

## Функциональная Активность И УФ-В Толерантность Клеток *Dunaliella*, Модифицированные Синтетическими Антиоксидантами В Условиях Низкотемпературного Стресса

Г.И. Али-заде<sup>1</sup>, А.Р. Джалилова<sup>2</sup>, И.И. Алиев<sup>2</sup>, Х.Х. Магеррамова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биофизики и молекулярной биологии Бакинского государственного университета, ул. З. Халилова, 23, AZ1148, Азербайджан;

<sup>2</sup>Лаборатория биотехнологии Бакинского государственного университета, ул. З. Халилова, 23, AZ1148, Азербайджан

В работе представлены результаты изучения действия различных концентраций синтетических антиоксидантов (СА) ионола и 2,6 ди-трет-бутил фенола на популяцию клеток *Dunaliella* в условиях низкотемпературного стресса. Показано, что модификация клеток (СА) в течение 24 часов в условиях низкотемпературного стресса повышает (малые концентрации СА), а затем снижает сумму синтезированных каротиноидов, а также повышает активность каталазы и снижает процесс ПОЛ. Выявлено, что клетки *Dunaliella*, модифицированные (СА), в условиях низкотемпературного стресса, проявляют повышенную функциональную устойчивость к действию различных острых доз УФ-В излучения.

**Ключевые слова:** *Dunaliella*, низкотемпературный стресс, синтетические антиоксиданты, УФ-В излучение

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что при длительном круглосуточном действии низкой положительной температуры холодоустойчивость растений и клеток возрастает (Али-заде и др., 2014; Дроздов и др., 1984). Реакция растений на действие низкой положительной температуры заключается в различных перестройках метаболических и физиологических процессов, которые должны приводить к адаптации растительного организма к изменившимся условиям. При этом возрастают энергозатраты клетки и эффективность дыхания (Семихатова, 1995). Определенная часть повреждений при низкотемпературном стрессе обусловлена действием образующихся в клетке во время стресса активных форм кислорода (АФК) в результате активации процессов перекисного окисления липидов, вызывающих повреждения мембран. Растительная клетка обладает мощной системой защиты от окислительного стресса, которая развивается в клетках теплолюбивых растений при действии на них низких положительных температур (Климов, 2001; Радюки др., 2009). Низкотемпературный стресс приводит к изменениям количества и активности ферментов защиты, а также неферментативных элементов, такие как каротиноиды, флавоноиды,  $\alpha$ -токоферол, аскорбат и др. (Радюк и др., 2009). Накопление антиоксидантов можно отнести к проявлению общей неспецифической защитной реакции клетки на низкотемпературный стресс (Радюк и др., 2009; Hodges et al., 1996). Окисли-

тельный стресс развивается с сопряженным ингибированием каталазы, в результате чего в тканях накапливается  $H_2O_2$  (Зыкова и др., 2002). Антиоксидантные системы клетки участвуют в нейтрализации АФК, которые являются сильными окислителями и их возможное накопление в клетке очень опасно, поскольку они повреждают структуру мембран, белков и ДНК (Mitteler, 2002). В нормально функционирующей клетке существует динамическое равновесие между образованием АФК и их ликвидацией. В ликвидации  $H_2O_2$  участвуют комплекс ферментов, включающий каталазу, пероксидазу и др. Наряду с различными ответами на действие стрессоров, каротиногенез считается адаптивной реакцией, обеспечивающей выживание микроводорослей в экстремальных условиях среды обитания. Накопление  $\beta$ -каротина у микроводоросли *Dunaliella* (Borowitzka et al., 2007) индуцируется различными стрессами, в частности УФ светом (Али-заде и др., 2014).

Очень мало сведений о действии синтетических антиоксидантов и их антирадикальными свойствами в зеленых микроводорослях (Ali-zadeh et al., 2016). В связи с этим целью нашей работы явилось исследование влияния различных концентраций синтетических антиоксидантов 2,6 ди-трет-бутил крезол (ионол - классический синтетический антиоксидант) и 2,6 ди-трет-бутил фенола на рост, активность эндогенной антиоксидантной системы водоросли *Dunaliella* и их УФ-защитной активности в клетке.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила галофильная зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выделенная из соленого озера Мазазыр, находящегося на северо-западе территории города Баку.

