

Влияние микотоксина фумонизина В1 на рост и гибель клеток дрожжей *Rhodotorula spp.*

Иванченко О.Б.¹, Мартынова Е.А.²

¹ — Санкт-Петербургский государственный университет низкотемпературных и пищевых технологий (СПбГУНИПТ), 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, д.9

² — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

Работа посвящена изучению влияния микотоксина фумонизина В1 (в концентрациях 10^{-6} — 10^{-3} М) на культуры дрожжей *Rhodotorula spp.* Показано, что фумонизин В1 оказывает дозо-зависимое влияние на выживаемость, удельную скорость роста, число почкующихся клеток дрожжей и апоптоз, при этом эффекты микотоксина находятся в зависимости от физиологического состояния культуры и фазы роста клеток. Одним из механизмов токсического влияния фумонизина В1 на клетки дрожжей может быть накопление в них сфингозина, который оказывает дозо-зависимое токсическое действие на клетки *Rhodotorula spp.* Сфингомиелин менее выражено влияет на рост клеток дрожжей, однако, также обладает токсическим эффектом. Взаимодействие фумонизина и дрожжей *Rhodotorula spp.* может принципиально влиять на микробиоту организма.

Ключевые слова: *Rhodotorula spp.*, фумонизин В1, сфингозин, сфингомиелин, рост клеток, выживаемость клеток, апоптоз

Введение

В последнее время резко возросло число инвазивных микозов, вызванных дрожжами, в том числе рода *Rhodotorula*. Эпидемиологическое значение дрожжей рода *Rhodotorula* определяется их появлением у ослабленных больных, особенно при ВИЧ инфекции и опухолевом росте; они высеваются у больных с нейтропенией и лихорадкой [16]. Описаны случаи микозов после аллогенной трансплантации стволовых клеток [13], при травматических кератитах [15], фолликулитах [10], а также клинические случаи микст-инфекции с участием *Rhodotorula minuta* при костном туберкулезе у иммунологически нормальных пациентов [18]. Фунгемия встречается достаточно редко, в основном у раковых больных, и в половине случаев этиологической причиной является *Rhodotorula spp.*, что повышает риск смертности на 34% [4]. При остром лейкозе в 79% случаев фунгемии обнаруживают *Rhodotorula mucilaginosa* [8]

Низкая патогенность *Rhodotorula spp.* у здоровых людей связана, в частности, со сниженной активностью их роста при +37°C. Диссеминированные микозы, вызванные *Rhodotorula spp.*, связаны, как правило, с наличием иммунодефицитного состояния. В модельной системе у крыс была получена диссеминированная инфекция *Rhodotorula mucilaginosa*, при которой органами — мишенями были легкие, селезенка и особенно печень, в которой грибы формировали гигантские гранулемы, состоящие из многоядерных клеток [20].

Дрожжи семейства *Rhodotorula* широко распространены в природе, их обнаруживают от Арктики до экватора. Человек может заразиться ими от птиц и собак, через молоко коров и коз [6, 12], через рис, фрукты, оливковое масло, морскую рыбу.

В микроокружении человека наиболее часто обнаруживается *Rhodotorula mucilaginosa (R. rubra)*; её основной аллерген — Rho m 2, является этиопатологическим фак-

тором бронхиальной астмы у 28% людей, страдающих этим заболеванием [5].

Семейство дрожжей *Rhodotorula* крайне неоднородно, большинство представителей относится к базидиомицетам (*Basidiomycetes*), но некоторые (*Rhodotorula aurantiaca*) относятся к *Erythrobasidium lineaga of Urediniomycetes*. Базидиомицеты классифицируются согласно ультраструктурной организации мицелиальных перегородок на телиомицеты, гемибазидиомицеты, фрагмобазидиомицеты и голобазидиомицеты. У голобазидиальных грибов (или гомобазидиальных) метабазилия не отделяется первичной перегородкой; они включают около 30 порядков. Фрагмобазидиальные грибы (или гетеробазидиальные) имеют первичную перегородку горизонтальной или крестовидной формы; они включают в себя 5 порядков [2]. У большинства представителей рода *Rhodotorula* в клеточной стенке нет ксиллозы и они имеют спектр простых пор [3].

Rhodotorula mucilaginosa является сидерофором, поэтому первоначальная скорость роста дрожжей в культуре определяется концентрацией железа в среде [7]. *Rhodotorula bogoriensis* продуцирует многочисленные классы липидов, в том числе софоролипиды (углеводно-сочлененные амфифильные биосурфактанты) с длиной алифатической цепи C24:0, C22, C16 и C18, состоящей из моноацетилированных и диацетилированных гидроксидных кислот. Всё семейство *Rhodotorula* способно продуцировать родоторулевую кислоту, пигменты желтого цвета — β-каротин, торулен, торулародин, а также большое количество липидов, что в настоящее время используется в биотехнологии как источник биологически-активных веществ [7, 21]. Гликаны клеточной стенки *Rhodotorula* обладают иммуномодулирующей активностью [1].

Rhodotorula отличаются от дрожжей других видов по размеру, динамике роста, характеру метаболизма клеток. Особенности инвазии *Rhodotorula* в тканях обусловлены экспрессией специфических поверхностных гликопротеинов. *Rhodotorula rubra* и *R. glutinis* секретируют экстраклеточные протеазы, а также экспрессируют рецепторы, свя-

зывающие коллаген I типа, фибронектин, ламинин, лактоферрин, что способствует колонизации патогена в тканях [19]. Рецепторы дрожжей взаимодействуют с эпителиальными клетками кишечника и иммунной системы, что позволяет им колонизироваться в ЖКТ и далее переноситься с током крови и лимфы в органы — мишени. Нейтрофилы осуществляют достаточно эффективный клиренс *Rhodotorula* из крови, что является основным защитным механизмом от этого патогена, и не позволяет им беспрепятственно мигрировать по всему организму [17].

