

Ewa ŻYRACKA<sup>1</sup>

## ANTYOKSYDANTY I TOKSYCZNE DZIAŁANIE KADMU NA KOMÓRKI DROŹDŹY *Saccharomyces cerevisiae*

### ANTIOXIDANTS AND TOXIC ACTION OF CADMIUM IN YEAST CELLS *Saccharomyces cerevisiae*

**Abstrakt:** Kadm (Cd) jest jednym z głównych zanieczyszczeń środowiska, co stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Do tej pory opisano różne mechanizmy toksycznego działania kadmu - indukcja stresu oksydacyjnego jest jednym z nich. W obecności kadmu wzrasta w komórkach poziom reaktywnych form tlenu, takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy czy nadtlenek wodoru. Kadm powoduje także obniżenie statusu tiolowego i zaburzenia w komórkowym systemie antyoksydacyjnym. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu jonów kadmu na wzrost i przeżywalność drożdży oraz sprawdzenie, czy dodatek antyoksydantów do pożywki uchroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed toksycznym działaniem kadmu. Zastosowano dwa szczepy drożdży: szczep dziki SP4 i szczep DSCD1-1C ( $\Delta sod1$  mutant) pozbawiony CuZnSOD. Komórki drożdży hodowano na standardowej pożywce YPG, zawierającej dodatkowo jony kadmu i różne stężenia antyoksydantów (m.in. askorbinian, cysteinę, glutation, DTT, N-acetylcysteinę, Tempo, Tempol i Trolox). Stwierdzono niekorzystne działanie kadmu na oba szczepy drożdży - komórki drożdży pozbawione CuZnSOD wykazują znacznie większą nadwrażliwość (10  $\mu\text{M}$  stężenie jonów kadmu powoduje całkowite zahamowanie ich wzrostu); podczas gdy szczep dziki jest wrażliwy przy wyższych stężeniach kadmu (25-50  $\mu\text{M}$ ). Stwierdzono ponadto, że tylko antyoksydanty tiolowe znoszą toksyczne działanie kadmu na komórki drożdży.

**Słowa kluczowe:** antyoksydanty, kadm, stres oksydacyjny, *Saccharomyces cerevisiae*, drożdże

Rozwój cywilizacji nieodzownie oprócz wielu dobrodziejstw niesie ze sobą również zagrożenia, związane głównie ze skażeniem środowiska naturalnego. Spośród substancji mających negatywny wpływ na środowisko coraz większe zainteresowanie budzą metale ciężkie. Ze względu na szerokie zastosowanie metali ciężkich w różnych gałęziach przemysłu są one powszechnymi zanieczyszczeniami ekosystemu i dlatego bardzo ważna jest wiedza o ich właściwościach toksycznych. Istnieje cały szereg różnych metali ciężkich szkodliwych dla środowiska, wśród których szczególne miejsce zajmuje kadm. Ze względu na silne właściwości toksyczne został on umieszczony na liście substancji niebezpiecznych dla środowiska i organizmów żywych [1]. Mimo intensywnie prowadzonych badań mechanizm toksyczności kadmu nie został do końca poznany, a obecny stan wiedzy wskazuje, że toksyczność tego metalu może być wynikiem różnych mechanizmów. Jednym z nich może być zaburzenie w komórkach homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej oraz osłabienie mechanizmów antyoksydacyjnych, czego konsekwencją jest wzrost stężenia reaktywnych form tlenu i indukcja stresu oksydacyjnego [2-4]. Wobec tego faktu celem prezentowanej pracy było zbadanie wpływu jonów kadmu na wzrost i przeżywalność drożdży oraz sprawdzenie, czy dodatek antyoksydantów do pożywki uchroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed toksycznym działaniem kadmu.