Водоросли выращивали при температуре 27°C в стеклянных фотореакторах (250 мл), на установке для выращивания культур одноклеточных водорослей. Минеральная среда содержала (г/л): NaCl – 87,5 (1,5 М); KNO<sub>3</sub> – 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>–1,25; MgSO<sub>4</sub> –50; FeSO<sub>4</sub>–0,009 раствор микроэлементов (мг/л) – Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> •H<sub>2</sub>O- 735; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> -735; ZnSO<sub>4</sub> •7H<sub>2</sub>O- 615; (NH<sub>4</sub>)MoO<sub>4</sub>- 100; MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O- 180. Суспензию клеток в фотореакторах течение 24 часов освещали белым светом (16 Вт/м<sup>2</sup>) и непрерывно продували смесью (воздух+1,5% CO<sub>2</sub>) с температурой 27°C для контрольных и 5°C для опытных суспензий (низкотемпературный стресс). Источником УФ-В излучения служила ртутная лампа СВД-120. Клетки выращивали в течение 24 часов, в интенсивно-накопительном режиме культивирования и освещали круглосуточно. Рост культуры определяли периодическим подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом или нефелометрическим измерением оптической плотности суспензии на фотоэлектроколориметре.

Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре и рассчитывали на основании коэффициентов Веттштейна (Гавриленко и др., 1975).

Для измерения фотосинтетической активности клеток, выращенные водоросли осаждали центрифугированием 3000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре и переносили на свежеприготовленную минеральную среду. Плотность суспензии клеток доводили до 10<sup>6</sup>кл/мл (оптическая плотность OD=0,8). Скорость выделения кислорода клетками измеряли на полярографической установке, с применением платинового электрода Кларка, освещая суспензию в термостатированном объеме, белым светом насыщающей интенсивности (100 Вт/м<sup>2</sup>).

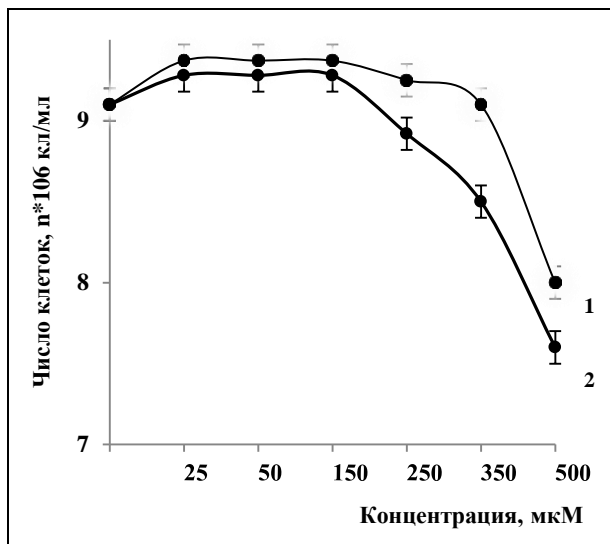
Для измерения каталазной активности клеток, суспензию осаждали центрифугированием (3000 об/мин.). Осадок переносили в ступку с 0,5г СаСО<sub>3</sub>, добавляли 5 мл дистиллированной воды и растирали до однородной массы. После этого полученную массу количественно переносили в стакан емкостью 50 мл до метки и настаивали при периодическом взбалтывании 3-4 часа (4°C). В течение этого времени идет экстрак-

ция фермента из растительного материала. После настаивания суспензию фильтровали в сухой стакан. Активность каталазы измеряли газометрическим методом, который основан на определении объема после прибавления к водному экстракту из растений, содержащему каталазу, перекиси водорода [Плешков Б.П., 1976].

Оценка степени перекисного окисления липидов (ПОЛ) была проведена по методу определения содержания МДА в клетках *Dunaliella salina* - методом, основанным на реакции с тиобарбитуровой кислотой. Суспензию клеток (35 мл) центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Полученный осадок гомогенизировали в 20 мл 0,1%-ой ТХУ. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. К 1мл супернатанта добавляли 4 мл 20% ТХУ, содержащую 0,5% ТБК. Смесью нагревали в водяной бане при 95°C в течение 30 мин. и сразу охлаждали под проточной водой. После центрифугирования смеси при 3000 об/мин в течение 10 минут, определяли оптическую плотность супернатанта при 532 нм и 600 нм. Содержание МДА рассчитывали после вычитания неспецифического поглощения при 600 нм (Heath et al., 1968a).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке 1 представлена зависимость роста популяции клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций 2,6 ди-*трет*-бутил крезола (ионола) (рисунок 1, 1) и 2,6 ди-*трет*-бутил фенола (рисунок 1, 2) в минеральной среде, в условиях низкотемпературного стресса. Как видно из рисунка, присутствие ионола в среде выращивания заметно влияет на рост культуры (Рис. 1, 1). Так, при концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в минеральной среде ионола наблюдается стимуляция роста культуры, которая повышается на 3 %. Увеличение концентрации ионола до 150-250 мкМ в минеральной среде ростостимулирующее действие ионола сохраняется (1-3%), а при 350 мкМ соответствуют контрольным клеткам. Значит, ионол при концентрациях 25-250 мкМ сопоставим с активностью обычных фитогормонов. При повышении содержания ионола в минеральной среде примерно на порядок (500 мкМ) оно приобретает обратный знак, наблюдается подавление (10-12%) роста культуры в течение 24 часового культивирования в интенсивно-накопительном режиме, в условиях низкотемпературного стресса.