В настоящее время есть очень мало работ, посвященных взаимодействию дрожжей рода *Rhodotorula* с клетками других низших эукариот, высших эукариот, а также микотоксинами, продуцируемыми плесневыми грибами [9]. Вопрос взаимодействия в микробиоте является весьма актуальным, поскольку организм человека и животных постоянно подвергается контаминации токсинами, микотоксинами, различными пробиотиками, а также антибиотиками. Среди микотоксинов, контаминирующих злаковые, большой интерес представляет фумонизин В1, продуцируемый плесневыми грибами рода *Fusarium* (*F.moniliforme*, *F.proliferatum*, *F.anthophilum*, *F.dlamini*, *F.napiforme* и другими родственными видами). Вследствие своей сфинголипидной природы фумонизин В1 очень устойчив к термической обработке (при температуре +125°C в течение 60 мин распадается не более 25% микотоксина), к обработке аммиаком, ферментации, не вымывается при промывке зерна водой, не разлагается при освещении [14].

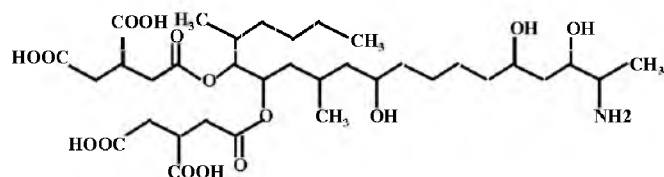
Фумонизин В1 практически не метаболизируется при попадании в организм, его остаточные количества обнаруживаются практически во всех тканях и органах в течение четырех суток [11]. Взаимодействие патогенных дрожжей в желудочно-кишечном тракте с фумонизином В1 может влиять на их колонизацию, рост и миграцию в ткани. Химическая формула фумонизина В1 представлена на рис. 1.

Целью данной работы было изучение особенностей роста и пролиферации дрожжей рода *Rhodotorula spp.* в присутствии микотоксина фумонизина В1.

Материалы и методы

Ход эксперимента

Инокулят клеток дрожжей *Rhodotorula spp.* (из банка клеточных культур НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова), взятых в разные фазы роста периодической культуры — в начале лаг-фазы и в экспоненциальной фазе роста, переносили на питательную среду Сабуро («Биомед» им. Мечникова), в которую одновременно добавляли микотоксин фумонизин В1 (Sigma-Aldrich Co., LLC (UK)) в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-3} моль. Клетки культивировали при температуре (t°) +37°C. Сте-



Фумонизин В1

Рис. 1. Строение молекулы фумонизина В1

пень влияния токсина на рост дрожжей оценивали в начале эксперимента, через 1, 6 и 24 ч. Для этого в указанные временные точки отбирали по 0,5 мл экспериментальной микробной суспензии, окрашивали 1% трипановым синим («ЛабТех») и подсчитывали в камере Горяева в световом микроскопе (увеличение $\times 40$) количество живых, мертвых и почкующихся клеток. Контролем служили необработанные клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

Степень выживаемости клеток в культуре (%) вычисляли по формуле (1):

$$B = \frac{W(O)}{W(K)} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где:

B — степень выживаемости;

$W(O)$ — число колоний в опытах;

$W(K)$ — число колоний в контрольном варианте.

Токсичность препаратов оценивали в зависимости от степени выживаемости (%):

$$T = 100\% - \frac{W(O)}{W(K)} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где:

T — токсичность соединения;

$W(O)$ — число колоний в варианте с исследуемым веществом;

$W(K)$ — число колоний в контрольном варианте.

Кинетика роста культуры

Для выяснения влияния фумонизина В1 на физиологическое состояние популяции дрожжей была определена динамика роста штаммов *Rhodotorula spp.* в периодической культуре. Определение проводили колориметрическим методом по изменению оптической плотности ($D_{\text{опт}}$) микробной суспензии на фотоэлектроколориметре ФЭК-56-ПМ при максимальной длине поглощения светового фильтра 590 нм. По 1 мл 12-часовой культуры клеток вносили в 10 мл питательной среды Сабуро, измеряли начальную оптическую плотность суспензии. Клетки инкубировали при $t^\circ + 37^\circ\text{C}$, в динамике измеряли $D_{\text{опт}}$. По средним данным четырех опытов строили кривые роста культуры.

Удельную скорость роста культуры в экспоненциальную фазу вычисляли по формуле (3):

$$\mu = \frac{2,3 \cdot (\lg x_2 - \lg x_1)}{t}, \text{ ч}^{-1}, \quad (3)$$

где:

μ — удельная скорость роста;

x_2 — количество клеток в опытный момент времени;

x_1 — количество клеток в начальный момент времени;

t — интервал между начальным и опытным моментом времени.

Удельную скорость роста культуры в лаг-фазе вычисляли по формуле (4):

$$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1 - (t_1 - t_0)}, \text{ ч}^{-1}, \quad (4)$$

где:

X_1 — количество клеток в опытный момент времени (t_1);

X_0 — начальное количество клеток;

t_1 — опытный момент времени;

t_0 — начальный момент времени.