<sup>1</sup> Katedra Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów, tel. 17 872 54 13, email: motysia@univ.rzeszow.pl

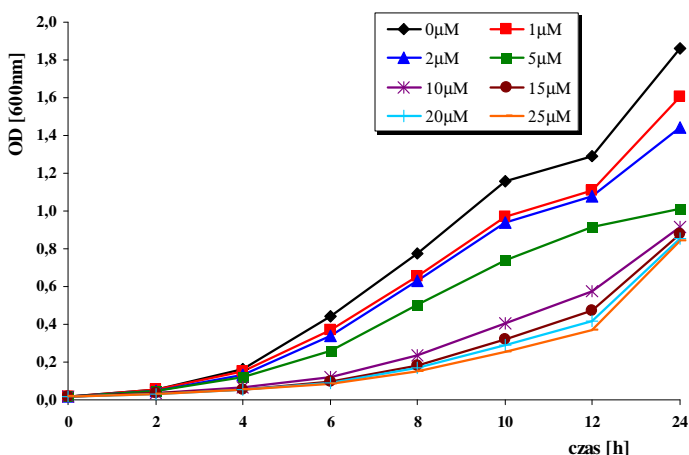
\* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'12, Zakopane, 10-13.10.2012

## Materiały i metody

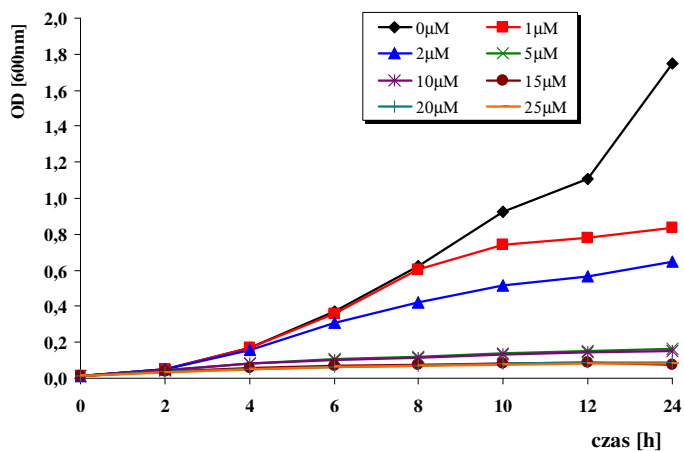
W badaniach wykorzystano dwa szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*: szczep dziki SP4 MAT $\alpha$  *leu1 arg4* i izogeniczny do niego szczep DSCD1-1C MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1* pozbawiony miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej [5, 6]. Badane szczepy drożdży hodowano w standardowych pożywkach YPG (zawierających 1% ekstrakt drożdżowy, 1% pepton, 2% glukozę) w warunkach dobrego napowietrzania w temperaturze 28°C. Po upływie 14 godzin zbierano komórki drożdży w fazie logarytmicznego wzrostu i przenoszono następnie na odpowiednie testowe podłoża YPG, uzupełnione odpowiednią ilością wyjściowego roztworu CdCl<sub>2</sub> i z dodatkiem wybranych antyoksydantów o odpowiednich stężeniach końcowych. Równocześnie prowadzona była też próba kontrolna, którą stanowiły komórki drożdży badanych szczepów hodowane na podłożu YPG bez obecności dodatkowych związków. Po 48-godzinnej inkubacji dokonywano oceny makroskopowej uzyskanego wzrostu (testem kroplowym i metodą CFU (ang. *Colony Forming Unit*), dodatkowo monitorując wzrost komórek turbidymetrycznie (testem kinetycznym poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm).