**Рисунок 1.** Зависимость динамики роста популяции контрольных клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 от различных концентраций 2,6-трет-бутил крезоло (1) и 2,6-трет-бутил фенола (2) в минеральной среде в условиях низкотемпературного стресса. Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>

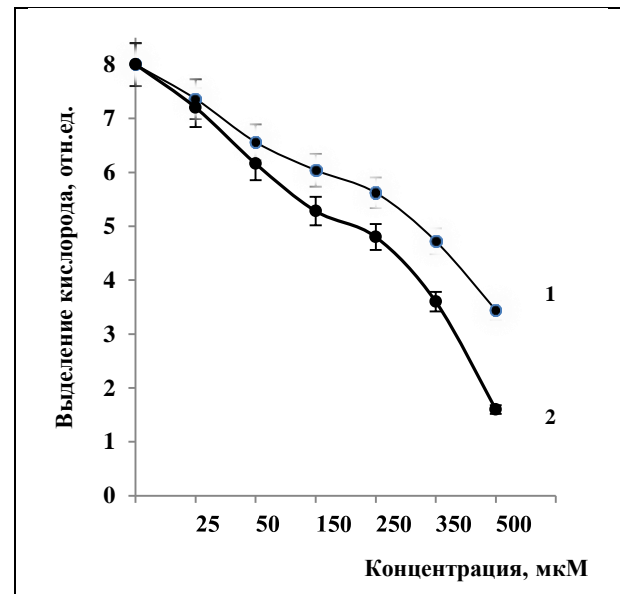
Влияние 2,6 ди-трет-бутил фенола на рост культуры клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294 (Рис. 1,2) в условиях низкотемпературного стресса показало, что модификации клеток с концентрацией 25-125 мкМ приводит к стимуляции роста культуры на 2%. Последующее увеличение концентрации 2,6 ди-трет-бутил фенола в минеральной среде 250 мкМ; 350 мкМ и 500 мкМ в условиях низкотемпературного стресса приводит к подавлению динамики роста на 2%; 7% и 16% соответственно.

Выраженная ростостимулирующая активность при концентрациях в минеральной среде ионола (25-250 мкМ) и 2,6 ди-трет-бутил фенола (25-150 мкМ) делает эти антиоксиданты перспективными и эффективными средствами доступной и надежной регуляции (активации) роста культуры клеток *Dunaliella salina* IPPAS D-294.

Для выяснения функциональной активности *Dunaliella salina* IPPAS D-294 при модификации водорослей в течение 24 часов с различными концентрациями синтетических антиоксидантов ионола и 2,6 ди-трет-бутил фенола в минеральной среде в условиях низкотемпературного стресса показали, что синтетические антиоксиданты ионол и 2,6 ди-трет-бутил фенол в исследованном диапазоне подавляют фотосинтетическое выделение кислорода суспензией клеток.

На рисунке 2 представлены данные фотосинтетического выделения кислорода клетками *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенными при различных концентрациях 2,6 ди-трет-бутил

кресзола (Рис. 2, 1) и 2,6 ди-трет-бутил фенола (Рис. 2, 2) в минеральной среде в условиях низкотемпературного стресса. Как видно из рисунка, фотосинтетическое выделение кислорода клетками *Dunaliella salina* IPPAS D-294, при модификации различными концентрациями ионола (25-500 мкМ) несмотря на ростовую стимуляцию при концентрациях 25-250 мкМ (Рис. 1,1) значительно подавляется уже при концентрации 25 мкМ (8%). Модификация клеток ионолом высокой концентрации 50-150 мкМ подавляет функцию клеток на 18-22%, а при 350-500 мкМ до 41-57%.