Удельная скорость роста и количество живых клеток дрожжей *Rhodotorula spp.* в зависимости от времени

Время, ч	Удельная скорость роста (число клеток/час)	Число живых клеток <i>Rhodotorula spp.</i> ($n \times 10^7 / 1 \text{ мл}$)
0	0	7,51±0,19
1	0,0150±0,0018	7,64±0,23
3	0,0704±0,0022	8,91±0,21
5	0,0851±0,0025	15,56±0,33
7	0,1003±0,0025	20,09±0,28
9	0,0960±0,0019	24,9±0,34
11	0,0860±0,0021	29,57±0,32
13	0,0800±0,0021	37,21±0,38
15	0,0712±0,0020	43,01±0,43
17	0,0591±0,0013	46,41±0,47
19	0,0468±0,0012	52,35±0,44
21	0,0420±0,0011	53,77±0,39
23	0,0340±0,0016	58,58±0,38
25	0,0314±0,0012	66,79±0,52
27	0,0278±0,0014	75,7±0,36
29	0,0224±0,0015	82,6±0,41
31	0,0190±0,0005	86,8±0,65
33	0,0120±0,0007	90,23±0,47
35	0,0110±0,0005	90,29±0,45
37	0,0060±0,0005	91,30±0,59

Время генерации культуры клеток вычисляют по формуле (5):

$$g = 0,693/\mu, \text{ ч.} \quad (5)$$

Исследование токсичности сфинголипидов

Для определения токсичности сфингозина и сфингомиелина (Sigma-Aldrich Co., LLC, UK) клетки дрожжей (12-часовую культуру) вносили в пробирки с 0,6% агариозовой средой Сабуро, куда добавляли 0,1 мл раствора сфингозина в концентрации 10, 100 или 1000 мкг/мл или сфингомиелина в концентрации 1, 5, или 10 мкг/мл. В негативный контроль добавляли 0,1 мл растворителя. Содержимое пробирок перемешивали и наслаивали на твердую питательную среду Сабуро в чашках Петри. Через 24 ч инкубации при $t^\circ +37^\circ\text{C}$ подсчитывали число колоний в опытных и контрольных чашках. Результаты четырех экспериментов представлены как $M \pm m$.

Проточная цитометрия

Клетки дрожжей отмывали, фиксировали 4% параформальдегидом на фосфатном буфере (PBS) (Sigma), окрашивали пропидиумом иодидом (PI) (Sigma) в гипотоническом буфере (PI + цитрат натрия 0,1% + Тритон X-100 (0,01%) на дистиллированной воде ($\text{H}_2\text{O dest}$)), затем клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson Co., Ltd, USA) по программе SimulSet.

Статистика

Все эксперименты проведены, как минимум, в четырех повторах; полученные данные обработаны по программе ANOVA и представлены как $M \pm m$. Сравнение между двумя группами дано по критерию Стьюдента. Анализ малой выборки для нескольких групп проводили методом множественного сравнения по критерию Нью-

мана—Кейлса, $P \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты*Динамика роста контрольной культуры дрожжей Rhodotorula spp.*

При изучении динамики роста культуры *Rhodotorula spp.* было установлено, что при внесении в питательную среду инокулята *Rhodotorula spp.* переход популяции в экспоненциальную фазу роста начинался через 2 ч, которая продолжалась в течение 5 ч (рис. 2).

Данные четырех экспериментов по измерению удельной скорости роста клеток дрожжей *Rhodotorula spp.* (приросту числа клеток в час) представлены в табл. 1. Как видно из приведенных результатов, максимальная удельная скорость роста отмечена через 7 ч после внесения инокулята и остается достаточно высокой в течение еще как минимум четырех часов.

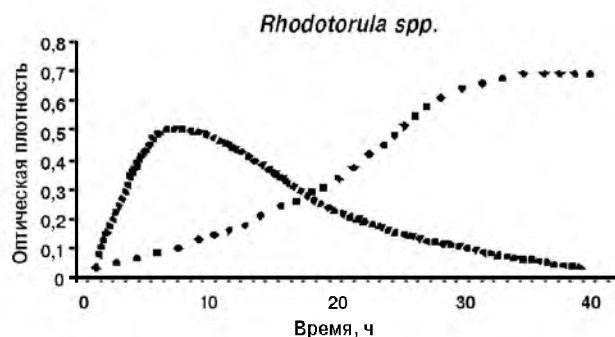


Рис. 2. Кинетика роста периодической культуры *Rhodotorula spp.*

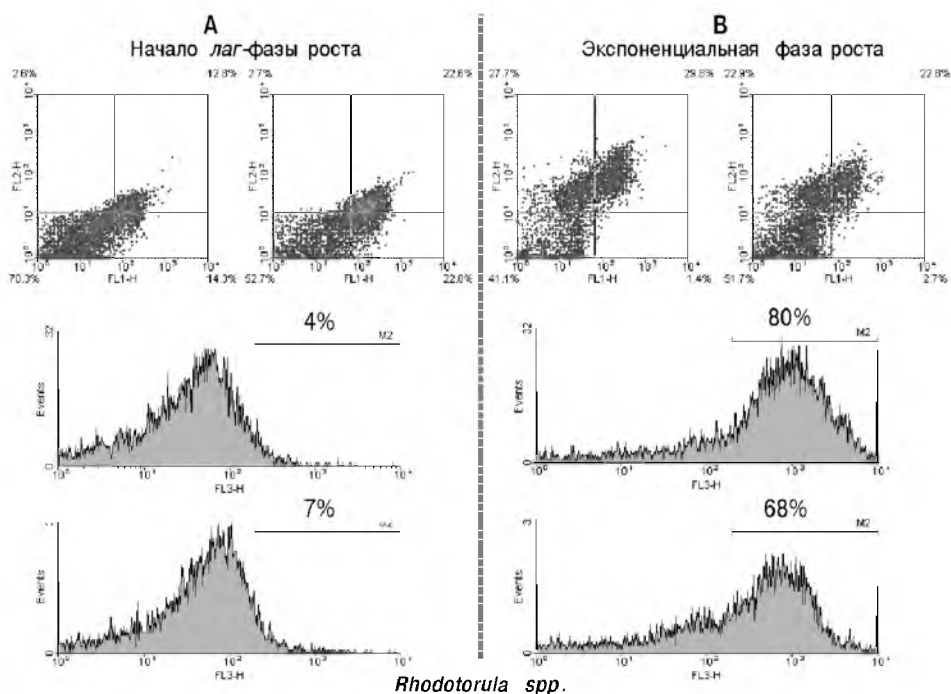


Рис. 3. Размножение дрожжей *Rhodotorula spp.* в разные фазы клеточного цикла (по данным проточной цитометрии)