## Wyniki i ich omówienie

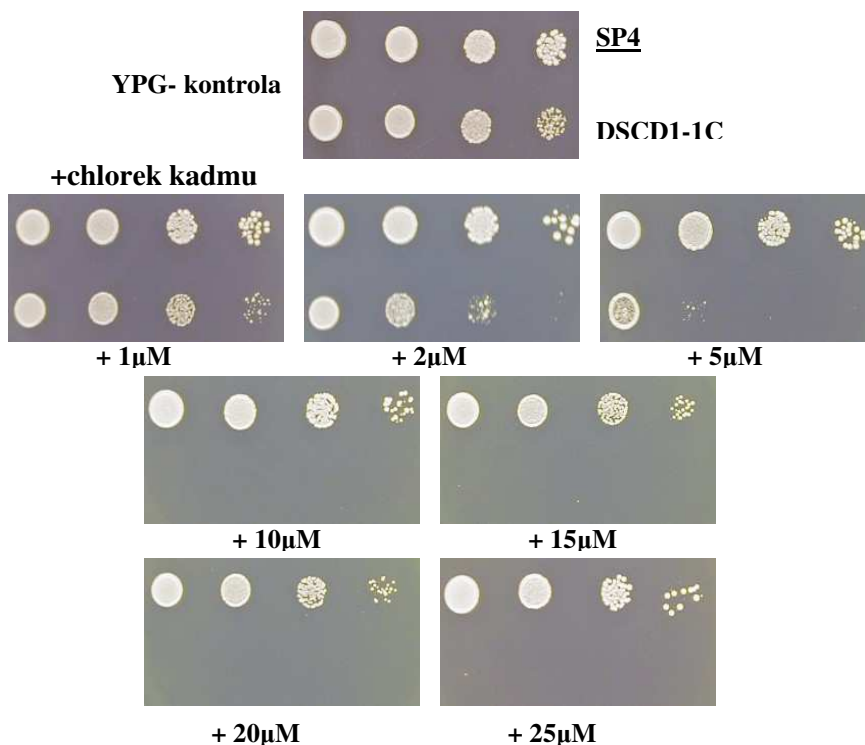
W testowanym układzie doświadczalnym toksyczne działanie jonów kadmu sprawdzano dla szczepu dzikiego SP4 oraz mutantu DSCD1-1C na podłożu stałym i płynnym uzupełnionym odpowiednią ilością wyjściowego roztworu chłorku kadmu (o stężeniu 10 mM), którego stężenie na podłożach testowych wynosiło 1, 2, 5, 10, 15, 20 i 25  $\mu$ M.



Rys. 1. Wpływ CdCl<sub>2</sub> (0-25  $\mu$ M) na wzrost komórek drożdży (szczepu dzikiego SP4) na podłożu płynnym  
Fig. 1. Effect of CdCl<sub>2</sub> (0-25  $\mu$ M) on yeast cell growth (WT strain SP4) on liquid media



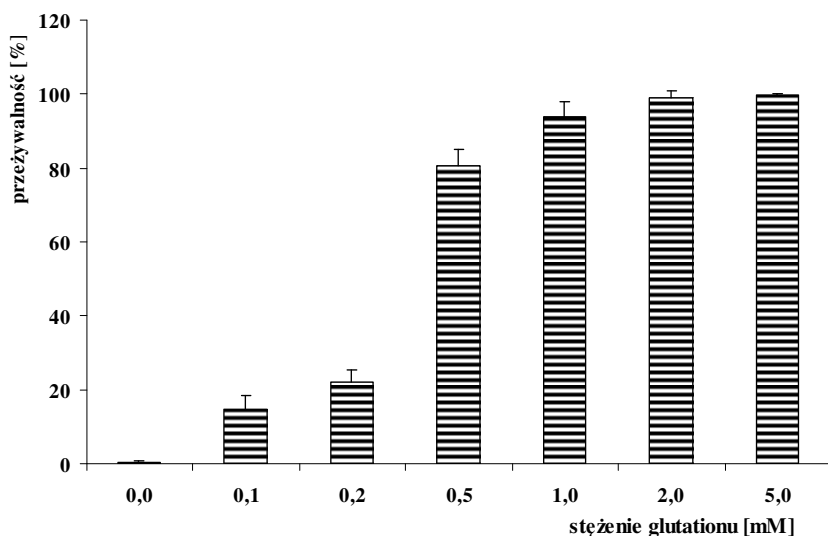
Rys. 2. Wpływ  $\text{CdCl}_2$  (0-25  $\mu\text{M}$ ) na wzrost komórek drożdży (szczepu DSCD1-1C) na podłożu płynnym  
Fig. 2. Effect of  $\text{CdCl}_2$  (0-25  $\mu\text{M}$ ) on yeast cell growth (strain DSCD1-1C) on liquid media