**Рисунок 2.** Фотосинтетическое выделение кислорода клетками *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенные при различных концентрациях 2,6-трет-бутил крезоло (1) и 2,6-трет-бутил фенола (2) в минеральной среде в условиях низкотемпературного стресса. Температура 40°C, интенсивность света 100 Вт/м<sup>2</sup>

Результаты фотосинтетического выделения кислорода клетками *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выращенными при различных концентрациях 2,6 ди-трет-бутил фенола в минеральной среде, в условиях низкотемпературного стресса, представлены на (Рис. 2,2). Как видно из рисунка концентрации 2,6 ди-трет-бутил фенола (25-500 мкМ) приводят к подавлению функциональной активности клеток *Dunaliella*. В данном случае наблюдаемое подавление функции 2,6 ди-трет-бутил фенолом значительно отличаются от антиоксиданта ионола, так при концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ подавление функциональной активности клеток более выражено 10% и 23% соответственно. Увеличение концентрации 150 мкМ; 250 мкМ приводит к резкому подавлению 34% и 40%, а при концентрациях 350 и 500 мкМ 55% и 64% фотосинтетического выделения кислорода клетками, что не наблюдается в исследованиях с ионолом.

Таким образом, выявленное нами регулирующее рост и развитие водорослей действие 2,6 ди-*трет*-бутил фенола, который по структуре идентичен ионолу, однако лишен метильной группы оказался также эффективным антиоксидантом, физиологически активным.

Несмотря на то, что растительные клетки, обычно обладают высоким уровнем антиоксидательной активности. И, как правило, содержат большое количество антиоксидантов различной химической природы. Нам хотелось исследовать, в какой степени, использованные синтетические антиоксиданты 2,6 ди-*трет*-бутил крезол (ионол) и 2,6 ди-*трет*-бутил фенол в среде выращивания в течение 24 часов культивирования в условиях низкотемпературного стресса могут повлиять на активность эндогенных низкомолекулярных (каротиноиды) и высокомолекулярных (каталаза) антиоксидантов, а также на процесс перекисного окисления липидов.

В таблице 1 представлены показатели роста, пигментообразования, каталазной активности и количества образованного МДА в клетках *Dunaliella* в контроле и при обработке клеток антиоксидантом 2,6 ди-*трет*-бутил крезолом (ионол) с различными концентрациями в течение 24 часового культивирования в условиях низкотемпературного стресса. Как видно из таблицы, модификация суспензии клеток ионолом при концентрациях 25 мкМ приводит к повышению активности эндогенной каталазы на 80-90%, а при 50-500 мкМ на 2,4-2,5 раза по отношению к контрольным клеткам. Модификация ионолом суспензии клеток приводит к повышению биосинтеза каротиноидов при концентрации 25 мкМ 30%; 50 мкМ 28%, а затем снижению при концентрациях 150 мкМ; 250 мкМ; 350 мкМ; 500 мкМ до контрольного уровня. При этом подавляется синтез хлорофиллов «а» и «б». Проведена также оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в условиях модификации клеток синтетическим антиоксидантом ионолом на стадии развития водоросли в интенсивно-накопительном режиме культивирования в условиях низкотемпературного стресса. Показатели интенсивности процессов перекисного окисления липидов клеток, определяемые по содержанию МДА, при исследованных концентрациях 25 мкМ - 500 мкМ снижались и оставались ниже уровня контроля, а по мере увеличения концентрации синтетического антиоксиданта снижались до минимального уровня 59% при 500 мкМ.

Из данных таблицы видно, что модификация различными концентрациями ионола суспензии клеток *Dunaliella* в течение 24 часов

культивирования в условиях низкотемпературного стресса приводит к изменениям эндогенной антиоксидантной системы, которая сказывается на функциональной активности и биопродуктивности водорослей.

Второй синтетический антиоксидант 2,6 ди-*трет*-бутил фенол также исследовался в диапазоне концентраций 25-500 мкМ в среде выращивания в течение 24 часов культивирования суспензии водорослей в условиях низкотемпературного стресса.

