological sciences by specialty 03.00.07. – Microbiology. – Institute of Cell Biology of the NAS of Ukraine, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of physicochemical, structural, and functional features of cell envelope structures (cell wall (CW), extracellular matrix (ECM), and cytoplasmic membrane (CM)), 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 CM by physical factors.

Various chemical and physical factors (nanoparticles, antibiotics, genotoxic compounds, radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF)) caused changes of the cell envelope structures of bacterial and yeast cells. The effect depended on the species and yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell envelopes changed in response to the wide range of factors, including RF-EMF of 40,68 MHz (15 W and 30 W), and 1871 MHz (0.1-10 mW/cm²), without lacking cell viability. There was a high correlation (up to 99%) between the levels of expression of some CW-proteins (Flo11 and Cwp1) and the content of sugars in the CW and ECM, and with the content of fatty acids and sterols in membranes. In addition, the content of major sugars (glucose and mannose) of CW and ECM changes in a dependent manner

indicating an existence of a strong link between these two structures. All these indicate that CW, ECM, and CM form a single system of cell protection from a wide range of stressors.

The content of *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine and *N*-neuraminic acid in the CW and ECM influence osmotolerance, mechanical stability, and survival of *S. cerevisiae* cells under the action of peroxide and acidic stresses, genotoxic compounds, and antibiotics. The mechanical properties (stiffness) of yeast cells depend both on the content of CW-proteins and sugars of the CW and ECM. It was found that ergosterol does not play a decisive role in cell resistance to stresses, while the content of two other sterols (silane,[[$(3-\beta-22E)$ -ergosta-7,22-diene-3-yl]oxy]trimethyl-, and 5-Xi-ergost-7-en-3- β -(trimethylsiloxy)-) significantly correlate with the cell viability under various chemical stresses.

S. cerevisiae resistance to stresses is mediated by an activity of polyphosphatases PPN1 and PPX1. Both enzymes participate in the processes of cell response to various stresses, and the PPN1 was shown to be a trigger of the process of adaptive response. The deficiency of cells on the PPN1 and/or PPX1 impact genome stability, gene expression, adhesive properties, and antibiotic resistance of the yeast cells under the action of chemical stresses and RF-EMFs (40.68 MHz, 1871 MHz, and 57-62.5 GHz).

Under the simultaneous action of a complex of stress factors, the biological response form to the action of factor with the highest cyto- and genotoxic potential. The biological action of the RF-EMF of meter wave band (40.68 MHz) causes changes in various parts of the cellular organization but cause no lethal effects. This type of EMF stimulated adaptive response process in yeast cells resulting in an increased resistance of exposed cells to other stresses. RF-EMF of centimeter (1871 MHz) and millimeter (57-62.5 GHz) wave bands has cyto- and genotoxic potential, has mutagenic effect, and decrease cell viability. The mechanism of action of the RF-EMFs based on an ability to increase the content of intracellular reactive oxygen species, which, in turn, lead to disruption of protein function, structure and stability of DNA, change intracellular osmolarity and pH that serves as a signal to activate appropriate repair processes and changes in structure and properties of CW, ECM, and CM, etc. The proposed mechanism of biological action of the RF-EMFs can be applied to regulate the composition of cell wall, extracellular matrix, and cytoplasmic membrane.

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

Підписано до друку 01.04.2021. Формат 60×90/16
Папір офсетний. Друк цифровий. Гарнітура Times New Roman.
Ук. Друк. Арк. 1,85. Наклад 100 прим. Замовлення №

Надруковано у ЦОП «Глобус» ФОП Кравченко Я.О.
02094, м. Київ, вул. Мініна, буд. 12.
Тел. (044) 561-95-31, (067) 506-57-55, (050) 57-06-555