Rys. 3. Wpływ  $\text{CdCl}_2$  (0-25  $\mu\text{M}$ ) na wzrost komórek drożdży (szczepu SP4 i DSCD1-1C) na podłożu stałym  
Fig. 3. Effect of  $\text{CdCl}_2$  (0-25  $\mu\text{M}$ ) on yeast cell growth (strain SP4 and DSCD1-1C) on solid media

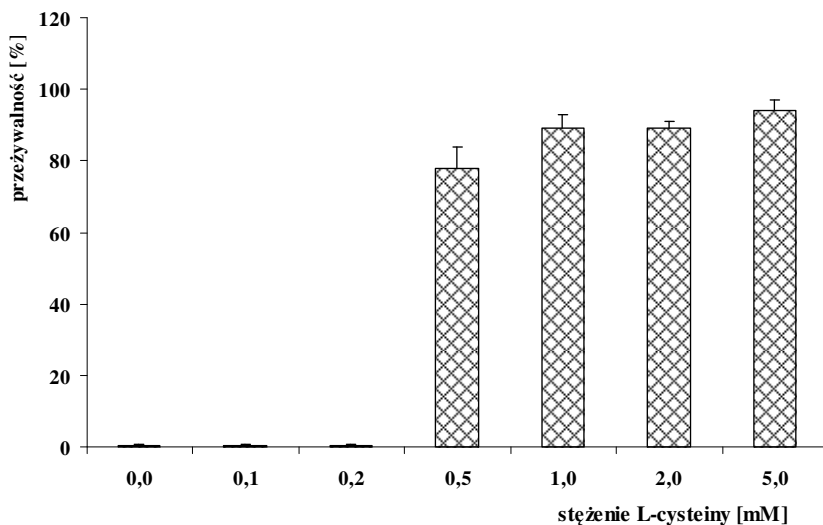
Stwierdzono niekorzystne działanie kadmu na oba badane szczepy drożdży. Zaprezentowane wyniki wskazują, że komórki bezdysmutazowego szczepu DSCD1-1C są bardziej wrażliwe na toksyczne działanie jonów kadmu. Ekspozycja komórek tego szczepu na stężenie 10  $\mu\text{M}$  chlorku kadmu powoduje całkowite zahamowanie wzrostu, podczas gdy szczep dziki okazał się w dużym stopniu odporny na to stężenie. Dopiero przy stężeniu 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  można zauważyć pewne, ale niewielkie jeszcze osłabienie wzrostu komórek tego szczepu (rys. 1-3). Natomiast toksyczne działanie  $\text{CdCl}_2$  wobec szczepu dzikiego udało się ustalić po przeprowadzeniu dodatkowych testów przeżywalności z zastosowaniem dużo wyższych stężeń tego związku. Dla szczepu dzikiego toksyczne okazało się stężenie 50  $\mu\text{M}$  chlorku kadmu, bowiem wtedy to zanotowano całkowity brak wzrostu komórek tego szczepu.

Ze względu na zwiększoną wrażliwość komórek bezdysmutazowego szczepu DSCD1-1C na działanie kadmu w dalszej części tej pracy, wykorzystując ten właśnie szczep drożdży, postanowiono sprawdzić, jaki efekt przyniesie podanie egzogennych związków o charakterze antyoksydacyjnym. Już bowiem wcześniej przeprowadzone badania wykazały, że niekorzystne efekty spowodowane brakiem cytoplazmatycznej  $\text{CuZnSOD}$  w komórkach drożdży mogą być kompensowane przez dodanie do podłoża odpowiednich antyoksydantów [7-9]. W prezentowanej pracy na wybranych układach testowych sprawdzano możliwość przywracania wzrostu i znoszenia toksycznego działania kadmu po zastosowaniu takich powszechnie znanych antyoksydantów, jak: kwas askorbinowy, glutation (GSH), cysteina (CYS), N-acetylocysteina (NAC), ditiotreitrol (DTT), tempo, tempol, trolox, kwas liponowy, kwas moczowy, melatonina i kurkumina.