В таблице 2 представлены показатели роста, пигментообразования, каталазной активности и количества образованного МДА в клетках *Dunaliella* в контроле и при обработке клеток антиоксидантом 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом в условиях низкотемпературного стресса. Как видно из таблицы модификация клеток 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом различной концентрации приводит к повышению эндогенной каталазной активности (увеличение активности 30-40%). Надо отметить, что мы наблюдали повышение показателей биосинтеза каротиноидов, в случае с 2,6 ди-*трет*-бутил фенолом при его малых концентрациях 25-50 мкМ. Увеличение концентрации синтетического антиоксиданта 2,6 ди-*трет*-бутил фенола в минеральной среде выращивания в интервале 250-500 мкМ снижали биосинтез каротиноидов на 20%. В этих экспериментах также, как и с первым антиоксидантом ионолом, биосинтез хлорофиллов «а» и «б» подавлялись.

Показатели (ПОЛ), определяемые по содержанию МДА, при малых концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ оставались ниже уровня контроля 95% и 84% соответственно, а по мере увеличения концентрации синтетического антиоксиданта снижались до уровня 39% при 500 мкМ.

Следующей целью в исследованиях было выяснение пределов устойчивости популяции контрольных клеток *Dunaliella*, а также модифицированных синтетическими антиоксидантами 2,6 ди-*трет*-бутил крезола и 2,6 ди-*трет*-бутил фенола с концентрациями 25 и 50 мкМ в условиях низкотемпературного стресса на действие различных острых доз УФ-В излучения.

На рисунке 3 представлены результаты фотосинтетического выделения кислорода облученными различными острыми дозами УФ-В света контрольными клетками *Dunaliella*, и клетками, модифицированными в течение 24 часов при интенсивном культивировании с 25 мкМ и 50 мкМ 2,6 ди-*трет*-бутил крезолом в условиях низкотемпературного стресса.

**Таблица 1.** Показатели роста, пигментообразования, каталазной активности и количества образованного МДА в клетках *Dunaliella* в контроле и при обработке клеток антиоксидантом 2,6 ди-трет-бутил крезолом в условиях низкотемпературного стресса

	Рост, OD		Каталазная активность, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мл <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup> .				Количество пигментов, мг/л			Содержание МДА, моль/г сырого веса
			5	10	15	20	Са	Сб	Скар.	
<b>К</b>	0,3	0,91±0,03	0,3	0,5	0,7	0,8	3,36±0,05	1,85±0,1	1,05±0,05	0,98*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>1</sub></b>	0,3	0,937±0,03	0,5	0,9	1,3	1,5	3,74±0,05	1,87±0,1	1,36±0,05	0,85*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>2</sub></b>	0,3	0,937±0,03	0,65	1,15	1,6	2,0	3,02±0,05	1,8±0,1	1,34±0,05	0,7*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>3</sub></b>	0,3	0,937±0,03	0,65	1,1	1,55	1,9	3,09±0,05	1,56±0,0	0,97±0,05	0,85*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>4</sub></b>	0,3	0,925±0,03	0,65	1,3	1,7	1,9	2,75±0,05	1,3±0,1	1,05±0,05	0,88*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>5</sub></b>	0,3	0,91±0,03	0,6	1,2	1,65	1,9	3,48±0,05	1,26±0,1	1,29±0,05	0,75*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>6</sub></b>	0,3	0,80±0,03	0,35	1,1	1,55	1,9	3,45±0,05	2,01±0,1	1,09±0,05	0,58*10 <sup>-3</sup> ±0,05

**Примечание:** оптическая плотность OD=0,8; Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>; К-контроль; O<sub>1</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил крезолом (25 мкМ); O<sub>2</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил крезолом (50 мкМ); O<sub>3</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил крезолом (150 мкМ); O<sub>4</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил крезолом (250 мкМ); O<sub>5</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил крезолом (350 мкМ); O<sub>6</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил крезолом (500 мкМ);

**Таблица 2.** Показатели роста, пигментообразования, каталазной активности и количества образованного МДА в клетках *Dunaliella* в контроле и при обработке клеток антиоксидантом 2,6 ди-трет-бутил фенолом в условиях низкотемпературного стресса