Изменение клеточного состава дрожжей *Rhodotorula spp.* в различные фазы роста

Рост клеток дрожжей сопровождается экспрессией специфических генов и изменением состава гликопротеинов клеточной стенки. По мере перехода культуры клеток из одной фазы роста в другую появляются дифференцировочные антигены, которые определяют чувствительность клетки к внешним воздействиям.

При анализе культуры *Rhodotorula spp.* на проточном цитометре использовалась окраска клеток пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере, что позволяет красителю проникать в живые клетки дрожжей, где он связывается с ДНК; таким образом, мы имели возможность определять плотность ДНК в клетках. Особенности культуры клеток *Rhodotorula spp.* в зависимости от фазы клеточного цикла по данным проточной цитометрии представлены на рис. 3. Отчетливо различаются изменения в экспоненциальной фазе роста по сравнению с лаг-фазой, на гистограмме появляются пики, соответствующие клеткам различной плотности.

В начале лаг-фазы роста *Rhodotorula spp.* плотность ДНК в клетках минимальная, в среднем, около 7% клеток из всей популяции имеют относительно высокое содержание ДНК, которое увеличивается по мере роста клеток (рис. 3А).

При переходе в экспоненциальную фазу роста картина резко меняется, большинство клеток содержат значительное количество ДНК (рис. 3В). При этом пул клеток перемещается вправо на канале FL2-H, соответствующем красной зоне флюоресценции пропидиума иодида. По мере роста культуры и её перехода в экспоненциальную фазу плотность ДНК в клетках повышается на два порядка. Следует отметить, что дрожжи рода *Rhodotorula* имеют собственную спонтанную флюоресценцию на канале FL1-H, что отражается на смещении вправо пиков на этом канале.

Таким образом, мы показали изменения в уровне ДНК в зависимости от фаз роста культуры дрожжей рода *Rhodotorula spp.* Эти различия служат основой для изучения характера роста культуры под воздействием микотоксина фумонизина В1.

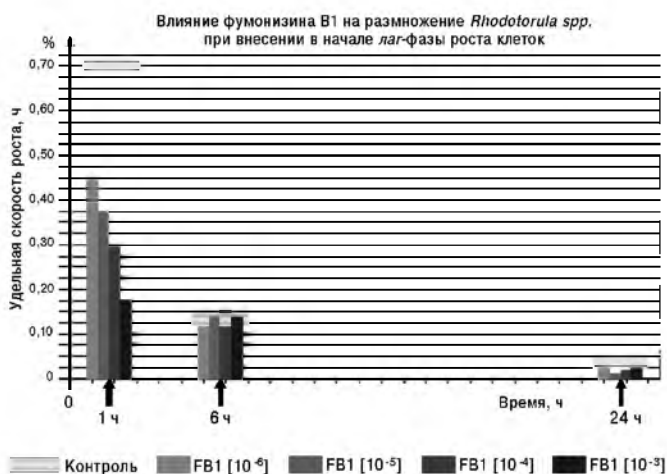


Рис. 4. Влияние фумонизина В1 на удельную скорость роста культуры *Rhodotorula spp.* в начале лаг-фазы роста

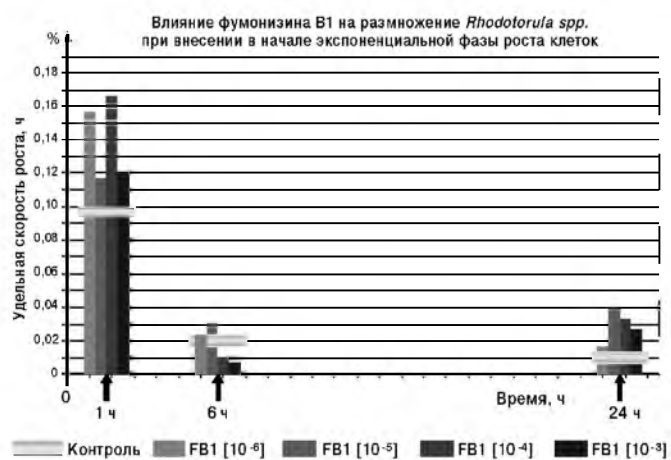


Рис. 5. Влияние фумонизина В1 на удельную скорость роста культуры *Rhodotorula spp.* в экспоненциальной фазе роста

Влияние фумонизина В1, внесенного в начале лаг-фазы роста, на количество почкующихся клеток (n) *Rhodotorula spp.*

[FB1]*	Время инкубации, ч			
	0 ч	1 ч	6 ч	24 ч
	$n \times 10^6$	$n \times 10^6$	$n \times 10^6$	$n \times 10^6$
0	2,5±0,1	12,4±0,3	6,5±0,2	1,4±0,07
10 ⁻³	2,5±0,1	8,0±0,2	7,8±0,3	1,5±0,05
10 ⁻⁴	2,5±0,1	9,2±0,2	5,4±0,3	1,55±0,05
10 ⁻⁵	2,5±0,1	8,3±0,2	6,3±0,3	1,6±0,08
10 ⁻⁶	2,5±0,1	11,2±0,3	7,6±0,3	1,4±0,07