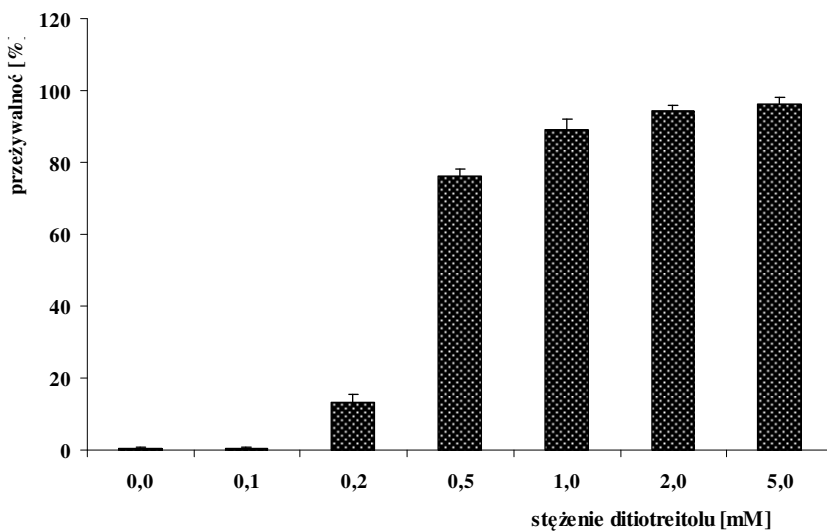
Rys. 4. Wpływ glutationu na przeżywalność [%] komórek drożdży szczepu DSCD1-1C w obecności  $\text{CdCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ )

Fig. 4. Effect of glutathione on survival rate [%] of strain DSCD1-1C yeast cells in the presence of  $\text{CdCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ )



Rys. 5. Wpływ L-cysteiny na przeżywalność [%] komórek drożdży szczepu DSCD1-1C w obecności  $\text{CdCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ )

Fig. 5. Effect of L-cysteine on survival rate [%] of strain DSCD1-1C yeast cells in the presence of  $\text{CdCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ )



Rys. 6. Wpływ ditiotretitolu na przeżywalność [%] komórek drożdży szczepu DSCD1-1C w obecności  $\text{CdCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ )

Fig. 6. Effect of dithiothreitol on survival rate [%] of strain DSCD1-1C yeast cells in the presence of  $\text{CdCl}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ )

Tabela 1

Wpływ różnych antyoksydantów na wzrost komórek drożdży szczepu DSCD1-1C w obecności CdCl<sub>2</sub> (10 μM)

Table 1

Effect of different antioxidants on yeast cell growth (strain DSCD1-1C) in the presence of CdCl<sub>2</sub> (10 μM)