	Рост, OD		Каталазная активность, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мл <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup> .				Количество пигментов, мг/л			Содержание МДА, моль/г сырого веса
			5	10	15	20	Са	Сб	Скар.	
<b>К</b>	0,3	0,91±0,03	0,3	0,5	0,7	0,8	3,34±0,05	1,63±0,1	0,86±0,05	0,93*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>1</sub></b>	0,3	0,928±0,03	0,6	0,9	1,2	1,4	3,38±0,05	1,42±0,1	1,02±0,05	0,8*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>2</sub></b>	0,3	0,928±0,03	0,6	0,9	1,5	1,7	3,5±0,05	1,99±0,1	1,02±0,05	0,75*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>3</sub></b>	0,3	0,928±0,03	0,65	0,8	1,3	1,5	3,31±0,05	1,87±0,0	0,77±0,05	0,68*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>4</sub></b>	0,3	0,892±0,03	0,55	0,85	1,45	1,7	2,67±0,05	1,23±0,1	0,66±0,05	0,63*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>5</sub></b>	0,3	0,85±0,03	0,65	0,95	1,5	1,6	2,89±0,05	1,65±0,1	0,78±0,05	0,65*10 <sup>-3</sup> ±0,05
<b>O<sub>6</sub></b>	0,3	0,76±0,03	0,45	0,8	1,4	1,6	3,2±0,05	1,7±0,1	0,83±0,05	0,68*10 <sup>-3</sup> ±0,05

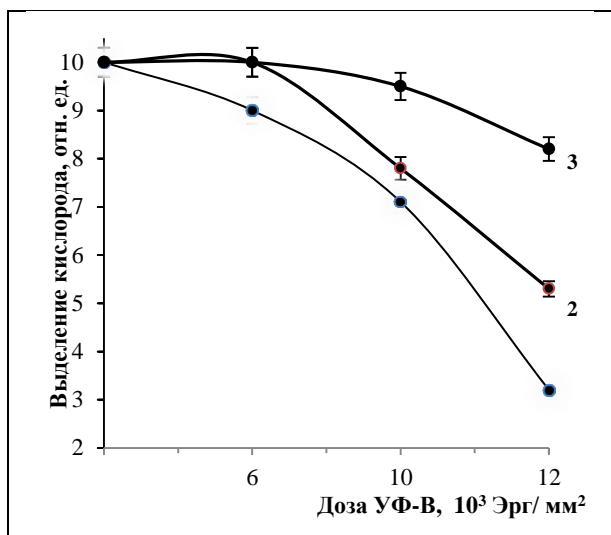
**Примечание:** оптическая плотность OD=0,8; Температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м<sup>2</sup>; К-контроль; O<sub>1</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил фенолом (25 мкМ); O<sub>2</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил фенолом (50 мкМ); O<sub>3</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил фенолом (150 мкМ); O<sub>4</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил фенолом (250 мкМ); O<sub>5</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил фенолом (350 мкМ); O<sub>6</sub>-обработка 2,6 ди-трет-бутил фенолом (500 мкМ);

Как видно из рисунка, у контрольных клеток, облученных острой дозой 6,0·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> функциональная активность подавляется 10%.

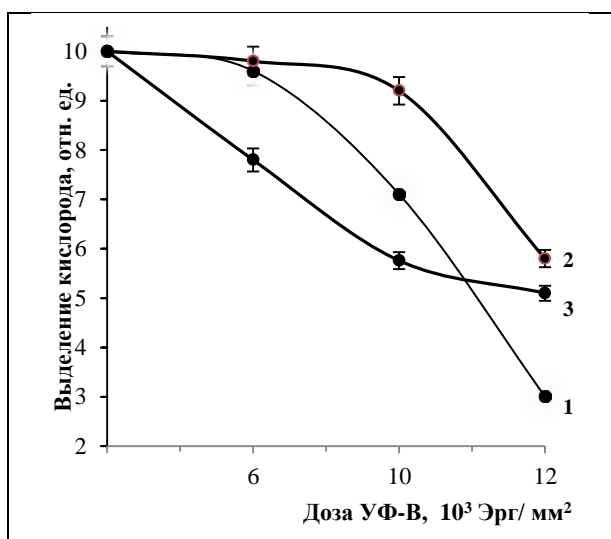
Последующее увеличение острой дозы УФ-В излучения 10·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> приводит к более глубокому подавлению (29%) функции (фотосинтетического выделения кислорода) контрольных клеток (Рис. 3,1). Острые дозы 12·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> существенно увеличило подавление показателей фотосинтетического выделения кислорода (68%) по сравнению с дозой 10·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup>. Клетки, модифицированные 2,6 ди-трет-бутил крезолом с концентрацией 25 мкМ при действии острой дозы УФ-В излучения 6,0·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> проявляют высокую функциональную устойчивость (100%) и эта дозана влияет на функциональную активность модифицированных клеток. Увеличение острой дозы до 10·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> значительно снижают (29%) фотосинтетическое выделение кислорода модифи-

цированными клетками (рисунок 3,2), а острая доза 12·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> подавляет функциональную активность клеток на 68%. Увеличение концентрации (50 мкМ) синтетического антиоксиданта ионола при модификации клеток в течение 24 часов при интенсивном культивировании в условиях низкотемпературного стресса показало, что устойчивость функциональной активности остается на высоком уровне при острых дозах 6,0·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения (100%), а затем характер подавления сохраняется (Рис. 3, 3), и существенно отличается от концентраций 25 мкМ.

Острые дозы 10·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения подавляют функцию клеток до уровня 95%, а доза 12·10<sup>3</sup> Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения всего до 82%. Исследования, проведенные с антиоксидантом 2,6 ди-трет-бутил фенолом показали, что этот синтетический антиоксидант проявляет протекторную роль при действии УФ-В света.



**Рисунок 3.** Фотосинтетическое выделение кислорода контрольными клетками, выращенными в среде с различными концентрациями 2,6-трет-бутил крезола в условиях низкотемпературного стресса, при облучении острыми дозами УФ-В света: 1 - контроль; 2 - 25 мкМ 2,6-трет-бутил крезола; 3 - 50 мкМ 2,6-трет-бутил крезола. Температура 40°C, интенсивность света 100 Вт/м<sup>2</sup>



**Рисунок 4.** Фотосинтетическое выделение кислорода контрольными и клетками, выращенными в среде с различными концентрациями 2,6-трет-бутил фенола в условиях низкотемпературного стресса, при облучении острыми дозами УФ-В света: 1 - контроль; 2 - 25 мкМ 2,6-трет-бутил фенола; 3 - 50 мкМ 2,6-трет-бутил фенола. Температура 40°C, интенсивность света 100 Вт/м<sup>2</sup>

На рисунке 4 представлены результаты фотосинтетического выделения кислорода контрольными и клетками, выращенными в среде с различными концентрациями 2,6-трет-бутил фенола 25 мкМ и 50 мкМ в условиях низкотемпературного стресса, при облучении различными острыми дозами УФ-В света.

Как видно из рисунка, функции контрольных клеток при действии острых доз УФ-В излучения в диапазоне  $6,0 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup>- $12 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> сильно подавляется (рисунок 4,1). Модификация клеток 2,6 ди-трет-бутил фенолом с концентрацией 25 мкМ показала, что этот синтетический антиоксидант проявляет слабую протекторную функцию функциональной активности клеток. При острой дозе  $6,0 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения защита функциональной активности клеток слабое (98%) по сравнению с ионолом, а при дозах  $10 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> и  $12 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> наблюдается некоторая функциональная устойчивость отличающаяся от контрольных клеток (рисунок 4,2) и сохраняется на уровне 98% и 58%. Увеличение концентрации антиоксиданта до 50 мкМ, заметно снижает протекторную функцию 2,6 ди-трет-бутил фенола. Модификация клеток при концентрации 50 мкМ заметно подавляет функциональную устойчивость клеток. Так, при острой дозе  $6,0 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения функциональная активность клеток составляет 96%. Острая доза  $10 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> УФ-В излучения существенно подавляет функциональную активность (71%), при увеличении острой дозы УФ-В излучения до  $12 \cdot 10^3$  Эрг/мм<sup>2</sup> (рисунок 4,3), наблюдается резкое подавление до уровня 30%.

Таким образом, синтетические антиоксиданты 2,6 ди-трет-бутил крезол и 2,6 ди-трет-бутил фенол защищают функциональную активность клеток от острых доз УФ-В излучения неодинаково. Защитная функция 2,6 ди-трет-бутил крезола (ионол - классический синтетический антиоксидант) превышает протекторные функции 2,6 ди-трет-бутил фенола.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что синтетические антиоксиданты 2,6 ди-трет-бутил крезол и 2,6 ди-трет-бутил фенол в минеральной среде стимулируют рост (1-3%) популяции клеток *Dunaliella* по отношению к контролю.
2. Популяции водоросли *Dunaliella*, модифицированные синтетическими антиоксидантами в условиях низкотемпературного стресса, проявляют высокую функциональную устойчивость к различным острым дозам УФ-излучения по отношению к контрольным клеткам.