Примечание. * [FB1] — концентрация фумонизина В1; $n \times 10^6$ — количество почкующихся клеток *Rhodotorula spp.*

Влияние фумонизина В1, внесенного в экспоненциальную фазу роста, на количество почкующихся клеток (n) *Rhodotorula spp.*

[FB1]*	Время инкубации, ч			
	0 ч	1 ч	6 ч	24 ч
	$n \times 10^6$	$n \times 10^6$	$n \times 10^6$	$n \times 10^6$
0	7,5±0,1	1,9±0,2	1,1±0,08	0,5±0,04
10 ⁻³	7,5±0,1	1,1±0,09	0,3±0,04	0,5±0,05
10 ⁻⁴	7,5±0,1	1,5±0,2	0,5±0,05	0,5±0,04
10 ⁻⁵	7,5±0,1	1,0±0,09	0,9±0,09	0,5±0,05
10 ⁻⁶	7,5±0,1	1,3±0,2	0,8±0,05	0,3±0,02

Примечание. * [FB1] — концентрация фумонизина В1; $n \times 10^6$ — количество почкующихся клеток *Rhodotorula spp.*

Влияние фумонизина В1 на культуры дрожжей Rhodotorula spp.

Нами показано, что фумонизин В1 регулирует скорость роста клеток *Rhodotorula spp.* в зависимости от фазы роста культуры. При внесении фумонизина В1 в питательную среду с клетками дрожжей *Rhodotorula spp.* в лаг-фазе удельная скорость роста культуры снижается дозо-зависимо. Наибольшая степень ингибирования роста отмечается при концентрации фумонизина 10⁻³ М в течение первого часа инкубации (рис. 4). Через 6 ч роста клетки дрожжей адаптируются и удельная скорость роста культуры *Rhodotorula spp.* в опыте соответствует скорости роста контрольных культур. Эта тенденция сохраняется в течение суток (рис. 4).

При добавлении фумонизина В1 к клеткам *Rhodotorula spp.*, находящимся в экспоненциальной фазе роста, не наблюдается их ингибирования, наоборот, в первый час инкубации культуры в присутствии фумонизина В1 повышается удельная скорость роста клеток по сравнению с контролем. Через 6 ч наступает адаптация дрожжей к микотоксину и скорость их роста соответствует контролю (рис. 5).

Таким образом, обнаружен противоположный эффект фумонизина В1 на рост культуры *Rhodotorula spp.* в зависимости от того, в какой фазе роста произошел первый контакт токсина с клетками. Если токсин вносили вместе с инокулятом в начале лаг-фазы, то рост культуры ингибировался, особенно в первые часы. При внесении фумонизина В1 в экспоненциальную фазу роста отмечено повышение удельной скорости роста культуры клеток *Rhodotorula spp.*

Представленные выше данные согласуются с результатами подсчета количества почкующихся клеток в популя-

ции. Выявлена дозовая зависимость токсического действия фумонизина В1 на число почкующихся клеток дрожжей *Rhodotorula spp.* в течение первого часа после его внесения в лаг-фазу роста (табл. 2). Это сопровождается снижением выживаемости всей культуры (рис. 6). Через 6 ч клетки дрожжей адаптируются, число почкующихся клеток дрожжей восстанавливается, а в некоторых случаях и превышает контроль (для концентраций фумонизина В1 10⁻³ М и 10⁻⁶ М) (табл. 2), что сопровождается повышением выживаемости культуры *Rhodotorula spp.* (рис. 6).

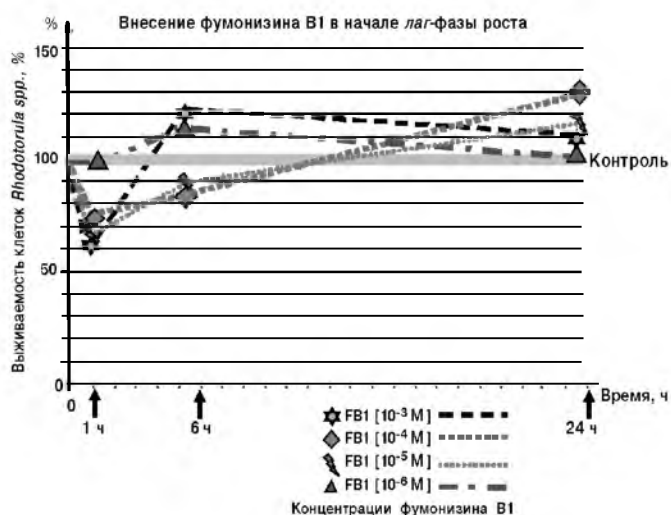
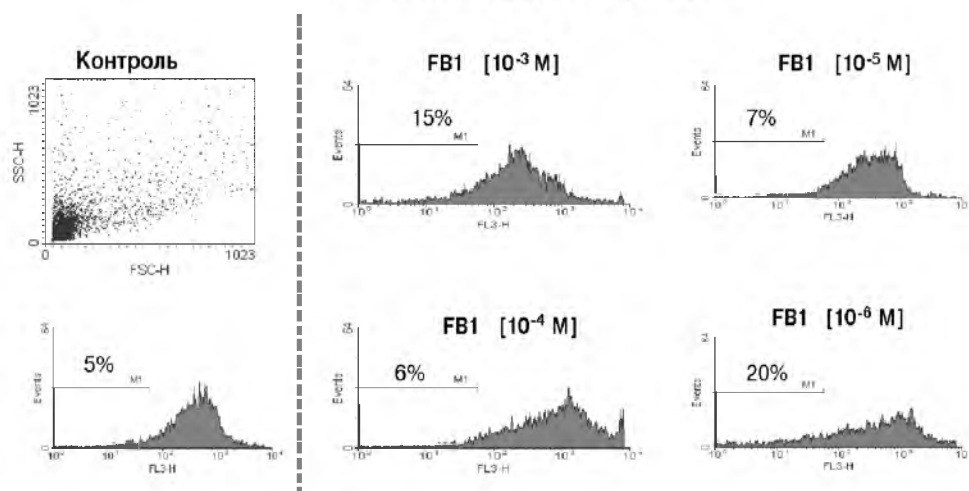