<u>Antyoksydanty</u>	<u>Asod1</u>	<u>Antyoksydanty</u>	<u>Asod1</u>	<u>Antyoksydanty</u>	<u>Asod1</u>
<u>Glutation</u>		<u>L-cysteina</u>		<u>Tempo, Tempol</u>	
0,1 mM	++	0,1 mM	0	0,1 mM	0
0,2 mM	++	0,2 mM	0	0,2 mM	0
0,5 mM	++++	0,5 mM	+++	0,5 mM	0
1,0 mM	++++	1,0 mM	++++	1,0 mM	0
2,0 mM	++++	2,0 mM	++++	2,0 mM	0
5,0 mM	++++	5,0 mM	++++	5,0 mM	0
<u>N-acetylocysteina</u>		<u>Kwas askorbinowy</u>		<u>Kwas liponowy, kwas moczowy</u>	
0,1 mM	+	1 mM	0	0,1 mM	0
0,2 mM	+	2 mM	0	0,2 mM	0
0,5 mM	++	5 mM	0	0,5 mM	0
1,0 mM	+++	10 mM	0	1,0 mM	0
2,0 mM	++++	20 mM	+	2,0 mM	0
5,0 mM	++++	50 mM	++	5,0 mM	0
<u>Ditiotreitol</u>		<u>Trolox</u>		<u>Melatonina, kurkumina</u>	
0,1 mM	0	0,1 mM	0	0,01 mM	0
0,2 mM	++	0,2 mM	0	0,02 mM	0
0,5 mM	++++	0,5 mM	0	0,05 mM	0
1,0 mM	++++	1,0 mM	0	0,1 mM	0
2,0 mM	++++	2,0 mM	0	0,2 mM	0
5,0 mM	++++	5,0 mM	0	0,5 mM	0

Legenda: ++++ całkowite przywrócenie wzrostu, +++ znaczny efekt ochronny, ++ średni efekt ochronny, + niewielki efekt ochronny, 0 - brak wpływu antyoksydantów, -- zahamowanie wzrostu przez antyoksydant

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że tylko antyoksydanty o charakterze tiolowym wywierają pozytywny wpływ na przywrócenie wzrostu mutantu sod1 na podłożu z dodatkiem chlorku kadmu. Zaprezentowane wyniki wyraźnie wskazują na ochronną rolę egzogenego glutationu, który ma zdolności przywracania wzrostu komórkom szczepu DSCD1-1C podczas ich ekspozycji na 10 μM stężenie chlorku kadmu. Poprawę wzrostu komórek tego szczepu można zaobserwować już przy najmniejszych analizowanych stężeniach glutationu, a stężenie 1 mM okazało się być zupełnie wystarczające do całkowitego zniesienia nadwrażliwości szczepu DSCD1-1C na toksyczne działanie kadmu. Dalsze bowiem zwiększanie stężenia glutationu nie wpływało już znacząco na poprawę intensywności wzrostu komórek mutantu pozbawionego aktywnej CuZnSOD (rys. 4). Ochronna rola glutationu wydaje się być tu jak najbardziej uzasadniona, chociażby ze względu na jego udział w mechanizmach detoksykacji metali ciężkich, w tym także kadmu [10, 11]. Podobnie również L-cysteina oraz ditiotreitol wykazują stopniowe, wzrastające ze stężeniem działanie ochronne względem komórek bezdysmutazowego szczepu DSCD1-1C (rys. 5 i 6). Już przy 0,5 mM stężeniach tych antyoksydantów stwierdzono ich pozytywne działanie na poprawę wzrostu komórek badanego szczepu, prowadząc do prawie całkowitego zaniku nadwrażliwości na 10 μM stężenie chlorku kadmu przy 5,0 mM stężeniu. Natomiast efekty ochronne N-acetylocysteiny w sposób

widoczny przejawiają się jedynie przy trzech analizowanych stężeniach (1, 2 i 5 mM), z kolei począwszy od stężenia 10 mM N-acetylocysteiny odnotowano jej negatywny wpływ, prowadzący do całkowitego zahamowania wzrostu mutantu *sod1*. Z przeprowadzonych badań wynika ponadto, że kwas askorbinowy także wywiera pozytywny wpływ na przywrócenie wzrostu mutantu *sod1* na podłożu z dodatkiem jonów kadmu, przy czym intensywność wzrostu komórek tego szczepu jest ściśle uzależniona od stężenia kwasu askorbinowego. Przy niskich stężeniach kwasu askorbinowego obserwujemy całkowity brak działania ochronnego tego antyoksydanta, dopiero w obecności 50 mM kwasu askorbinowego zauważalna jest pewna poprawa wzrostu komórek szczepu DSCD1-1C, jednak nawet przy wysokich jego stężeniach nie uzyskujemy pełnej obrony przed toksycznym działaniem kadmu. W przypadku pozostałych testowanych antyoksydantów w żadnym z badanych układów doświadczalnych nie wykazano ich zdolności do znoszenia niekorzystnych efektów działania jonów kadmu na komórki drożdży szczepu DSCD1-1C (tab. 1).