## ЛИТЕРАТУРА

- Али-заде Г.И., Зейналова Н.М., Алиева И.И., Магеррамова Х.Х. (2014) Адаптивная реакция клеток *Dunaliella* на действие стрессоров разной природы. Известия НАН Азербайджана, **69(1)**:128-133.
- Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. (1975). Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 392 с.
- Дроздов С.Н., Курец В.К., Титов А.А. (1984) Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука, 168 с.
- Зыкова В.В., Колесниченко А.В., Войников В.К. (2002) Участие активных форм кислорода в реакции митохондрий растений на низкотемпературный стресс. *Физиол. Раст.*, **49(2)**: 302-310.
- Климов С.В. (2001) Пути адаптации растений к низким температурам. *Успехи современной биологии*, **121(1)**: 3-22.
- Плешков Б.П. (1976) Практикум по биохимии растений. М., 255с.
- Радюк М.С., Доманская И.Н., Щербакова Р.А., Шальго Н.В. (2009) Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя. *Физиология растений*, **56(2)**: 193-199.
- Семихатова О.А. (1995) Дыхание поддержания и адаптация растений. *Физиол. растений*, **42**: 312-319.
- Ali-zadeh G.I., Magerramova Kh.Kh., Aliev I.I., Jalilova A.R. (2016) The stability of functional activity in *Dunaliella* cells against the acute doses of UV-B irradiation, modified by synthetic antioxidants. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, **4(10)**: 34-38.
- Borowitzka M.A., Siva C.J. (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* with emphasis on the marine and andhalophilic species. *J. Appl. Phycol.*, **19**: 567-590.
- Heath R.L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Of Biochem. Biophys.*, **125**: 189-198.
- Hodges D.M., Andrews Ch.J., Johnson D.A., Hamilton R.J (1996) Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.*, **98**: 685-692.
- Mittler R. (2002) Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends Plant Sci.*, **7**: 405-409.

### Aşağı Temperatur Stresi Şəraitində Becərilmiş Və Sintetik Antioksidləşdiricilərlə Modifikasiya Olunmuş *Dunaliella* Hüceyrələrinin Funksional Fəallığı Və UB-B Toleranlığı

Q.İ. Əli-zadə<sup>1</sup>, A.R. Cəlilova<sup>2</sup>, İ.İ. Əliyev<sup>2</sup>, X.X. Məhərrəmov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bakı Dövlət Universitetinin Biofizika və molekulyar biologiya kafedrası

<sup>2</sup> Bakı Dövlət Universitetinin Biotexnologiya laboratoriyası

İşdə, aşağı temperatur stresi şəraitində becərilmiş, ionol və 2,6-di-*tert*-butil fenolsintetik antioksidləşdiricilərin (SA) müxtəlif qatılıqları ilə modifikasiya olunmuş *Dunaliella* hüceyrələrinin çoxalma göstəriciləri verilmişdir. Göstərilmişdir ki, aşağı temperatur stresi şəraitində 24 saat ərzində SA ilə modifikasiya olunmuş hüceyrələrdə sintez olunan karotinoidlərin miqdarı əvvəl (SA-nın aşağı qatılıqlarında) artır, sonradan azalır, eyni zamanda katalaza aktivliyi artır, LPO prosesi isə ləngiyir. Müəyyən edilmişdir ki, aşağı temperatur stresi şəraitində SA ilə modifikasiya olunmuş *Dunaliella* hüceyrələri UB-B şüalarının müxtəlif kəskin dozalarına qarşı yüksək funksional fəallıq göstərir.

**Açar sözlər:** *Dunaliella*, aşağı temperatur stresi, sintetik antioksidləşdiricilər, UB-B şüalanma

**Functional Stability And UV-B Tolerance Of *Dunaliella* Cells Modified  
By Synthetic Antioxidants Under The Conditions Of Low-Temperature Stress**

**G.I. Alizadeh<sup>1</sup>, A.R. Jalilova<sup>2</sup>, I.I. Aliev<sup>2</sup>, Kh.Kh. Magerramova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Department of Biophysics and Molecular Biology, Baku State University*

<sup>2</sup> *Laboratory of Biotechnology, Baku State University*

The results of the investigations on the effects of various concentrations of synthetic antioxidants (SA) - ionol and 2,6 di-tert-butylphenol on the population of *Dunaliella* cells under the conditions of low-temperature stress have been presented. It was identified that modification of (SA) cells within 24 hours under the conditions of low-temperature stress increased (low concentrations of SA) and then decreased amount of synthesized carotenoids, also increased catalase activity and decreased the POL process. *Dunaliella* cells, modified (SA) under the conditions of low-temperature stress, were found to show higher functional stability against the influence of various acute doses of UV-B radiation.

**Keywords:** *Dunaliella, low-temperature stress, synthetic antioxidants, UV-B irradiation*