Рис. 6. Влияние фумонизина, внесенного в начале логарифмической фазы роста, на выживаемость культуры клеток *Rhodotorula sp.* (За 100% принята выживаемость культуры клеток без фумонизина В1)

Rhodotorula spp. в лаг-фазе роста



Дрожжи обработаны фумонизином В1 (FB1) в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-3} моль

Рис. 7. Дозо-зависимое влияние фумонизина В1 на клеточный цикл и гибель клеток *Rhodotorula spp.* в начале лаг-фазы роста культуры. (Приведен пример одного исследования на проточном цитометре, процент клеток дрожжей в апоптозе обозначен числами)

Клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*, фиксированные параформальдегидом и окрашенные пропидиумом иодидом, были проанализированы на проточном цитометре для измерения уровня ДНК в клетках при прохождении фаз клеточного цикла. Внесение фумонизина В1 в начале лаг-фазы роста дрожжей *Rhodotorula spp.* оказывает влияние на процент клеток в разных фазах клеточного цикла, а также стимулирует гибель клеток путем апоптоза (рис. 7).

При внесении фумонизина В1 в экспоненциальную фазу роста клеток *Rhodotorula spp.* обнаружено значительное снижение числа почкующихся клеток в течение первых 6 ч (табл. 3), а также снижение выживаемости культуры в течение первых 6 ч (рис. 8). Через 24 ч количество почкующихся клеток в опыте и контроле выравнивается.

По данным проточной цитометрии, внесение фумонизина В1 в экспоненциальную фазу роста дрожжей *Rhodotorula spp.* существенно влияет на процент клеток в разных фазах клеточного цикла, особенно при концентрации фумонизина 10^{-3} М (рис. 9).

Эффекты фумонизина В1 на клетки дрожжей *Rhodotorula spp.* можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, фумонизин В1 является ингибитором церамидсинтазы — ключевого фермента биосинтеза сфинголипидов *de novo*, и вызывает накопление в клетках свободного сфингозина, сфинганина и фитосфингозина. Сфингозин инициирует собственные сигнальные пути и может регулировать сигналы апоптоза. Концентрация сфингоидных оснований в клетках дрожжей зависит от многих параметров, в том числе от фазы роста и температуры окружающей среды. Во-вторых, фумонизин В1 активирует сфингомиелиназу мембраны клеток [11], что вызывает распад сфингомиелина и последующее изменение липидного состава мембраны и, таким образом, регулирует физиологическое состояние клеток в разных фазах клеточного цикла.

Для выяснения возможного механизма действия фумонизина В1, были проведены эксперименты по оценке влияния сфингозина и сфингомиелина на клетки дрожжей.

Механизмы цитотоксичности фумонизина В1

Для выяснения возможности гибели клеток под действием фумонизина В1 вследствие повышения концентрации сфингозина, мы провели эксперименты по оценке токсического действия сфингозина на клетки дрожжей. Результаты исследований представлены на рис. 10А. Полученные экспериментальные данные указывают на закономерность между увеличением концентрации сфингозина и гибелью клеток. Наименьшая выживаемость клеток *Rhodotorula spp.* обнаружена при воздействии на клетки сфингозина в концентрации 1000 мкг/мл.

К возможным механизмам участия сфингозина в индукции гибели клеток можно отнести его способность взаимодействовать с ДНК и влиять на активность ферментов репликации и транскрипции. Повышение внеклеточных свободных сфингоидных оснований нарушает регуляторные механизмы внутри клетки. Комплекс сфинголипидов играет важную роль в стабилизации клеточных

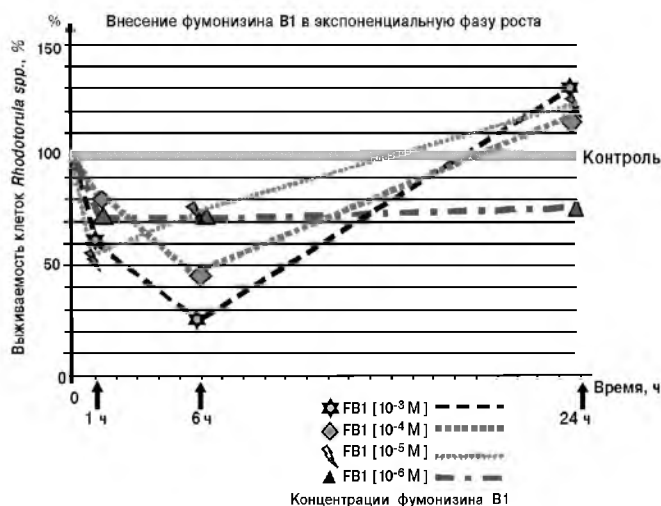
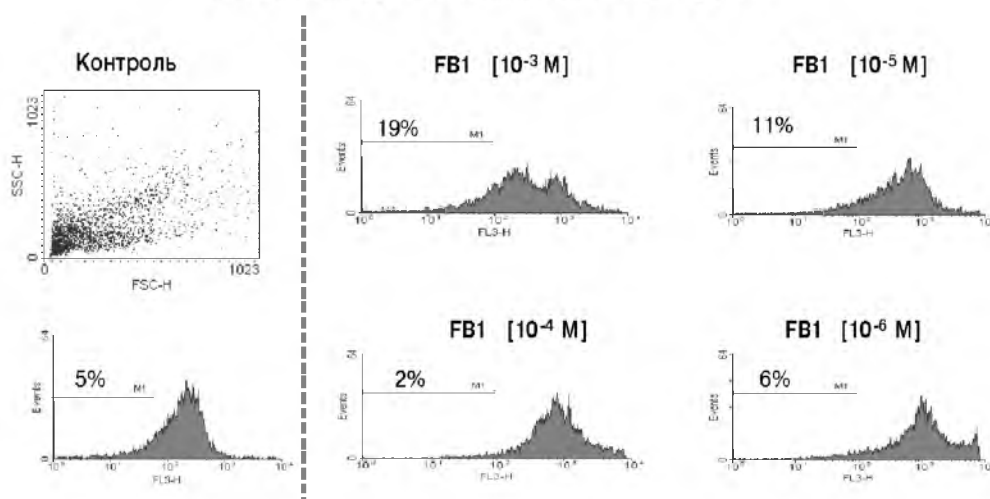


Рис. 8. Влияние фумонизина, внесенного в экспоненциальную фазу роста, на выживаемость культуры клеток *Rhodotorula spp.* (За 100% принята выживаемость культуры клеток без фумонизина В1)

Rhodotorula spp. в экспоненциальной фазе роста



Дрожжи обработаны фумонизином В1 (FB1) в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-3} моль

Рис. 9. Дозозависимое влияние фумонизина В1 на клеточный цикл и гибель клеток *Rhodotorula spp.* в экспоненциальной фазе роста культуры. (Приведен пример одного исследования на проточном цитометре, процент клеток дрожжей в апоптозе обозначен числами)

мембран, участвует в процессах клеточного узнавания, регуляции роста, дифференцировки клеток, рецепции гормонов, токсинов, факторов роста, проявляет иммуномодулирующие свойства.

Одним из механизмов цитотоксического действия сфингозина является его способность ингибировать протеинкиназу С (PKC), которая играет роль вторичного мессенджера сигнальных путей пролиферации и дифференцировки клеток. Сфингозин также ингибирует фосфолипазу А2 (PLA2), Ca^{2+} -зависимую PLA2 и PLD.

Сфингомиелин — это основной липид плазматической мембраны, который вместе с холестерином формирует каркас липидных рафтов; сохранение баланса сфингомиелина важно для клетки. Вторичные мессенджеры, образованные при распаде сфингомиелина, т.е. сфингозин и церамид, передают сигналы апоптоза и потенцируют гибель клетки. Наличие сфингомиелина и сфингомиелинового цикла в ядре клеток создает условия для образования свободного сфингозина и его взаимодействия с темной ДНК.

На рис. 10В представлены данные по влиянию сфингомиелина на рост клеток дрожжей *Rhodotorula spp.* Сфингомиелин в дозе 1 мкг/мл не оказывал статистически значимого влияния на клетки дрожжей. Ингибирующее влияние сфингомиелина на рост клеток дрожжей проявляется с дозы 5 мкг/мл, при которой рост *Rhodotorula spp.* ограничивается на $18 \pm 2\%$ ($p < 0,05$). Добавление в культуральную среду сфингомиелина в дозе 10 мкг/мл привело к ограничению роста клеток дрожжей *Rhodotorula spp.* на $37 \pm 4\%$ ($p < 0,01$).

Таким образом, мы обнаружили дозо-зависимое ингибирующее действие сфингозина и сфингомиелина в отношении дрожжей *Rhodotorula spp.* Накопление сфингозина в клетке после воздействия фумонизина В1 может частично объяснить цитотоксическое действие микотоксина. Активация сфингомиелинового цикла под действием фумонизина В1 (и формирование сфингозинзависимых и церамидзависимых сигнальных путей апоптоза) потенцирует гибель клеток.

Заключение

Приведенные выше результаты впервые позволили установить характер взаимодействия микотоксина фумонизина В1 и низших эукариот *Rhodotorula spp.* Фумонизин В1 оказывает дозо-зависимое влияние на выживаемость, удельную скорость роста и число почкующихся клеток дрожжей рода, при этом эффекты микотоксина находятся в зависимости от физиологического состояния культуры и фазы роста клеток.

Полученные нами результаты имеют принципиальное значение, так как указывают на возможность регулирования процессов жизнедеятельности дрожжей в организме человека или животных при одновременной контаминации микотоксином, что возможно при употреблении в пищу продуктов, зараженных фумонизином В1. Учитывая тот факт, что фумонизин В1 сам вызывает вторичные иммунодефицитные состояния, наличие при этом в организме дрожжей рода *Rhodotorula spp.* может способствовать их росту и метаболической активности.

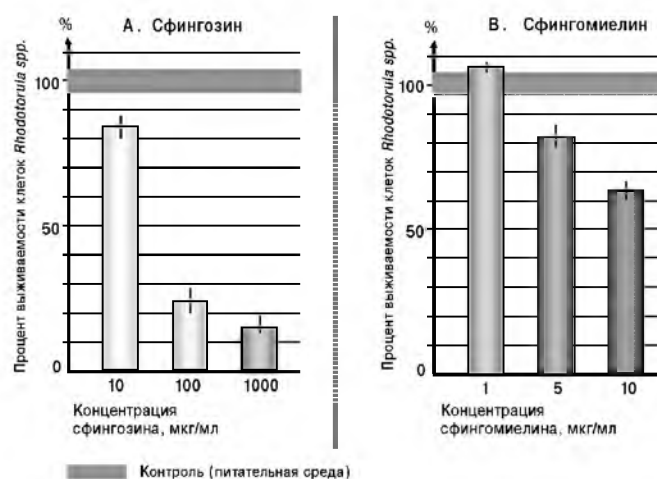


Рис. 10. Влияние сфингозина и сфингомиелина на выживаемость клеток *Rhodotorula spp.*

Список литературы

1. Гурина С.В., Федорова Л.Г. Действие гликанов дрожжей в экспериментальном ЛПС — индуцированном эндотоксикозе // Ж.М.Э.И. — 2000. — №1. — С. 68–71.
2. Елинов Н.П. Краткий микологический словарь. — СПб.: Int. Clinic & Hosp. MEDEM, 2004. — 174 с.
3. Biswas S., Yokoyama K., Nishimura K., Miyaji M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeast inferred from the mitochondrial cytochrome b gene // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — Vol. 51. — P. 1191–1199.
4. Chitasombat M.N., Kofleridis D.P., Jiang Y. et al. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer // J. Infect. — 2012. — Vol. 64, №1. — P. 68–75.
5. Chou H., Tam M.F., Lee S.S. et al. A vacuolar serine protease (*Rho m 2*) is a major allergen of *Rhodotorula mucilaginosa* and belongs to a class of highly conserved pan-fungal allergens // Int. Arch. Allergy. Immunol. — 2005. — Vol. 138, №2. — P. 134–141.
6. Delavenne E., Mounier J., Asmani K. et al. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk // Int. J. Food. Microbiol. — 2011. — Vol. 151, №2. — P. 247–251.
7. Frengova G., Simova E., Beshkova D. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2004. — Vol. 112. — P. 133–141.
8. Garcia-Suarez J., Gomez-Herruz P., Cuadros J.A., Burgaleta C. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients // Mycoses. — 2011. — Vol. 54, №4. — P. 318–324.
9. Gildemacher P., Heijne B., Silvestri M. et al. Interactions between yeasts, fungicides and apple fruit russetting // FEMS. Yeast. Res. — 2006. — Vol. 6, №8. — P. 1149–1156.
10. Jaeger T., Andres C., Ring J., Anliker M.D. *Rhodotorula mucilaginosa* infection in Li-Fraumeni-like syndrome: a new pathogen in folliculitis // Br. J. Dermatol. — 2011. — Vol. 164, №5. — P. 1120–1122.
11. Martinova E.A. Fumonisin B1 immunological effects. The Influence of FB1 on the early stages of immune response // Adv. Exp. Med. Biol. — 1996. — Vol. 391. — P. 331–342.
12. Melville P.A., Benites N.R., Ruz-Peres M., Yokoya E. Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk // J. Dairy. Res. — 2011. — Vol. 78, №4. — P. 385–390.
13. Mori T., Nakamura Y., Kato J. et al. Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // Transpl. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 14, №1. — P. 91–94.
14. Murphy P., Hendrich S., Hopmans E. et al. Effect of processing on fumonisin content of corn // Adv. Exp. Med. Biol. — 1996. — Vol. 392. — P. 323–334.
15. Rajmane V.S., Rajmane S.T., Ghatole M.P. // *Rhodotorula* species infection in traumatic keratitis. A case report // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 71, №4. — P. 428–429.
16. Ramos A., Cabero M., Orden B. et al. Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. Report of two cases // Rev. Esp. Quimioter. — 2012. — Vol. 25, №1. — P. 76–78.
17. Samonis G., Anatoliotaki M., Apostolou H. et al. Transient fungemia due to *Rhodotorula rubra* in a cancer patient: case report and review of the literature // Infection. — 2001. — Vol. 29, №3. — P. 173–176.
18. Thanos L., Mylona S., Kokkinaki A. et al. Multifocal skeletal tuberculosis with *Rhodotorula minuta* co-infection // Scand. J. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 38. — P. 309–311.
19. Vazquez-Juarez R., Ascencio F., Andlid T. et al. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions // Can. J. Microbiol. — 1993. — Vol. 39. — P. 1135–1141.
20. Wirth F., Goldani L.Z. Experimental *Rhodotorula* is infectious in rats // APMIS. — 2012. — Vol. 120, №3. — P. 231–235.
21. Yen H.W., Zhang Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis* // J. Biosci. Bioeng. — 2011. — Vol. 112, №1. — P. 71–74.

Mycotoxin Fumonisin B1 regulates the growth and death of the yeast Rhodotorula spp.

Ivanchenko O.B.¹, Martinova E.A.²

¹ — St.-Petersburg State University of Refrigeration & Food Engineering, 191002, St.-Petersburg, Russian Federation

² — Institute of General pathology & Pathophysiology RAMS, 125315, Moscow, Russian Federation

*Aim of this work was to elucidate an influence of mycotoxin Fumonisin B1 [10^{-6} — 10^{-3} M] on the cultured yeast *Rhodotorula* spp. Fumonisin B1 has been found to regulate the yeast cell surviving, growth, number of budding cells, and apoptosis in the dose-dependent manner. Fumonisin B1 effects were strong dependent on the phase of yeast culture growth. One of the molecular mechanisms of Fumonisin B1 effects is an accumulation of sphingosine into yeast cells. Herein, we have shown that sphingosine inhibited the growth of *Rhodotorula* spp. in the dose-dependent manner. Sphingomyelin also has been found to inhibit yeast culture growth but less strong compared with sphingosine. Interaction between Fumonisin B1 and yeast *Rhodotorula* spp. may modulate the metabolic processes into microbiota.*

Key words: *Rhodotorula* spp., fumonisin B1, sphingosine, sphingomyelin, cell growth, cell surviving, apoptosis