## Wnioski

1. Chlorek kadmu ( $\text{CdCl}_2$ ) wykazuje działanie toksyczne wobec komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Komórki szczepu DSCD1-1C pozbawionego CuZnSOD odznaczają się znacznie większą wrażliwością na działanie kadmu w porównaniu do izogenicznego szczepu dzikiego SP4.
3. Spośród testowanych antyoksydantów najlepsze właściwości w zakresie obrony antyoksydacyjnej komórek drożdży wystawionych na działanie kadmu wykazują antyoksydanty tiolowe (glutation, L-cysteina i ditiotreitol).

## Podziękowania

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę jako grant wspomagający uczelniane projekty badawcze; Nr projektu DN/GU/BR/8/2011.

## Literatura

- [1] Chmielnicka J, Cherian MG. *Biol Trace Elem Res.* 1986;10:243-262.
- [2] Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20:77-88.
- [3] Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1434-1443. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010.
- [4] Brennan RJ, Schiestl RH. *Mutat Res.* 1996;356:171-178. DOI: 10.1016/0027-107(96)00051-6.
- [5] Biliński T, Łukaszkiwicz J, Śledziwski A. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;83(3):1225-33.
- [6] Biliński T, Krawiec Z, Liczmański A, Litwińska J. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;130(2):533-539.
- [7] Lewińska A, Biliński T, Bartosz G. *Free Radic Res.* 2004;38(11):1159-65. DOI: 10.1080/10715760400009860.
- [8] Żyracka E, Zadrąg R, Koziół S, Krzepińko A, Bartosz G, Biliński T. *J Biotechnol.* 2005;115:271-278. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.09.03.
- [9] Koziół S, Zagulski M, Biliński T, Bartosz G. *Free Radic Res.* 2005;39(4):365-71. DOI: 10.1080/10715760500045855.
- [10] Gharieb MM, Gadd GM. *Biometals.* 2004;17:183-188.
- [11] Delalande O, Desvaux H, Godat E, Valleix A, Junot C, Labarre J, et al. *FEBS J.* 2010;277:5086-5096. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07913.x.

## ANTIOXIDANTS AND TOXIC ACTION OF CADMIUM IN YEAST CELLS *Saccharomyces cerevisiae*

Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Rzeszow

**Abstract:** Cadmium (Cd) is the main environmental pollutant, which presents a serious threat to the health of people and animals. Up to the present time, different mechanisms of the toxic action of cadmium have been described - induction of oxidative stress is one of them. Exposure to cadmium ions can intensify the production of reactive oxygen species (ROS) such as: superoxide radicals, hydroxyl radicals or hydrogen peroxide. Cadmium also causes the decrease in thiol status and the disruption of the cellular antioxidant system. The aim of this study was to determine the effect of  $Cd^{2+}$  on growth and survival rates of yeast cells, and to check whether supplementing media with antioxidants protects *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells from toxic action of cadmium. Two yeast strains were used: wild-type SP4 and strain DSCD1-1C ( $\Delta sod1$  mutant) lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. Yeast cells were grown in standard UPD medium, involving cadmium ions and various concentrations of antioxidants (ascorbate, cysteine, glutathione, dithiothreitol, N-acetylcysteine, Tempo, Tempol and Trolox). The negative effect of cadmium was found in both yeast strains - yeast cells lacking CuZnSOD show much higher sensitivity (cadmium at a concentration of 10  $\mu M$  causes complete inhibition of their growth); at the same time, wild-type strain is sensitive to cadmium at higher concentrations (25-50  $\mu M$ ). Moreover, it was found, that only thiol antioxidants abolish toxic action of cadmium in yeast cells.

**Keywords:** antioxidants, cadmium, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast