

ДРОЖДИТЕ

КАТО МОДЕЛНА СИСТЕМА

ЗА ОЦЕНКА НА ХИМИЧНИ
И ФИЗИЧНИ ВЪЗДЕЙСТВИЯ

Поля Галинова Мариновска - Цолова



2026

**ДРОЖДИТЕ КАТО МОДЕЛНА СИСТЕМА ЗА ОЦЕНКА НА ХИМИЧНИ
И ФИЗИЧНИ ВЪЗДЕЙСТВИЯ**

Поля Галинова Мариновска - Цолова

2026

ДРОЖДИТЕ КАТО МОДЕЛНА СИСТЕМА ЗА ОЦЕНКА НА ХИМИЧНИ И ФИЗИЧНИ ВЪЗДЕЙСТВИЯ

Книга върху дисертационен труд

© Гл. ас. Поля Мариновска – Цолова, д.б.

Първо издание, Плевен, 2026

Рецензенти:

Проф. д-р Росица Вачева – Добревска, д.м.

Доц. д-р Йордан Калчев, д.м.

© Издател: ИЦ “МУ – Плевен”, ул. “св. Климент Охридски” №1

ISBN 978-954-756-375-9 e-book (pdf)

Всички авторски права са запазени! Не се разрешава копиране, възпроизвеждане, както и разпространение на книгата или части от нея по какъвто и да е друг начин, без разрешение на автора.

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Росица Вачева – Добревска, д.м.

Книгата „Дрождите като моделна система за оценка на химични и физични въздействия“ е посветена на една от най-актуалните области в съвременната експериментална биология, микробиология, токсикология и молекулярна медицина – използването на дрождите *Saccharomyces cerevisiae* като универсален модел за изследване на клетъчния отговор към различни химични и физични въздействия. Разработката се отличава с интердисциплинарен характер като интегрира достижения от клетъчната биология, молекулярната генетика, биохимията, фармакологията, токсикологията и биоинформатиката. Нарастващото замърсяване на околната среда с химични агенти, необходимостта от разработване на нови подходи за оценка на риска и стремежът към използване на надеждни алтернативни моделни системи превръщат дрождите в един от най-предпочитаните експериментални обекти в съвременните биологични изследвания. Авторът аргументира убедително необходимостта от използването на *S. cerevisiae* като модел, отчитайки високата степен на консервативност между молекулните механизми при дрождите и висшите еукариоти, добрата генетична охарактеризираност на този организъм и широките възможности за съчетаване на класически експериментални методи с молекулярни и биоинформатични анализи.

Книгата е предназначена за широк кръг от специалисти. Текстът е в обем от 145 страници, написан е стегнато, в научен стил, на разбираем и достъпен език. Съдържанието е структурирано логично и е онагледено богато с таблици, графики и снимки. То е разпределено в следните раздели: I - Дрождите като моделен организъм. II Клетъчен цикъл на дрождите; III - Дрождите във фармакологични изследвания; IV - Влияние на физични параметри върху дрождите; V - Токсично действие на лекарствени препарати; VI – Токсично действие на избрани химични вещества; VII - Оценка на токсикологичното въздействие на избрани химични вещества върху дрождите; VIII - Стресов отговор при дрождите *S. cerevisiae*; IX - Биоинформатични подходи за изучаване състоянието на покой при дрождите *S. cerevisiae*. Въвеждащите раздели представят фундаменталните особености на дрождите като моделни организми.

Специално внимание е отделено на организацията на клетъчния цикъл и значението на състоянието G_0 . Авторът убедително аргументира защо използването на клетки в състояние на покой представлява ценен експериментален модел за изучаване на токсикологичния отговор и механизмите на клетъчна устойчивост. Този аспект е особено актуален предвид натрупаните доказателства за ролята на клетъчния покой при развитието на лекарствената резистентност, стареенето и неопластичните процеси. Значително място в монографията е отделено на въздействието на различни физични фактори върху дрождевите клетки. Особено внимание заслужава разделът, посветен на механизмите на действие на химичните агенти. Разгледани са различни типове въздействия, вкл. генотоксични ефекти, свободнорадикалови процеси, взаимодействия с нуклеиновите киселини и ензимните системи. Подробно са анализирани механизмите на действие на водородния пероксид, менадиона, ибупрофена и зеоцина като класически модели за индуциране на оксидативен и генотоксичен стрес. Едно от най-съществените достойнства на монографията е систематичното представяне на методите за оценка на токсикологичните ефекти върху дрождите. Проследени са класическите показатели за клетъчна преживяемост и цитотоксичност, както и съвременните биохимични маркери за оксидативен стрес. Съвременно звучене на труда придава включването на биоинформатичните подходи. Анализирани са възможностите на системната биология, геномния анализ и специализираните биологични бази данни при изучаване състоянието на покой и стресовия отговор. Представени са основните сигнални пътища, включващи TOR-, PKA-, Snf1- и PKC-зависимите регулаторни механизми, които имат централно значение за клетъчната адаптация. Включването на тези раздели показва стремеж на автора да представи проблематиката в контекста на най-съвременните достижения на молекулярната биология. Особено ценен принос са представените собствени експериментални резултати, които надграждат литературния обзор и придават оригиналност и научно-приложна стойност на книгата.

Авторът разработва функционален профил на стресовия отговор при различни физиологични състояния на клетките на *S. cerevisiae* (пролиферативни, G_0 и стационарни непролиферативни клетки), като интегрира морфологични, метаболитни, геномни и сигнално-регулаторни показатели. Чрез прилагане на съвременни биоинформатични подходи е показано, че гените и протеините

играещи ключова роля за навлизането и излизането от G_0 клетъчен цикъл при дрождите имат съответни хомолози при човека, които в процеса на еволюция са претърпели различна степен на дивергенция. За първи път са разработени моделни сравнителни „Функционални профили на стресов отговор“ при клетки на *S. cerevisiae* BY4741, намиращи се в различна фаза на клетъчния цикъл. Сериозен принос е разработването на успешен методологичен подход за получаване и изолиране на моделни клетки в състояние на покой от щам *S. cerevisiae* BY4741 – тест система за изследване на клетъчни молекулни механизми на токсично действие и функционално профилиране на генетичните изисквания за химическа толерантност. За първи път е показано, че G_0 дрождевите клетки имат значително по-висока устойчивост на действието на зеоцин, което представлява важна научна информация. Намалената метаболитна активност на дрождите в G_0 състояние обуславя по-голямата им стабилност и устойчивост на въздействието на различни токсични агенти. Така те са подходяща моделна система за изследване на токсикологичните механизми на вредни вещества при животните и човека. Видна е връзката със съвременните принципи на експерименталната биология. Показано е как дрождите могат да заместят част от експериментите с животни, което се вписва в концепцията за 3R принципите (Replacement, Reduction, Refinement), дори авторът да не ги споменава изрично.

В обобщение считам, че представената ми за рецензия книга представлява самостоятелен научен труд, в който са съчетани критичен анализ на съвременната научна литература и оригинални експериментални резултати на автора, които разширяват познанията за използването на *S. cerevisiae* като моделна система при изучаване на химични и физични въздействия. Книгата представлява ценен източник на информация за преподаватели, изследователи, докторанти и студенти в областта на биологията, медицината, микробиологията, фармацията, биотехнологиите и екологичната токсикология. Трудът се отличава с високо научно равнище, добра методологична организация и значима теоретична и практическа стойност. Считам, че книгата напълно отговаря на изискванията за научна монография и заслужава да бъде публикувана.

Проф. д-р Росица Стефанова Вачева-Добревска, д.м.
Началник на лаборатория „Микробиология и вирусология“
УМБАЛ „Царица Йоанна - ИСУЛ“, София

РЕЦЕНЗИЯ

от

доц. д-р Йордан Калчев, д.м.

Представената ми за рецензиране книга на тема „Дрождите като моделна система за оценка на химични и физични въздействия“ третира актуална и значима тема, свързана с използването на дрождите *Saccharomyces cerevisiae*. Тези гъбички, притежаващи немалка генетична хомоложност с човека, заемат ключово място в съвременната биомедицинска сфера като надежден еукариотен модел за изучаване на базисни клетъчни процеси и оценка на влиянието на разнообразни външни физични и химични въздействия. Проблематиката има съществено значение както за фундаменталната клетъчна биология, така и за приложни области като токсикологията, фармакологията, молекулярната медицина, екологичната безопасност и съвременните биотехнологии. Използването на *S. cerevisiae* в научните изследвания е по-хуманно в сравнение с използването на животински модели и позволява генериране на редица научни знания с пряко приложение върху човешкото здраве и патология. В контекста на нарастващото въздействие на химичните замърсители върху околната среда и необходимостта от надеждни подходи за оценка на клетъчната токсичност, разработката е съвременна и научно обоснована.

Книгата е написана в научен стил и на достъпен език, като терминологията е използвана коректно. Текстът е онагледен с разнообразни таблици, графики и снимков материал, допринасящи за по-ясното представяне и разбиране на резултатите. В книгата са обособени следните раздели – Въведение; Дрождите като моделен организъм; Клетъчен цикъл на дрождите; Дрождите във фармакологични изследвания; Влияние на физични параметри върху дрождите; Токсично действие на лекарствени препарати; Токсично действие на избрани химични вещества; Оценка на токсикологичното въздействие на избрани химични вещества върху дрождите; Стресов отговор при дрождите *S. cerevisiae*; Биоинформатични подходи за изучаване състоянието на покой при дрождите *S. cerevisiae*; Заключение. Структурата е методично изградена и улеснява възприемането на материала, като отделните раздели логично се допълват и изграждат единна концепция за ролята на *S. cerevisiae* за съвременната наука.

Авторът успешно съчетава обстоен литературен обзор с над 350 научни източници и собствени експериментални резултати, което значително повишава оригиналността на разработката. Изложението е ясно организирано и обхваща широк спектър от теми – характеристика на клетъчния цикъл при дрождите, приложението им във фармакологичните изследвания, влиянието на разнообразни физични фактори върху клетъчната физиология, механизмите на токсично действие на различни химични вещества и съвременните методи за оценка на оксидативния стрес и клетъчните увреждания.

Систематизирано и стегнато са представени физичните фактори като температура, pH, осмотичен и хиперосмотичен стрес, ултравиолетово лъчение, механични и гравитационни въздействия и ултразвук, което дава цялостна представа за адаптивните възможности на дрождевата клетка. Задълбочено са разгледани молекулните механизми на въздействие на избрани вещества като водороден пероксид, менадион, ибупрофен и зеоцин. Проследена е връзката между индуцирания оксидативен и генотоксичен стрес, и измененията в основни биохимични показатели като нивата на реактивните кислородни форми, липидната пероксидация, окислените белтъци и антиоксидантната защита чрез глутатионовата система. Този подход позволява комплексна оценка на клетъчния отговор и демонстрира добро познаване на съвременните токсикологични методи. Получените данни допринасят за по-доброто разбиране на физиологичните различия между клетките в различни функционални състояния и разширяват познанията относно механизмите на химична толерантност при дрождите.

Авторът поставя акцент върху използването на клетки в състояние G_0 като моделна система за оценка на токсичните въздействия, което има потенциално значение и за интерпретиране на сходни процеси при висшите еукариоти. Подчертано е, че ограничената метаболитна активност в това физиологично състояние осигурява по-голяма експериментална стабилност и позволява по-прецизно проследяване на молекулните процеси, свързани със стресовата адаптация.

Особено ценно е включването в книгата на глава относно съвременни биоинформатични подходи. Представени са основните сигнални пътища, участващи в регулацията на клетъчния отговор, както и възможностите на геномния анализ и системната биология за изследване на гените и белтъците,

контролиращи навлизането в състояние на покой и адаптацията към неблагоприятни условия. Това придава на книгата съвременно звучене и разширява нейната научна приложимост.

В заключение, книгата притежава висока теоретична, практическа и методична стойност и включва оригинални експериментални данни на автора. Разработката има потенциал да бъде полезна както за изследователи и преподаватели, така и за докторанти, студенти и за широк кръг от специалисти в областта на биологията, микробиологията, медицината, токсикологията, фармацията и биотехнологиите. Считаю, че трудът заслужава положителна оценка и следва да бъде публикуван.

Доц. д-р Йордан Калчев, д.м.
Катедра по медицинска микробиология и имунология
„проф. д-р Елисей Янев“, МУ-Пловдив
Началник на лаборатория по микробиология,
УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	13
ДРОЖДИТЕ КАТО МОДЕЛЕН ОРГАНИЗЪМ	14
КЛЕТЪЧЕН ЦИКЪЛ ПРИ ДРОЖДИТЕ	15
Фази на клетъчния цикъл	17
G ₀ състояние при дрождите	22
ДРОЖДИТЕ ВЪВ ФАРМАКОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	25
ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИЧНИ ПАРАМЕТРИ ВЪРХУ ДРОЖДИ	28
Влияние на температурата	29
Влияние на рН	33
Влияние на осмотичното налягане	37
Влияние на хиперосмотичен стрес	40
Натриев хлорид	40
Захароза	42
Глицерол	44
Влияние на ултравиолетовите лъчи	46
Влияние на гравитационната сила	49
Влияние на механичната сила	51
Влияние на ултразвука	55
ТОКСИЧНО ДЕЙСТВИЕ НА ЛЕКАРСТВЕНИ ПРЕПАРАТИ	58
Рецептор – зависимо лекарствено действие	59
Рецептор-независимо лекарствено действие	59
Химично-реактивни агенти	60
Физично-активни агенти	60
Генотоксични агенти	60
Агенти, осъществяващи нековалентно свързване	61
Промяна на ензимната активност	61
Свързване с нуклеиновите киселини	61
Свободно-радикални реакции	62
ТОКСИЧНО ДЕЙСТВИЕ НА ИЗБРАНИ ХИМИЧНИ ВЕЩЕСТВА	62
Механизъм на действие на водороден пероксид	62
Механизъм на действие на ибупрофен	63
Механизъм на действие на менадион	65
Механизъм на действие на зеоцин	66
ОЦЕНКА НА ТОКСИКОЛОГИЧНОТО ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА ИЗБРАНИ ХИМИЧНИ ВЕЩЕСТВА ВЪРХУ ДРОЖДИТЕ	68
КЛЕТЪЧНА ПРЕЖИВЯЕМОСТ	69
ЦИТОТОКСИЧНОСТ	72

Водороден пероксид	73
Количество ROS	73
Нива на окислени белтъци	74
Нива на окислени липиди	75
Нива на тотален глутатион	77
Менадион	78
Количество ROS	78
Нива на окислени протеини	79
Нива на окислени липиди	80
Нива на тотален глутатион	81
Ибупрофен	83
Количество ROS	84
Окислени белтъци	85
Окислени липиди	86
Тотален глутатион	87
Зеоцин	88
Количество ROS	88
Окислени белтъци	89
Окислени липиди	90
Количество глутатион	91
СТРЕСОВ ОТГОВОР ПРИ ДРОЖДИТЕ <i>S. CEREVISIAE</i>	94
БИОИНФОРМАТИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ИЗУЧАВАНЕ СЪСТОЯНИЕТО НА ПОКОЙ ПРИ ДРОЖДИТЕ <i>S. CEREVISIAE</i>	98
Биоинформатика и системна биология	98
Проектиране и развитие на биологична база данни	99
Геномен анализ и изследване ролята на гени, отговорни за стресовия отговор и навлизане в G ₀ състояние	100
TOR протеин киназа	101
Протеин киназа А	102
Snf1p протеин киназа	104
Протеин киназа С	105
Вътреклетъчна локализация на белтъци	106
Анализ на генна експресия	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
БИБЛИОГРАФИЯ	114

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АДФ - Аденозин дифосфат
АТФ - Аденозин трифосфат
цАМФ - Циклическ аденозин монофосфат
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина
РНК - Рибонуклеинова киселина
BLM - Bleomycin
CER - Common Environmental Response
CFU/ml - Colony-Forming Units per milliliter
CLS - Chronological Lifespan
COX - Cyclooxygenase
CWI - Cell Wall Integrity pathway
DSBs - Double-Strand Breaks
ESR - Environmental stress response
HOG - Hyper Osmotic Glycerol
HSP - Heat Shock Proteins
GRAS - Generally Recognized As Safe
GSH - Glutathione
GST - Glutathione S-transferase
LiAc - Lithium Acetate
MDA – Malondialdehyde
MIP - Major Intrinsic Proteins
MRP - Multidrug Resistance-associated Proteins
NER - Nucleotide Excision Repa
NSAIDs - Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
OD - Optical Density
PBS - Phosphate-Buffered Saline
PKA - Protein Kinase A
PKC - Protein Kinase C
RLS - Replicative Lifespan
ROS - Reactive Oxygen Species
SGD - Saccharomyces Genome Database
TOR - Target of Rapamycin
UV - Ultraviolet
YPD - Yeast extract Peptone Dextrose

ВЪВЕДЕНИЕ

Натрупването на химически замърсители в околната среда представлява безспорна опасност за човешкото здраве и екосистемите. Във връзка с това, изучаването на клетъчния отговор към стресови химични и физични въздействия е от първостепенно значение в широк кръг области – от здравословната околна среда и фармакологията до биотехнологията като цяло.

С уникалните си генетични характеристики и висока степен на консервативност с висшите еукариотни организми, дрождите *Saccharomyces cerevisiae* са едни от най-разпространените моделни организми за изследване механизмите на химична токсичност и физичен стрес. Използването им при изучаване на клетъчния отговор към различни вредни въздействия е от голямо значение в сектори като здравеопазване и околна среда, а също и в редица биотехнологични производства. Комбинираното прилагане на класически токсикологични изследвания с генетични и биоинформатични анализи предоставя по-задълбочени познания за токсикологичния отговор на молекулно и клетъчно ниво в биологичните системи – информация, която, ако е налична, би улеснила анализите, свързани с оценка на риска.

През последните няколко десетилетия е засилен интересът към дрождите като модел за *in vivo* изследване на цитотоксичния и генотоксичния ефект на редица химични съединения и лекарства. Използването на дрождеви клетки в състояние на активна пролиферация е затруднено от физиологичната комплексност на процесите. Изследването на по-стабилното състояние на покой G₀, където такива метаболитни флуктуации са силно намалени, е предимство. Налице са доказателства, че клетъчният покой блокира процеса на клетъчна диференциация и корелира с устойчивостта към химиотерапевтични противоракови средства и ксенобиотици – характеристики, които са общи за възрастни стволови клетки и вероятно туморни стволови клетки ([Harmes and DiRenzo, 2009](#)). В тази връзка, характеризирането и използването на *S. cerevisiae* G₀ клетки като модел за изучаване на токсикологичния отговор и механизмите на резистентност в еукариотната клетка, е значимо научно постижение.

ДРОЖДИТЕ КАТО МОДЕЛЕН ОРГАНИЗЪМ

Изборът на моделни организми за осъществяване на разнообразни изследвания е от ключово значение в науката ([Altmann et al, 2007](#)). Такива организми се използват поради няколко причини: а) могат да помогнат за преодоляване на етични и експериментални ограничения; б) осигуряват рамка, върху която да се разработят и оптимизират аналитични методи за стандартизиране и по-добро разбиране на биологичните процеси; в) моделните организми се подбират така, че да имат сходни метаболитни особености с други живи обекти, от които учените се интересуват ([Karathia et al, 2011](#)).

Дрождите *S. cerevisiae* са сред най-широко използваните еукариотни моделни организми. Това е първият организъм с изцяло секвениран геном ~12 Mbp, който служи като ценен източник на информация относно нуклеотидната последователност на човешки и други висши еукариотни гени ([Goffeau et al, 1996](#)).

Различни процеси като регулиране на генната експресия ([Biddick and Young, 2009](#)), сигнална трансдукция ([Hohmann et al, 2007](#)), клетъчен цикъл ([Nasheuer et al, 2002](#)), метаболизъм ([Brocard-Masson and Dumas, 2006](#)), апоптоза ([Owsianowski et al, 2008](#)), невродегенеративни заболявания ([Miller-Fleming et al, 2008](#)) и много други са изследвани върху дрождеви клетки.

Интересен е фактът, че около 40% от гените за наследствени заболявания при хората имат хомолози при дрождите ([Oliver, 2002](#)). Това показва, че тези микроорганизми имат потенциал да бъдат използвани с фармацевтични и медицински цели, включително като платформа за биосинтеза на протеини и като тест система за разкриване на биологичната същност на молекулните механизми на различни заболявания ([Hou et al, 2012](#)). Като примери за сложни биологични процеси, изучени в дрожди, могат да се посочат програмираната клетъчна смърт и стареенето ([Carmona-Gutierrez et al, 2010](#)). В допълнение, данните за генома на дрождите служат като ценен ресурс за по-нататъшни изследвания и приложения в биоинформатиката и системната биология.

S. cerevisiae е добре разработена моделна система за изучаване на клетъчното делене и провеждане на експерименти, свързани с по-доброто разбиране на онкологичните заболявания. Дрождите се прилагат и в изследвания, свързани с невродегенеративни заболявания, напр. болестта на Паркинсон. Установено е, че протеинът α -синуклеин е ключов фактор за

заболяването, като дрождите се влияят по подобен начин от натрупването на този протеин, което ги прави идеален модел за изследване пътищата за развитие и скрининг на потенциални лекарствени механизми (Mullan and Marsh, 2019). Наблюдавано е, че ранният транскрипционен отговор към някои токсични вещества включва повишена регулация на набор от гени, които участват в оксидативния стрес и антиоксидантен отговор (Teixeira et al, 2006a). Този процес корелира с повишени нива на хидроксилни радикали и окислени липиди в клетката. Предвид факта, че оксидативният стрес се свързва с неврологични заболявания, заболявания на ставите, стареене и рак, тези резултати могат да служат като доказателство за ефекта на токсични съединения върху човек при продължително или повтарящо се въздействие.

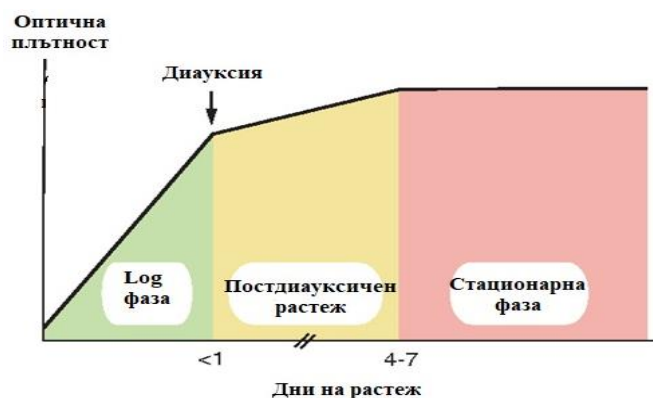
Притежаването на някои важни характеристики от дрождевите микроорганизми позволява тяхното успешно използване както в молекулярните изследвания, така и за индустриални цели:

- ✓ те са добре проучени и лесни за култивиране, употреба и манипулации;
- ✓ съществуват утвърдени молекулярно-биологични подходи за анализ на тези микроорганизми, както и бази данни, генерирани от високопроизводителни технологии. Saccharomyces Genome Database (SGD) е основният ресурс за пъпкуващите дрожди (Cherry et al, 2012), който съдържа пълна информация за дрождевия геном и протеом, както и за други, свързани с тях характеристики;
- ✓ наблюдава се консервативност на дрождевите сигнални и метаболитни пътища с тези на по-висшите еукариоти;
- ✓ показват специфична чувствителност към токсични съединения (Petranovic and Nielsen, 2008).

КЛЕТЪЧЕН ЦИКЪЛ ПРИ ДРОЖДИТЕ

Растежът и пролиферацията на микроорганизми като дрождите *S. cerevisiae* се контролират отчасти от наличието на хранителни вещества. Когато тяхната концентрация в средата силно се понижи, те навлизат в стационарна фаза на растеж, характеризираща се със спиране на клетъчния цикъл и специфични физиологични, биохимични и морфологични промени. Последните включват: удебеляване на клетъчната стена, натрупване на резервни въглехидрати и придобиване на термотолерантност. Наскоро

установена характеристика на мутантни клетки, които са условно дефектни по отношение възобновяване на пролиферацията от стационарна фаза, предоставя доказателство, че стационарната фаза е уникално състояние от развитието на дрождите. Изучавани са и щамове с мутации, засягащи навлизането и оцеляването по време на стационарна фаза. Доказано е, че се засягат най-малко 7 различни клетъчни процеса: 1) сигнална трансдукция, 2) протеинов синтез, 3) протеиново N-терминално ацетилиране, 4) протеинов обмен, 5) протеинова секреция, 6) мембранна биосинтеза и 7) клетъчна полярност. Точният характер на връзката между тези процеси и оцеляването по време на стационарна фаза остава да бъде изяснен (Werner-Washburne et al, 1993).



Фигура 1. Стационарна фаза при дрожди (Herman, 2002)

Подобно на повечето клетки на Земята, които съществуват в състояние на покой, при дрождите навлизането в тази фаза от жизнения цикъл се предизвиква от недостиг на въглерод. Излизането от това състояние настъпва когато източникът на въглерод отново стане наличен (Martinez et al, 2004) (**Фиг. 1**). Счита се, че лимитацията на основни хранителни вещества може да провокира активирането на специализирана диференцираща програма, която да доведе до натрупване на непролифериращи клетки, известни като G_0 или Q, както и до формиране на хетерогенна популация от непролифериращи (NQ) клетки, включваща пролиферативни, апоптозни и стареещи клетки (Palkova et al, 2014).

В природата дивите щамове дрожди *S. cerevisiae* съществуват по-скоро в диплоидно, отколкото в хаплоидно или полиплоидно състояние. За разлика от това, в лабораторни условия те лесно пролиферират като хаплоиди, диплоиди или полиплоиди. Подобно на диплоидните щамове, хаплоидите претърпяват същите диференциращи промени в жизнения си цикъл като напр. превключване

от пъпкуване към хифиален растеж или излизане от G1 клетъчен цикъл и навлизане в състояние на покой. Предимството от използването им е, че могат да бъдат по-лесни за работа, имайки предвид, че делецията само по един алел води до елиминиране на даден генен продукт.

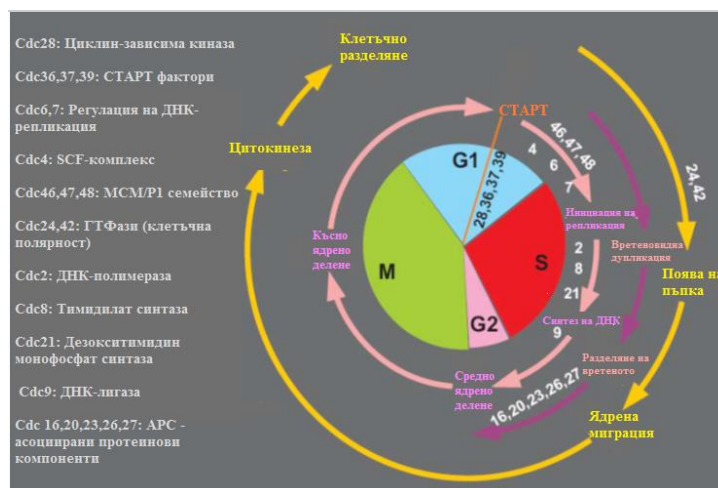
Хаплоидният щам Saccharomyces cerevisiae BY4741 от колекцията на EUROSCARF Frankfurt е обект на множество изследвания. Неговото изучаване предоставя възможност за значимо сравняване на данни от експериментални изследвания с тези, налични в научната литература (Мариновска П, 2023).

Дрождевите клетки в покой, обикновено изследвани в култури от стационарна фаза, проявяват много ниска метаболитна активност, включително ниски скорости на транслация (Fuge et al, 1994) и транскрипция (Choder, 1991). РНК-азите са в изобилие в тези клетки (Gray et al, 2004). Дебелите клетъчни стени възпрепятстват клетъчния лизис, което затруднява изолирането на протеини и естествени протеинови комплекси. Независимо от това, значението на състоянието на покой във всички организми го прави завладяваща област за изследване, тъй като то е специфично регулирано и програмирано (Werner-Washburne et al, 1993).

Фази на клетъчния цикъл

Безполовото размножаване при *S. cerevisiae* се осъществява чрез пъпкуване (Roemer et al, 1996). Това не е случаен процес, а зависи от геометрията на клетката, както и от нейните генетични и физиологични особености. Клетъчният цикъл по своята същност се определя като периода между деленето на майчината клетка, с последващото делене на нейната дъщерна клетка. Представлява строго контролирана поредица от събития. Клетъчният цикъл включва както непрекъснати (клетъчен растеж), така и периодични събития (синтез на ДНК и митоза). Периодичните събития могат да бъдат разделени на четири фази: ДНК синтеза (S фаза); постсинтетична фаза (фаза G2); митоза (фаза M); и пресинтетична фаза (G1 фаза). Във фаза G1 от клетъчния цикъл пред дрождевата клетка има няколко възможности: може да завърши цикъла и да се раздели или да навлезе в състояние на покой (G₀). Разделянето на дрождевата клетка се предшества от нейното нарастване до достигане на критичен размер. Когато обаче се изчерпи глюкозата от средата, дрождевите микроорганизми напускат G1 фазата и преминават в G₀ състояние. В някои

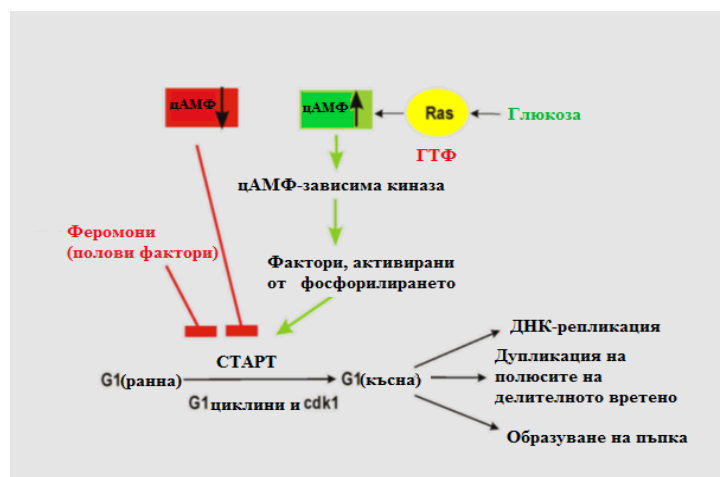
случаи, когато клетката е хаплоидна, след временно задържане във фаза G1 тя може да конюгира с клетка от противоположен полов тип. Диплоидната клетка може да претърпи мейоза, вследствие на която да се формират четири хаплоидни спори. От молекулярна гледна точка тези процеси са неразривно свързани. Правилното и регулирано протичане на процесите от клетъчния цикъл се контролира от система, която е добре изучена при *S. cerevisiae* (Mata and Nurse, 1998). Ключовата регулаторна точка на клетъчния цикъл се нарича START, като там се иницират процеси на синтеза на ДНК в S-фаза и дублиране на полярните телца на делителното вретено. При преминаване на START контролната точка, става репликация на ДНК и клетките прогресират напред в клетъчния цикъл. По този начин START регулира както клетъчния цикъл, така и клетъчния растеж. Недостигът на хранителни вещества, както и сливането на хаплоидни клетки, блокира преминаването на START контролната точка (**Фиг. 2**). Съществуват и допълнителни контролни точки, в които става задържане на клетките по време на клетъчния цикъл, с цел да се избегне увреждане на ДНК или клетъчна смърт. Те са разположени между G1-S и G2-M и се приемат за вътрешни регулатори, които задържат клетъчния цикъл, ако не са изпълнени предпоставките за продължаване на процеса. В тези случаи, след преминаване на зависимата от клетъчния размер контролна точка START, количеството на циклините (Cln, Clb) се увеличава драстично.



Фигура 2. Клетъчен цикъл при *S. cerevisiae* (Feldmann and Butenandt, 2005)

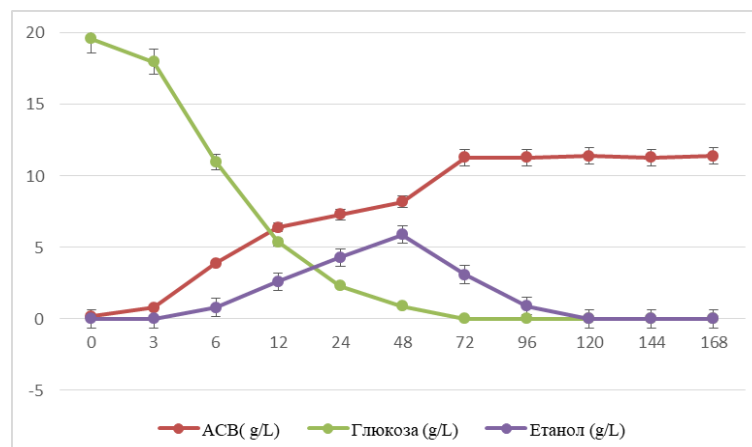
Известни са повече от 11 вида циклини в дрожди, които участват в контрола на G1 (G1 циклини), G2 (В циклини) и ДНК синтезата (S-циклини). Редуването на фазите на клетъчния цикъл се дължи на механизми, водещи до йерархична регулация на различните семейства от циклини, като тяхното ниво в клетката се контролира чрез синтеза и програмирана протеолиза.

Правилното протичане на клетъчния цикъл се контролира и от наличните хранителни вещества. Концентрацията им (напр., на глюкоза или азотни съединения) регулира вътреклетъчното ниво на цикличен аденозин монофосфат (цАМФ) чрез малък G протеин, Ras (**Фиг. 3**). Повишените нива на цАМФ водят до активиране на цАМФ-зависима протеин киназа А (РКА), която се фосфорилира и задейства специфични транскрипционни фактори, които активират G1 фазата. Когато концентрацията на цАМФ е ниска, G1 фазата на клетъчния цикъл спира и дрождите навлизат в G₀ състояние ([Mathiesen et al, 2013](#)).



Фигура 3. G1 регулация при дрожди ([Feldmann and Butenandt, 2005](#))

Вегетативното размножаване е основният начин за размножаване при дрождите. Когато концентрацията на хранителни вещества в средата е ниска, се осъществява и полов процес. Той се състои в сливане на хаплоидни клетки от противоположен полов тип, които секретират различни феромони - α и β ([Shimoda, 2004](#)). Формира се хетерокарион с диплоиден хромозомен набор, който може да се размножава чрез пъпкуване.

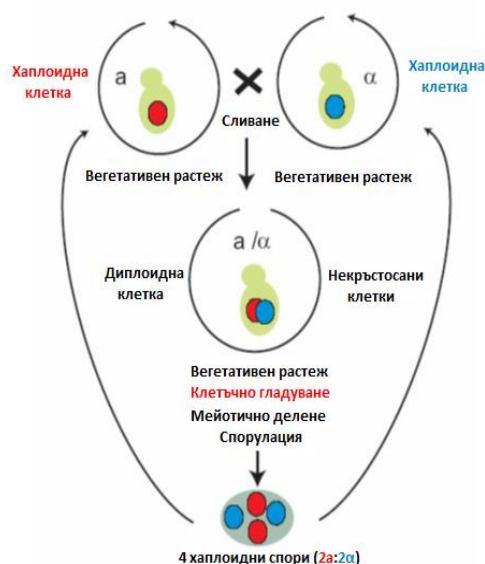


Фигура 4. Динамика на растеж и усвояване на въглероден източник при култивиране на *S. cerevisiae* BY4741

Растежът на дрожди в стационарна фаза на растеж е проследен чрез култивиране в YPD за 168 часа на *S. cerevisiae* BY4741 (Мариновска П, 2023). Така клетките са подложени на „гладуване“ поради пълното изчерпване на въглероден източник в средата. В процеса на култивиране е осъществен аналитичен контрол чрез проследяване концентрациите на основни въглеродни източници (Фиг. 4). Наблюдава се усилено метаболизиране на глюкозата в експоненциална фаза на растеж – между 3-ти и 24-ти час. Удължената експоненциална фаза вероятно се дължи на мутантния фенотип на изследвания щам и неговата ауксотрофност по отношение на редица растежни фактори. Между 24-ти и 48-ми час, след изчерпване на глюкозата в средата, културата навлиза в диауксична фаза, характеризираща се със забавен растеж (Мариновска П, 2023).

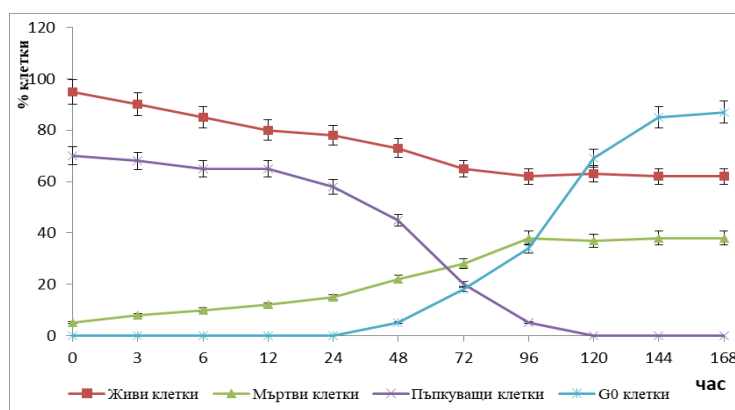
Установено е, че етанолът и други неферментативни въглеродни източници напълно се изчерпват между 96-я - 120-я час. Културите са подложени на „гладуване“, вследствие на което броят на пролифериращите клетки силно намалява и те навлизат в стационарна фаза или т.нар. „състояние на покой“ (Gray et al, 2004). При клетките в стационарна фаза се наблюдава спиране на клетъчния цикъл и възникване на физиологични, биохимични и морфологични промени, които от своя страна са свързани с акумулиране на резервни карбохидрати и придобиване на термоустойчивост (Werner-Washburne et al, 1993).

При гладуване диплоидните клетки започват да се делят мейотично, при което спорулират, като накрая се образуват 4 хаплоидни спори в съотношение $2a:2\alpha$. Този процес се активира при лимитация на азот, и се регулира от MAP-специфичен киназен сигнален път. При благоприятни условия спорите прорастват и продължават да се делят митотично (**Фиг. 5**).



Фигура 5. Жизнен цикъл при дрожди (Feldmann and Butenandt, 2005)

Изследване на Мариновска П, 2023 върху клетъчната диференциация и стареене при хаплоидния щам *S. cerevisiae* BY4741 установи, че между 3-та и 24-та час процентът на живите клетки се запазва висок (~ 80 %), а след 24-я час се понижава (**Фиг. 6**). След 48-я час се наблюдава леко увеличаване на мъртвите клетки и значително повишаване на клетките в G_0 . Концентрацията на последните се увеличава експоненциално след навлизане в същинска стационарна фаза (120-я час). След пълното изчерпване на въглеродния източник (между 48-я и 120-я час) стартира диференцираща програма, която дава популация от клетки в латентно непролиферативно състояние - G_0 , както и няколко популации от клетки в нелатентно състояние.



Фигура 4. Клетъчна диференциация и апоптоза при *S. cerevisiae* BY4741

Клетъчното стареене се свързва със засилено понижаване на клетъчната и организмовата функция. То е основен рисков фактор за податливостта към заболявания при човека. Наблюдава се голямо съответствие между клетъчните пътища, които влияят на стареенето и тези, свързани с рак, невродегенерация, сърдечно-съдови заболявания, метаболитен синдром и др. (de Cabo et al, 2014).

Ето защо, при избора на експериментален модел за идентифициране влиянието на препарати против стареене, високата степен на еволюционно сходство е от решаващо значение. Много от метаболитните пътища при дрождите, които са от значение за стареенето и възникване на заболявания при хората, са добре запазени. Такива са сигналите за наличие на хранителни вещества, регулирането на клетъчния цикъл, механизмите за репарация на ДНК, митохондриалната хомеостаза, липостазата, нагъването и секрецията на протеини, протеостазата, реакцията на стрес и регулираната клетъчна смърт (Fabrizio and Longo, 2003). Характеризирани са около 90% от близо 6000 гена на дрождите, като е установено че 30% от дрождевия геном има сходни последователности с тези на човека (Stefanini et al, 2013).

G₀ състояние при дрождите

G₀ клетките са непъпкуващи, метаболитно неактивни и запазващи пролиферативния си капацитет (50 – 90% от клетките). Популацията на клетките в нелатентно състояние (NQ) е хетерогенна и се състои от: 1) "стари" клетки, които са жизнеспособни и репродуктивно компетентни; 2) клетки, които са жизнеспособни, но репродуктивно некомпетентни; и 3) клетки, които показват характерни черти на апоптоза и/или некротично състояние (10 – 50%) (Palkova et al, 2014).

В условия на хранителна лимитация дрождите могат да навлизат в две различни състояния на покой – спори или G_0 (Tomova et al, 2019). Кое състояние ще избере клетката зависи от редица генетични и метаболитни фактори. То се регулира и от набор от специфични растежни фактори и хормони. По време на навлизане в състояние на покой микроорганизмите претърпяват морфологични и физиологични промени, които им позволяват да се противопоставят на въздействието на стреса от околната среда. Както прокариотните, така и еукариотните клетки могат да съществуват в едно или друго състояние на покой в продължение на години (Werner-Washburne et al, 1993). Малко се знае за сигналите, отговорни за повторно навлизане в клетъчния цикъл. При дрождите този процес обикновено е свързан с предоставяне на източник на въглерод (Granot and Snyder, 1993).

Предпочитаният източник на въглерод и енергия за дрождевите микроорганизми е глюкозата. Когато се култивират в течна среда, те метаболизират глюкозата предимно ферментативно, освобождавайки етанол в средата. Когато глюкозата стане ограничаващ фактор, клетките навлизат в диауксична фаза, характеризираща се с намалена скорост на растеж и превключване на метаболизма от гликолиза към аеробно разграждане на етанол. Когато и етанолът се изчерпи в средата, част от клетките навлизат във фаза на покой. Попаднали в това състояние, те са подложени на стрес от липсата на хранителни вещества и натрупване на токсични метаболити, предимно от оксидативния метаболизъм. Диференцират се по начини, които им позволяват да поддържат жизнеспособността си за продължителни периоди от време. Някои от тези промени наподобяват промени в клетки, подложени на реакция на стрес. Това води до индуциране на гени, отговорни за синтезата на HSP-белтъци като HSP26, HSP12, HSP82, HSP104, SSA3, както и натрупване на трехалоза (Werner-Washburne et al, 1993). През стационарната фаза на растеж дрождите започват да складираят резервни вещества като гликоген, триацилглицероли, а вероятно и полифосфати (Taylor and Parks, 1979). Клетките в покой са по-устойчиви на топлинен и осмотичен стрес (Plesset et al, 1987), както и на въздействието на токсични съединения (DeNobel et al, 2000). За разлика от клетките в експоненциална фаза на растеж, те са в състояние да оцелеят за продължителни периоди от време без добавяне на хранителни вещества (Lilie and Pringle, 1980). В същото време могат да проявят подобен транскрипционен отговор

към стрес (Jelinsky et al, 2000), както и бързо да активират транскрипцията на много гени, ако се добави повторно източник на въглерод (Martinez et al, 2004).

Ако дрождевите клетки гладуват по отношение на азот или фосфор, те също навлизат в покой, но не е известно дали имат същите характеристики, както ако са лимитирани по източник на въглерод (Werner-Washburne et al, 1993). Лишаването на диплоидните клетки от хранителни вещества не винаги води до G₀ състояние. Когато дрождевите диплоиди растат върху неферментируем източник на въглерод (напр. ацетат) и са лимитирани по азот, те претърпяват мейоза и спорулират (Kupiec et al, 1997).

Във всички случаи преходът на дрождевите клетки от експоненциална в стационарна фаза се регулира от няколко ключови метаболитни пътя: протеин киназа A, TOR, Snf1p и Rim15p, които сигнализират промени, засягащи наличността на хранителни вещества, свързват се с транскрипционните фактори Msn2p, Msn4p и Gis1p и предизвикват обширно препрограмиране на транскрипционния апарат (Фиг. 7).



Фигура 7. Сигнални пътища, контролиращи навлизането в състояние на покой

Фигурата е обобщение на известните сигнални пътища, за които се смята, че контролират навлизането в състояние на покой. TOR и PKA пътищата са активни в присъствието на хранителни вещества и имат способността да потискат състоянието на покой. Когато клетките изпитват недостиг на въглерод, и двата пътя се репресират. Дезактивирането на TOR причинява активиране (макар и временно) на PKC, което води до някои характеристики на покой като напр. преустроена клетъчна стена. Snf1 пътят се инхибира от наличието на

ферментируеми въглеродни източници. Когато тези източници са изчерпани от средата, Snf1 се активира и допринася за превключването от ферментативен към респираторен метаболизъм, което е от съществено значение за навлизане в състояние на покой (Gray et al, 2004).

Механизмите в транскрипционната регулация по време на диауксия и покой не са напълно изяснени. Множество изследвания показват, че дрождевите клетки в G₀ и тези на висшите еукариоти споделят много общи характеристики, въпреки че се различават по един важен аспект. За разлика от клетките при бозайниците в покой, дрождевите клетки в покой показват значително по-ниска скорост на метаболизъм. Независимо от това, *S. cerevisiae* представлява отличен модел за изследване на G₀ състояние. Имайки предвид, че клетките на многоклетъчните еукариотни организми прекарват по-голямата част от живота си във фаза G₀, по-доброто разбиране на тези процеси в дрожди може да даде силен тласък в разкриване механизмите на различни болестотворни процеси като стареене и рак (Galdieri et al, 2010).

ДРОЖДИТЕ ВЪВ ФАРМАКОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Съвременната медицина е изправена пред предизвикателството да разработи по-ефективни и безопасни терапевтични средства за лечение на човешки заболявания. Токсикогеномиката е нова област в науката, която цели разработването на лекарства, оценка на риска и откриване на биомаркери (Guerreiro et al, 2003). Тя се основава на изучаване механизма на действие на лекарствата върху генома чрез използване на глобални подходи за идентифициране на кандидат-лекарствени мишени и извънцелеви ефекти (Sven et al, 2007). Прилагането на тази стратегия е важна не само при идентифициране на нови препарати, но и при намиране на нови приложения на вече одобрени лекарства.

В областта на медико-биологичните изследвания все повече се използват дрождите като еукариотен моделен организъм (Simon and Bedalov, 2004). Около 17% от всички дрождеви гени са членове на семейства от гени ортолози, свързани с човешки заболявания, като по-голямата част от тези гени имат хомолози при бозайници (Foury, 1997). Друго предимство на дрождите е приносът им за идентифициране механизмите на действие на новооткрити лекарствени

препарати. Понастоящем *S. cerevisiae* е единствената система, в която е възможно да се оценят всички мишени в клетката *in vivo* (Smith et al, 2010).

Методите, които се използват при дрожди, намират приложение и за изследване на човешки гени, определящи различни заболявания (Gammie et al, 2007), скрининг на нови лекарства за лечение на рак, затлъстяване, прионни заболявания и др. (Tribouillard et al, 2006), както и прогнозиране на отговора към съответното лекарство въз основа на показатели като генотип и нива на експресия (Perlstein et al, 2007). Информация от този характер може да се използва като насока за рационално проектиране на нови лекарствени деривати с по-малко странични ефекти, а също и за приспособяване на лекарства към индивидуалните генотипове на пациентите.

В проучване на Bivi et al, 2009 дрождите се използват за идентифициране на вторични мишени на азотсъдържащи бисфосфонати – препарати за лечение на заболявания, свързани с костите, включително рак. Единствената известна мишена на тези съединения е фарнезил пирофосфат синтаза, но авторите установяват, че действието на този препарат при дрожди включва повреди в ДНК и цитоскелета. Наборът данни, получен от изучаването на дрожди, е валидиран при бозайници и потвърждава участието на нови биологични процеси и специфични гени, които представляват потенциални нови мишени за съединения с антитуморна активност (Bivi et al, 2009). Нулеви дрождеви мутанти са използвани за идентифициране на мишени на 78 съединения с различна химична структура и терапевтично значение (Lum et al, 2004). Това води до идентифициране на ланостерол синтаза в биосинтетичния път на стерола като мишена на антиангиналното лекарство молсидомин, докато процесинга на рРНК се определя като потенциална мишена на клетъчния растежен инхибитор 5-флуорурацил.

В скрининг проучване е изпитано едновременно действието на 10 различни съединения (включително противоракови и противогъбични агенти) върху колекция от мутантни дрождеви щамове (Giaever et al, 2004). По този начин е идентифицирана близка химична структура в три от съединенията, които инхибират мутантен щам ERG24. Това предполага, че клетките реагират по подобен начин на съединения със сходна структура. Няколко съединения с *in vivo* активност срещу дрожди и приони при бозайници са характеризирани на базата на скрининг при дрожди (Tribouillard et al, 2006). Този метод е утвърден като

икономичен, ефективен и високопродуктивен. Използва се за идентифициране на нови прионові инхибитори или за извършване на цялостни проучвания на структурната активност на вече изолирани лекарства срещу приони при бозайници. Получените резултати подчертават консервативността на биохимичните пътища, контролиращи формирането на приони ([Tribouillard et al, 2006](#)).

Независимо от предимствата на дрождите като биологични тест-системи, съществуват и някои недостатъци. Простото устройство на дрождите не дава възможност за изучаване на сложни явления и не позволява да се предоставят данни за специфична органна или тъканна токсичност. Изследванията върху дрожди дават приблизителни сведения за токсичните дози на съединението, тъй като *S. cerevisiae* обикновено е по-толерантен микроорганизъм спрямо високи дози на токсични вещества от по-висшите еукариотни клетки, което вероятно се дължи на клетъчната стена. Тя служи като бариера и съдържа редица активни ефлуксни помпи и механизми за детоксикация, които затрудняват определянето на реалната концентрация на приложеното токсично вещество ([Sá-Correia et al, 2009](#)). Друго ограничение е възможното отсъствие на адекватни молекулни мишени в дрождите, тъй като някои цитотоксични съединения засягат физиологични механизми, които не съществуват в дрожди ([Foury, 1997](#)). Откриването на хомология между дрождеви и човешки гени не означава непременно, че те са ортолози ([Heinicke et al, 2007](#)), което от своя страна изисква допълнителни експериментални анализи.

Използването на нови технологии и прилагането на глобални молекулярни анализи, свързани с ефектите на лекарствените препарати върху дрождите, разкриват неподозирани по-рано молекулни мишени или неблагоприятни ефекти. Дрождите са доказана ценна начална платформа за скрининг и прогнозиране токсичното действие на нови или все още непроучени лекарства/химикали, както и за изследване механизмите на токсичност. Тези първоначални анализи са улеснени от използването на дрожди, като се има предвид, че сигналните и регулаторни пътища са силно консервативни и могат да разкрият взаимодействията на химичен препарат с очакваните или неочаквани генни, протеинови или метаболитни мишени.

Изследването на дрожди и други моделни организми, както и междувидовото сравняване на важни гени/протеини, участващи в токсикологичния отговор, ще улесни бъдещото разбиране на токсичния отговор на системно ниво. Очаква се тази стратегия да позволи прогнозирането на действието на лекарствените препарати и в други видове.

ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИЧНИ ПАРАМЕТРИ ВЪРХУ ДРОЖДИ

В природата съжителстват съвместно много микробни видове. Изменящите се условия на околната среда причиняват драматични трансформации на микробиомите поради различната устойчивост и темпове на растеж на микроорганизмите. Всеки микробен вид има набор от оптимални условия, при които се развива най-добре. Тъй като условията в естествената среда варират значително, микроорганизмите развиват толерантност към редица външни фактори. Напр., много от тях имат оптимална температура на растеж 30°C, но растат, макар и по-бавно, при 4°C ([Watson, 2006](#)).

Микроорганизми с опростена клетъчна организация, като бактериите, или толкова сложни, като бозайниците, са изложени непрекъснато на безброй биохимични или физически сигнали, произхождащи от клетката или околната среда. С цел да се активират подходящи клетъчни реакции, всички организми са развили специфични рецептори, които да усещат различни сигнали и да предават информацията чрез взаимосвързани сигнални мрежи към ефекторни протеини. Докато биохимичното сигнализиране е изследвано отдавна, значението на механичните сили в клетъчната биология е оценено едва наскоро. Клетъчният отговор на физически стимули е в основата на разнообразни физиологични процеси – от развитието и размножаването до настъпването на различни патологични изменения.

Дрождевите микроорганизми се използват широко за промишленото производство на различни видове биотехнологични продукти. Техният механизъм на действие е обект на редица научни изследвания. Ферментационната им ефективност обаче е силно намалена от резките изменения в околната среда и влиянието на различни физични фактори.

Физичните фактори определят формата, функциите и подвижността на клетките и управляват програмите за развитие като ембриогенезата. Абнормалните механизми за обратна връзка при човека водят до някои патологични състояния, напр. мускулна дистрофия, нарушение на слуха, поликистоза на бъбреците и прогресия на рака. Ето защо, използването на дрождевите микроорганизми като моделна система за изучаване ефекта на различни физични фактори върху клетъчната преживяемост и нормалното функциониране, е от ключово значение. Нещо повече - дрождевите клетки в покой се характеризират с по-голяма устойчивост към действието на различни видове стрес. В неблагоприятна среда те трябва да останат не само жизнеспособни, но и при подходящи условия да съумеят да навлязат отново в пролиферативния клетъчен цикъл по строго регулиран начин.

Едни от най-важните физични фактори, оказващи ефект върху микроорганизмите са температурата, рН, наличие или отсъствие на кислород, осмотичното налягане, наличието на свободна вода, звуковите вълни, UV лъчите и др. Всички те в различна степен повлияват скоростта на растеж или индуцират апоптоза в микробните клетки.

Влияние на температурата

Ниските и високите температури влияят върху растежа и развитието на микроорганизмите и затова е необходимо да се познават долната и горната граница, за да се установи при кои температури те се развиват оптимално. Ако температурите са благоприятни за техния растеж, микробните клетки имат способност да растат независимо дали в средата присъстват всички необходими хранителни вещества, влажност и кислород ([Wei, 2021](#)).

Понижаването на температурата води до силно намаляване скоростта на ензимните реакции в клетката. Повечето биологични системи, вкл. и дрождите, показват около 2 – 3 пъти по-ниска скорост на метаболизъм при понижаване на температурата с 10°C. Ниската температура може да повлияе отговора на микроорганизмите към промяната в околната среда директно или индиректно. Директният ефект включва намаляване на растежната скорост и ензимните активности, които изменят клетъчната композиция и различните хранителни изисквания. Индиректният ефект е свързан с промяна в разтворимостта на

молекулите, дифузията на хранителни вещества, пропускливостта на мембраните и клетъчната плътност (Clark, 2002).

Tai et al, 2007 обсъждат ролята на температурата за правилното протичане на клетъчни процеси като протеинов синтез и ензим-субстратно свързване. Като цяло, по-ниската температура забавя ензимната кинетика. Температурата е важна и за поддържане на флуидността на мембраната и нейния синтез. Фосфолипидите също се влияят от промяната на температурата. Когато температурата намалява, се увеличава синтеза на липиди в мембраната (Hunter and Rose, 1972). Обратно, с повишаване на температурата дифузията протича с висока скорост, което води до по-бързо достигане на фазата на максимален растеж.

Температурата е един от най-важните физични параметри, оказващи влияние върху дрождевия растеж и ферментационните процеси. Много от дрождите, участващи в получаването на алкохол и хлебни продукти, са мезофилни микроорганизми, но въпреки това са способни да растат при температури от 0°C до 48°C (Watson, 1987). Растежът и метаболизмът на дрождите се ускоряват при повишаване на температурата до оптималната, а над нея процесите се забавят (Thevelein, 1984).

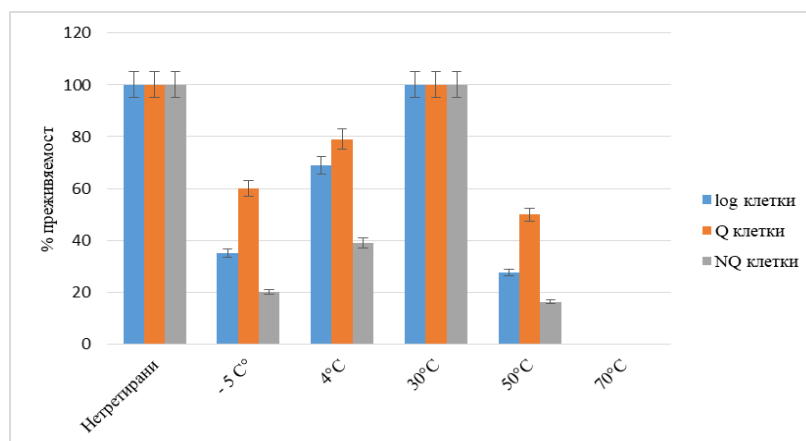
Температурната чувствителност на дрождите се използва и при изучаване на техните патологични характеристики. *S. cerevisiae* е известен и общопризнат като безопасен микроорганизъм (GRAS статус). Броят на докладваните инфекции от него обаче се увеличава, като се наблюдават фатални такива дори при относително здрави индивиди (Muller et al, 2011). Оказва се, че генната експресия на *S. cerevisiae* може да се промени в резултат на излагане на топлинен стрес, да се инициира специфично нагъване на редица протеини, което да доведе до промяна в клетъчния растеж и активиране на паразитния начин на живот (Helen et al, 2001). Ефектът на повишените температури върху третичната структура на протеините може да бъде проучена допълнително, за да стане ясно коя температура инхибира такива синтези и да се предотврати патогенния ефект, упражняван от *S. cerevisiae*.

Температурата е параметър на околната среда, който значително влияе върху растежа на микроорганизмите, тъй като има ефект върху активността на всички ензими в клетъчната метаболитната мрежа. Това е особено важно в местообитания, където има големи температурни промени, ежедневни или

сезонни. Разбирането как организмите се адаптират към различните температури може да предостави ценна информация за разработването и оптимизирането на щамове, използвани в промишлени процеси, където се изискват под- или надоптимални температури.

Влиянието на температурата зависи от фазата на развитие на дрождевите микроорганизми. Редица отличителни характеристики са свързани с фазата на растеж. В стационарна фаза дрождевите клетки са по-устойчиви на топлинен и осмотичен стрес, а в състояние на покой са значително по-резистентни на топлинен шок в сравнение с клетките в експоненциална фаза на растеж (Plesset et al, 1987). Това от своя страна води до по-голяма термотолерантност в G_0 състояние. Счита се, че термоустойчивостта се придобива при преминаване на клетките от експоненциална в стационарна фаза на растеж (Schenberg-Frascino et al, 1972). Независимо от множеството изследвания за влиянието на температурата върху дрождевия растеж, проучванията за ролята на този фактор в различните фази на клетъчния цикъл са сравнително малко.

При проследяване ефекта на различни температури (-5°C , 4°C , 30°C , 50°C и 70°C) върху три клетъчни популации (Log, Q и NQ) на *S. cerevisiae* BY4741 е установен температурен оптимум при 30°C (Мариновска П, 2023).



Фигура 8. Влияние на температурата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

При всички стойности на температурата, G_0 клетките показват най-голяма преживяемост за разлика от NQ клетките, които са с най-ниска. Преживяемостта на Log клетките е най-висока в диапазона $4 - 40^{\circ}\text{C}$ и рязко спада при температури $\leq 4^{\circ}\text{C}$ или $\geq 50^{\circ}\text{C}$ (Фиг. 8).

Счита се, че чувствителността към топлинен шок е свързана със скоростта на растеж. Клетките в стационарна фаза показват по-висока устойчивост към температурен дисбаланс в сравнение с тези в експоненциална фаза (Airoidi et al, 2009). G₀ клетките са по-устойчиви на супраоптимални температури, тъй като те вече имат редица видоизменения, които допринасят за оцеляването им в такива условия. Ниската преживяемост на NQ клетките най-вероятно се дължи на факта, че те притежават геномна нестабилност, лесно лизират и реално могат да осигуряват хранителни вещества за тези, навлезли в G₀ състояние (Aragon et al, 2008).

По-високата преживяемост на дрождите в G₀ състояние вероятно е свързана с някои техни специфични характеристики като понижена метаболитна активност. Това от своя страна ги прави по-стабилни на въздействие с различни екзогенни стресови фактори. Наред с това, високото съдържание на трехалоза в G₀ клетките служи като енергиен резерв, но също така обуславя и тяхната устойчивост при екстремни температури. Доказано е, че този дизахарид се използва за предпазване от стрес чрез действия като химичен шаперон или осмолит (Crowe et al, 1992). Трехалозата се натрупва при различни стресови условия. Увеличеното ѝ ниво се свързва с повишаване на способността за оцеляване след термичен стрес и изсушаване (Kandror et al, 2004).

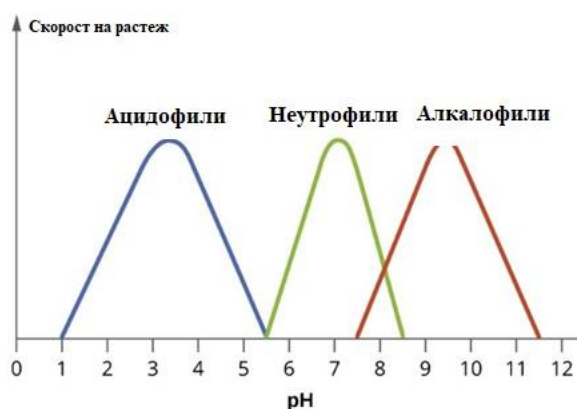
Според някои публикации оптималната температура за растеж на *S. cerevisiae* е около 30°C (Salvado, 2011). При ниски температури (1 - 10°C), клетките все още са жизнеспособни (Arthur and Watson, 1976). Темпът на растеж се увеличава при температури от 28°C до 37°C, докато в температурния диапазон от 39 - 40°C растежът намалява и клетките започват да губят своята жизнеспособност (Miyazaki, 2005).

Факторите, оказващи влияние върху растежа на микроорганизмите при определени температури, са различни и функционират в комплекс. Максималната температура за растеж на дрождите се контролира от термолабилността на техните ензими и ензимно свързаните системи (Evison and Rose, 1965), както и от строежа и пропускливостта на клетъчните мембрани (Merritt, 1966).

Резките промени в околната среда и физикохимичните стимули, включително температура, рН, редокс състояние, токсични съединения и изчерпване на хранителни вещества, предизвикват верига от защитни реакции чрез активиране регулацията на гените, кодиращи протеините за топлинен шок в клетките (Sanchez and Lindquist, 1990). Една от метаболитните промени, които претърпяват дрождевите клетки, за да навлязат в състояние на покой, е активиране експресията на тези специфични протеини. Така клетките са частично подготвени да противодействат на вредното въздействие на високата температура.

Влияние на рН

Дрождевите микроорганизми имат способността да задвижват поредица от биогеохимични процеси: от окислително-редукционни реакции до глобалния цикъл на въглерод и други елементи (Bennett et al, 2001). В замяна, техният метаболизъм се контролира от широк спектър променливи параметри на околната среда, включително рН. Това е един от най-значимите фактори на околната среда, влияещи върху растежа и оцеляването на микроорганизмите (Фиг. 9) (Lennon and Jones, 2011).



Фигура 9. Разделяне на микроорганизмите спрямо отношението им към рН (Parker et al, 2016)

Концентрацията на водородните йони (рН) е първичният контрол, който определя разнообразието на микробните съобщества в широк спектър от биогеохимични условия (Chen et al, 2004). Особени предизвикателства възникват за микроорганизмите когато концентрацията на водородни йони е ниска или висока (кисело или ниско рН), което може да е резултат от естествени геохимични процеси или микробни метаболитни процеси, които често генерират органични

киселини като странични продукти. При ниско pH протонирането на биологичните молекули влияе върху техния заряд и следователно както структурата, така и функцията им могат да бъдат засегнати неблагоприятно. Двойният липиден слой обикновено е непроницаем за водородните йони и тази характеристика позволява протонният градиент през мембраната да се използва за генериране на енергия (Mitchell, 1961). Слабите органични киселини, като лактат или ацетат, се протонират при ниско pH (в зависимост от рКа на техните киселинни групи) и следователно незаредени и по-липофилни частици могат да проникнат в липидния бислой и да освободят своите протони във вътреклетъчната среда, където pH често е по-близо до неутралното и над рКа стойността на киселинната група. По този начин органичните киселини представляват особено предизвикателство за микробните клетки, тъй като те могат да предизвикат цитоплазмено подкиселяване и разрушаване на протонните градиенти, особено когато извънклетъчната среда е кисела (Hirshfield et al, 2003).

Дрождевите микроорганизми обикновено реагират на киселинния стрес като предотвратяват увреждащия спад на вътреклетъчното pH (pHi) под прагово ниво, необходимо за жизнеспособността на клетките. Използват се три различни стратегии за предотвратяване на такъв критичен спад на pHi (Foster, 2004). Първо, клетките често използват ензимно-катализирани реакции, които консумират протони. Реакциите на декарбоксилиране често служат за тази цел, тъй като протонът се включва необратимо в реакционния продукт след отстраняването на CO₂. Примери са декарбоксилирането на аминокиселини като глутамат, аргинин или лизин. Второ, клетките могат да активират реакции, които синтезират основни съединения, за да подпомогнат неутрализирането на ниското pH. Производството на амоняк от урея или съдържащите аминокиселини като аргинин или глутамин, обикновено се използват за неутрализиране на киселинността (Krulwich et al, 2011). Трето, много видове микробни клетки елиминират протоните за сметка консумацията на АТФ. Протоните могат да се отделят от някои бактерии с помощта на F₁F_o-АТФ-аза (Russell, 2007), докато при някои видове плесени или дрожди се използва специална протонна транслоцираща ефлуксна помпа (в *S. cerevisiae* това е добре проучената протонна помпа Pma1) (Mira et al, 2010). Самите аниони на органичните киселини могат да действат като инхибитори когато се натрупват при високи вътреклетъчни концентрации, а от своя страна, както бактериите, така и

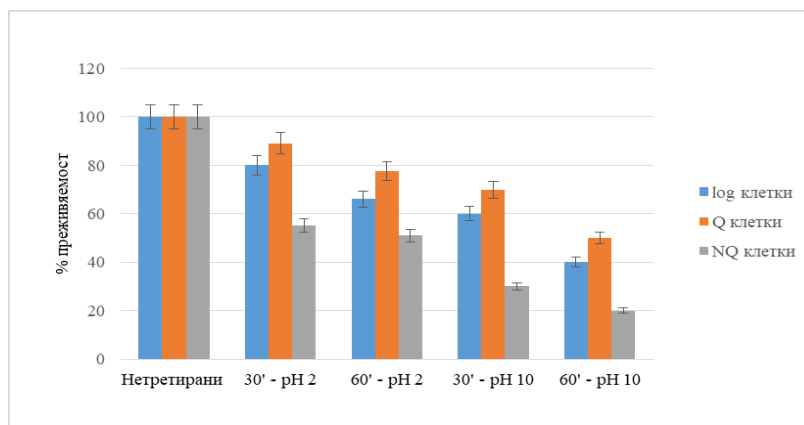
дрождите, са развили механизми за екскретиране на анионите чрез мембранни помпи (Mira et al, 2010). Понижаването на рН или наличието на органични киселини може да доведе до генериране на реактивни кислородни видове (ROS) (Schellhorn and Stones, 1992), които от своя страна да предизвикат увреждане на ДНК както в бактерии, така и в дрожди (Ribeiro et al, 2006).

Повечето от ензимите осъществяват своята функция в малки рН граници, в които ензимната активност е най-висока. рН оптимумът за *S. cerevisiae* е 5.5. Киселините и основите водят до денатурация на ензимната структура чрез разкъсване на основни водородни и йонни връзки, в резултат на което субстратът не може да остане комплементарен на активния център. Зарядът на аминокиселините в активния център на ензимите се променя при промяна на рН на средата, което също пречи на формирането на ензим-субстратен комплекс. Под и над рН оптимума скоростта на ензимните реакции в клетката драстично намалява (UK Essays, 2018).

Изследване влиянието на извънклетъчното рН е важно условие, което определя много аспекти в биологията на еукариотната клетка. Изучаването на дрождите *S. cerevisiae* като моделен организъм, е ценен подход за оценка на ефекта на този фактор на средата и как той въздейства върху специфични аспекти на жизнения цикъл.

През 1966 г. Norkrans установява, че *S. cerevisiae* спира да расте при рН 8.0. Съвсем наскоро ефектът от високото рН (≥ 8.0) е изследван и по отношение на промените в генната експресия и синтеза на редица ензими (Vogel and Hinnen, 1990). Независимо от натрупаните данни в тази област, ролята на различните физиологични и биохимични процеси за осигуряване на рН толеранс при дрождите не е напълно изяснена.

Влиянието на много ниски и много високи стойности на рН върху преживяемостта на три клетъчни популации (Log, Q и NQ) на S. cerevisiae BY4741 е изследвано в проучване на Мариновска П, 2023. Ефектът на киселинен стрес (рН – 2.0), приложен за различно време (30 и 60 min), върху жизнеспособността на клетки в G_0 е оценен чрез определяне процента на преживели клетки въз основа на CFU/ml. След инкубиране в кисела среда (рН 2.0) за 30 min е отчетена 90% преживяемост за G_0 и 80% преживяемост за Log клетки (Фиг. 10).



Фигура 10. Влияние на рН върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Увеличеното време за третиране е свързано с по-значителен спад в преживяемостта на Log клетките: за 60 min инкубация само 60% от тях остават жизнеспособни. При същите условия G_0 клетките показват близо 80% преживяемост. Този факт вероятно се дължи на комплексното влияние на клетъчните характеристики, които обуславят по-високата устойчивост в състояние на покой при неблагоприятни условия. И при трите клетъчни популации е наличен по-висок процент преживели клетки след инкубация при кисело рН, в сравнение с преживяемостта при силно алкално рН. При NQ клетките се наблюдава най-ниска преживяемост, вероятно поради намалената им способност за възпроизвеждане и формиране на дъщерно потомство.

Установено е, че апоптозните NQ клетки бързо губят възможност да се възпроизвеждат, тъй като ~50% от тях са репродуктивно некомпетентни (Aragon et al, 2008). По литературните данни повечето щамове *S. cerevisiae* растат при рН между 2.5 и 8.5, въпреки че по своята същност те са ацидофилни микроорганизми, растящи по-добре в кисела среда (Carmelo et al, 1997). По-ниската преживяемост при клетките в експоненциална фаза вероятно е свързана с по-високата им метаболитна активност. Rothstein and Demis, 1953 наблюдават, че както добавянето на K^+ при ниско рН, така и повишаването на рН до около 6.0 увеличават скоростта на ферментация при дрожди. Наличието на K^+ и високото рН могат не само да стимулират ферментацията, но и дишането (Peña et al, 1969). Това се дължи на симулацията на H^+ -АТФазната активност на плазмената мембрана, която е основният механизъм за подкисляване на средата и

транспорт на K^+ в дрождите (Peña et al, 1972). И когато нивата на H^+ в околната среда са абнормални, това директно повлиява метаболитните процеси в активно делящите се дрождеви микроорганизми

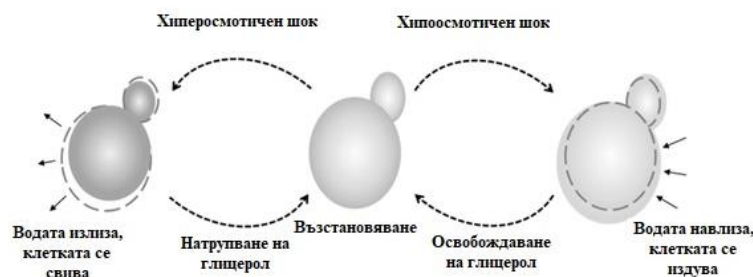
Друг процес, който значително се повлиява в резултат на драстични изменения на рН на средата, е клетъчната диференциация при дрождите. При тези еукариотни микроорганизми е възможно активирането на две различни програми за диференциация – хаплоиден растеж и спорулация, като и двете се инхибират при растеж в кисела среда (Hayashi et al, 1998).

Веgetативният растеж на *S. cerevisiae* протича при сравнително широк диапазон от стойности на външно рН, но определено е по-ефективен при кисело, отколкото при неутрално или алкално рН. Всъщност, повечето лабораторни щамове трудно могат да пролиферират в буферирана среда над рН 8.0 – 8.2. Поддържането на желана киселинна среда се основава предимно на активното изпомпване на протони, медирано от плазмената мембранна H^+ -АТФаза, кодирана от основния *PMA1* ген (Serrano et al, 1986). Pma1 е най-разпространеният протеин на плазмената мембрана. Неговата електрогенна активност създава електрохимичния градиент на протоните през плазмената мембрана и е от решаващо значение за поддържането на цитозолната рН хомеостаза, заедно с вакуоларната H^+ -АТФаза, с която той изглежда е координирано регулиран (Munoz and Kane, 2008).

Влияние на осмотичното налягане

Микроорганизмите успешно колонизират почти всяка ниша на Земята, където имат достъп до вода. Активността на водата се определя като химичен потенциал на свободната вода в разтвор и се изразява в тенденцията на водата да участва в биохимичните реакции (Hohmann, 2002b). При хиперосмотичен шок, водата изтича от клетката, което води до свиването ѝ и следователно повишаване на концентрациите на всички вещества, присъстващи в цитоплазмата. Обратно, при хипоосмотичен стрес, водата навлиза в клетката, причинявайки увеличаване на клетъчния обем и намаляване концентрацията на разтворените вещества. Затова клетките трябва да адаптират своята вътрешна осмоларност чрез получаване на подходящ клетъчен обем и вътрешна водна оптимална концентрация, за да се осигури правилното протичане на биохимичните процеси и възстановяването на тургорното налягане (Blomberg and

Adler, 1992). Тъй като загубата или усвояването на вода са бързи процеси, които са от решаващо значение за механизмите на оцеляване, те имат способността да се активират веднага след внезапна осмотична промяна (Blomberg and Adler, 1992). Въпреки това, адаптацията след хиперосмотичен шок може да отнеме няколко часа (Hohmann, 2002b). За да възстанови своя воден баланс *S. cerevisiae* еволюира чрез натрупване на съвместимия осмолит глицерол (Hohmann, 2002b). Разнообразна гама от молекули могат да действат като съвместими осмолити, напр. аминокиселини, полиоли и захари, метиламини, метилсулфонови съединения и урея (Yancey, 2005). Осмолитите функционират за намаляване на вътреклетъчния воден потенциал и по този начин привличат водата в клетката. Наред с това, осмолитите могат да имат уникална защитна метаболитна роля като антиоксиданти, осигуряващи редокс баланс (Yancey, 2005). Когато клетките имат достатъчни нива осмолити при възстановено тургорно налягане и обем, растежът може да се възобнови в състояние на висока осмоларност (Фиг. 11).



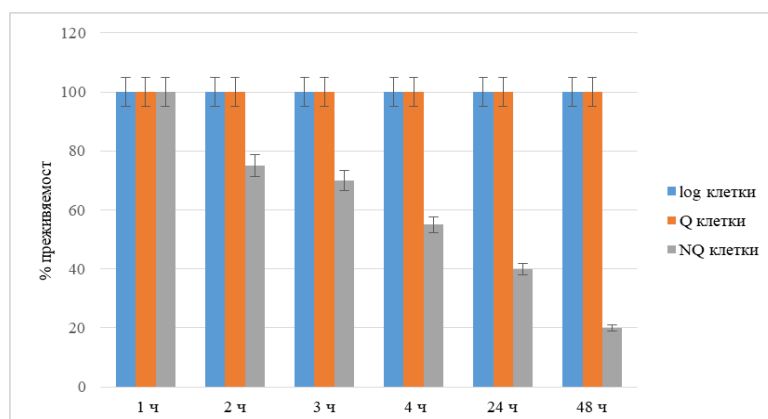
Фигура 5. Адаптиране на клетките при хипер- и хипоосмоларитет

При хиперосмотичен стрес водата изтича от клетката, което води до почти незабавно намаляване на клетъчния обем и съответно увеличаване концентрацията на веществата в цитоплазмата. Адаптацията включва натрупване на глицерол. По този начин се създава подходящо тургорно налягане и възстановяване на клетъчния обем. Обратно, при хипоосмотичен стрес водата навлиза в клетката, причинявайки увеличаване на клетъчния обем и нови стресови условия (Siderius et al, 1997). Адаптирането става чрез освобождаване на прекомерно количество глицерол, за да се предотврати спукване и по този начин се балансира тургорното налягане (Babazadeh, 2014).

Отговорът към осмотичен стрес най-често е свързан с вътреклетъчно натрупване на осмолити като глицерол, арабитол, манитол и еритритол (Brown and Simpson, 1972). Способността да се синтезират, съхраняват или изнасят тези

осмолити е добре контролиран процес и изглежда е присъща характеристика на всички живи организми за справянето им с осмотичния стрес (Kayingo et al, 2001).

Ефектът на хипоосмотичен стрес върху Log, Q и NQ клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741 е изследван при суспендиране на клетките в дестилирана вода (Мариновска П, 2023). Установено е, че както активно растящите клетки, така и тези в състояние на покой, запазват 100% жизнеспособност дори след 48 часа третиране. За разлика от тях апоптозните NQ клетки бързо губят своята жизнеспособност и след 48 часа само 20% са със запазени репродуктивни функции (Фиг. 12).



Фигура 12. Влияние на хипоосмотичните условия върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Еукариотните клетки реагират на хипоосмотичен шок чрез бързо освобождаване на осмолити. Доказано е, че пъпкуващите дрожди от род *Saccharomyces* екскретират вътреклетъчен глицерол под влияние на хипоосмотичен шок и това освобождаване се контролира от MIP семейство от канални мембранны белтъци и по-специално от белтък Fps1p (Luyten et al, 1995). Fps1p се активира по време на хипоосмотичен стрес и се деактивира при настъпване на хиперосмотични условия, като по този начин се контролира натрупването и освобождаването на глицерол по време на осморегулацията.

Проучвания със *S. cerevisiae* показват, че загубата на жизнеспособност след хипоосмотичен шок възниква в клетките, които са дефектни по износа на осмолит (Luyten et al, 1995). Това вероятно е и основната причина за бързата загуба на жизнеспособност при NQ клетките. От друга страна, главна предпоставка за противодействие на хипоосмотичния шок е наличието на

ригидна клетъчна стена при тези микроорганизми, което обуславя и липсата на ефект при Log и Q клетките.

Изследвания на други автори показват, че мутации, които засягат сигналния път на протеин киназа С (PKC) и съответно отслабване здравината на клетъчната стена, водят до по-висока чувствителност на осмотичен стрес (Lee and Levin, 1992). Доказано е, че клетките, намиращи се в стационарна фаза, притежават термо- и осмоотолерантност (Plesset et al, 1987).

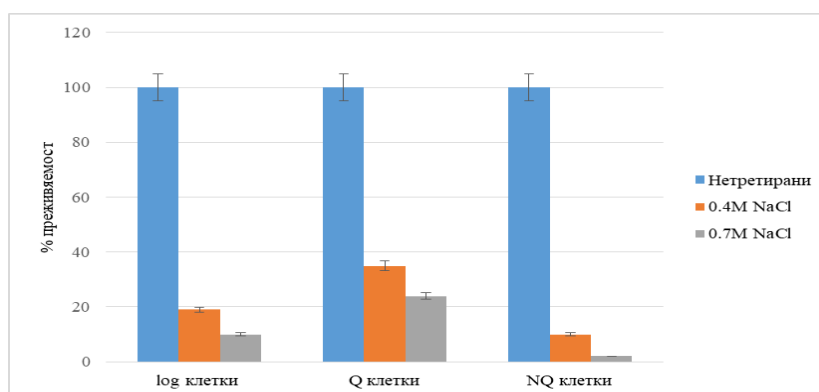
Влияние на хиперосмотичен стрес

При прилагане на хиперосмотичен стрес в клетките се активират редица физиологични промени, които включват освобождаване на вътреклетъчното водно съдържимо, бърза редукция на тоталния клетъчен обем (Albertyn et al, 1994), преходно нарастване на получените продукти на гликолизата (Allison et al, 1999), усвояването на цитозолния глицерол и активиране на HOG сигналния път (Bellinger and Larher, 1987). Осмоадаптационните механизми в активно делящи се клетки на *S. cerevisiae* са добре проучени, но малко се знае относно реакцията на различните дрождеви популации, които вече са навлезли в стационарна фаза на растеж и съответно преминават в G₀ състояние или активират процесите на програмирана клетъчна смърт.

Натриев хлорид

Излагането на дрождевите клетки на високи концентрации NaCl води до бързо освобождаване на вода в средата, с което клетката се дехидратира. Дехидратацията е бърз процес, медиран единствено от освобождаването на водното съдържимо през липидния бислой. Вътреклетъчната вода се поддържа в определени граници от вакуолата в цитоплазмата, като по този начин частично се компенсира от внезапното увеличаване на макромолекулната концентрация. Цитоскелетът се разрушава, което води до деполяризация на актиновите нишки и спиране на клетъчния растеж. При тези условия клетъчното препрограмиране или „адаптация“ представлява основна защита, включително натрупване на съвместими разтворени вещества за балансиране на вътреклетъчното осмотично налягане. Съвместимите разтворени вещества могат да бъдат глицерол, трехалоза, аминокиселини и мастни киселини, съдържащи се в клетъчната мембрана. Микроорганизмите, като дрождите *S. cerevisiae*, развиват системи за контролиране ефекта след приложен осмотичен стрес.

Преживяемостта на Log, Q и NQ клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741 е изследвана при третиране за 20 min с две концентрации на NaCl – 0.4 и 0.7 M (Мариновска П, 2023). И при двете концентрации на NaCl в средата G_0 са по-устойчиви на осмотичен стрес, отколкото Log клетките. При инкубиране в 0.4 M NaCl е отчетена 35% преживяемост за G_0 , и съответно 19% – за Log клетките. При по-висок осмотичен потенциал (0.7M NaCl) процентът на жизнеспособни клетки намалява, съответно 24% при клетките в състояние на покой, и 10% при пролифериращите клетки (Фиг. 13).



Фигура 13. Влияние на 0.4 и 0.7M NaCl върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

В условия на дехидратация апоптозните NQ клетки бързо губят своята жизнеспособност, което напълно отговаря на схващането, че те са най-неустойчиви към редица вредни въздействия. Предизвиканият стрес вследствие високата солева концентрация води до два различни феномена: йонна токсичност и осмотичен стрес. Защитните реакции към стрес от въздействие с NaCl се основават на осмотични корекции като синтеза на осмолити и активиране на системи за износ на натрий. Когато дрождевата клетка се намира в състояние на осмотичен стрес, основният осмолит, който се усвоява от клетките, е глицеролът (Crowe et al, 1984). Други продукти, които се синтезират са трехалоза и гликоген, които заедно представляват 25% от сухата клетъчна маса. Дизахаридът трехалоза се усвоява от клетките не само по време на третиране с NaCl (Dmitrieva et al, 2004), но и в отговор на висока температура (Meikle et al, 1988). Основната причина Q клетките да се характеризират с по-голяма устойчивост към високи концентрации на NaCl е натрупването на трехалоза (за преживяване на неблагоприятни условия) в процеса на гладуване и преминаването в G_0

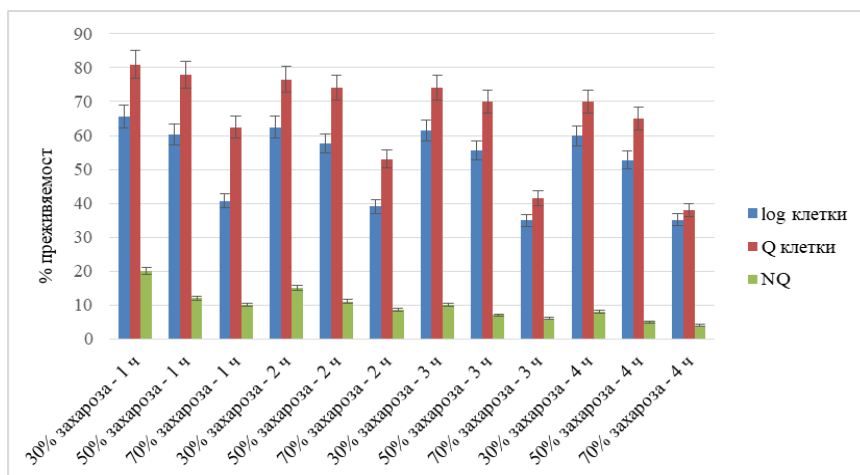
клетъчен цикъл (Lilie and Pringle, 1980). За разлика от тях, активно дялящите се клетки нямат складирани запаси от този метаболит и следователно по-малка част от тях успяват ефективно да отговорят на индуцирания хиперосмотичен стрес.

Захароза

Дрождите са едни от най-широко използваните продуценти на биотехнологични продукти и често захарозата е основен източник на въглерод. Тя се транспортира директно в клетките на *S. cerevisiae*, без да бъде предварително хидролизирана в околната среда (Badotti et al, 2008). Вътре в клетката консумирането ѝ започва с хидролиза чрез инвертаза, разположена в периплазматичното пространство. Получените монозахариди (глюкоза и фруктоза) преминават в цитоплазмата чрез облекчена дифузия и стават достъпни след вътреклетъчно фосфорилиране чрез глюко- и хексокинази, които участват в първата стъпка в пътя на Ембден-Майерхоф-Парнас (Marques et al, 2017). Високите концентрации на захароза в състава на хранителните среди обаче биха предизвикали хиперосмотичен стрес в клетките и биха затруднили или дори прекратили ферментационния процес. Например, сладкото тесто може да съдържа до 30% добавена захароза, тъй като по-високи концентрации водят до осмотичен стрес (Reed and Nagodawithana, 1991). По данни на Barnett et al, 2016, концентрация на захароза от порядъка на 3-4% е оптимална за протичане на ферментационните процеси. Допълнително, захарозата играе важна роля в процеси като осморегулация, толерантност към различни температури, изсушаване, клетъчно сигнализиране, транспорт и съхранение на въглерод (Lunn, 2008). Тъй като захарозата е нередуцираща захар, тя може да се натрупва във високи количества в клетките, без да реагира с белтъци или други молекули.

Ефектът на високи концентрации захароза върху S. cerevisiae BY4741 е проследен чрез инкубиране на клетки от три популации (Log, Q и NQ) в разтвори на захароза (30%, 50% и 70%) за 4 часа на стайна температура (Мариновска П, 2023). Най-рязък спад в преживяемостта е отчетен на 1-вия час, като 35% от Log клетките загиват в 30% захароза, а 70% – в 60% захароза (Фиг. 14). При същите условия 80% от NQ клетките губят жизнеността си след третиране с 30% захароза, докато в 70% разтвор умират близо 90% от тях. G₀ запазват своята жизненост в рамките на 81% и 62.5%, съответно в

30% и 70% захароза. През следващите 3 часа тенденцията за намаляване жизнеността на трите типа клетъчни популации се запазва. За Log, NQ и Q клетките на 4-тия час са отчетени съответно 59.9%, 8% и 70% преживяемост при 30% захароза, и 35%, 4% и 38% преживяемост – при 70% захароза.



Фигура 14. Влияние на различни концентрации на захароза върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

При биотехнологично производство на етанол се използват хранителни среди с висока концентрация на захари – от 16% до 20%, като се целят по-високи добиви на крайния продукт. Повишаването на захарозата над 20% не води до увеличаване на икономическия коефициент на етанола, а до генериране на хиперосмотичен стрес в дрождевата клетка ([Ishmayana et al, 2011](#)).

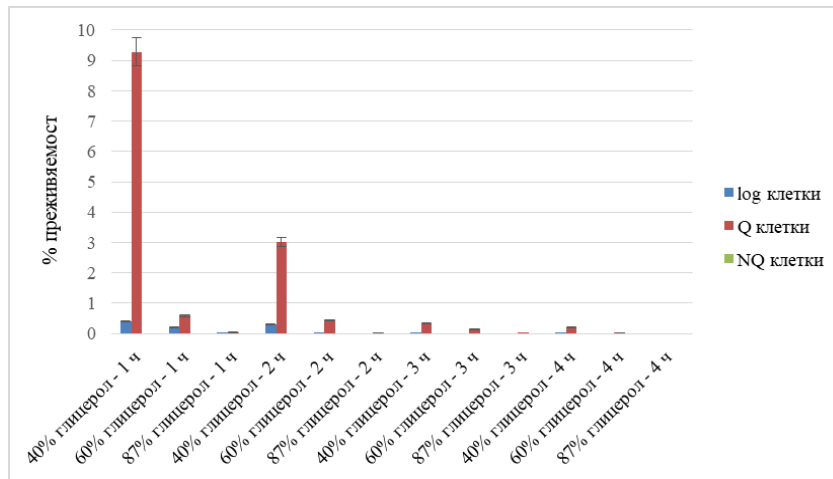
Отговорът на пъпкуващите дрожди към осмотични промени се оказва полезен инструмент за изследване на адаптационните механизми в този микроорганизъм ([Muzzey et al, 2009](#)). Когато клетките *S. cerevisiae* се сблъскват с хиперосмотичен стрес, водата изтича и се стига до клетъчно свиване ([Petelenz-Kurziel et al, 2011](#)). Този дисбаланс се компенсира благодарение на HOG пътя, който води до фосфорилиране на цитоплазмения белтък Hog1 ([Posas and Saito, 1997](#)). HOG пътят позволява на дрождите да се адаптират към хиперосмотичен стрес в рамките на 15-30 min. ([Miermont et al, 2011](#)), което най-вероятно е причина за сравнително високата им преживяемост в активна пролиферация при различни концентрации захароза. За разлика от тях, при Q клетките се наблюдава най-висока преживяемост, и вероятната причина за това са специфичните характеристики на G₀ състоянието. Клетките са с удебелена клетъчна стена и понижена скорост на метаболизма, което ги предпазва от вредното действие на

високи концентрации от този дизахарид. При NQ клетките е отчетена близо 90% загуба на клетъчна жизненост, неоспорим факт, като се има предвид тяхната физиология, а именно че много от тях са сенесцентни, апоптозни или навлезли в етап на програмирана клетъчна смърт.

Глицерол

Друг важен метаболит, оказващ ключово въздействие върху дрождевия растеж, е глицеролът. Той е основният осмопротектор в повечето видове дрожди, включително *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002). Глицеролът може да служи като източник на въглерод, а цитозолното ниво на неговото разграждане/синтез е важен фактор за поддържане на клетъчния редокс баланс (Valadi et al, 2004). Освен тези функции, той се използва и за синтез на глицерофосфолипиди и триацилглицероли (Kohlwein et al, 1996) и служи като защитен механизъм при оксидативен или топлинен стрес (Pahlman et al, 2001). Последните разработки в биофизичните техники дадоха представа за механизмите и реакциите на стрес, предизвикани от халотропната конкурентна способност и екологията на *S. cerevisiae* (Bhaganna et al, 2010). Високите извънклетъчните концентрации на глицерол могат да причинят преходна промяна в тургора на клетките *S. cerevisiae*, тъй като той прониква в плазмената мембрана в рамките на 1-2 min и не действа като стресов агент (de Lima Alves et al, 2015). Следователно, основният му начин на действие като стресор е понижаване на водната активност или инхибиране на нивата на халотропната активност (Williams and Hallsworth, 2009). Някои от ксеротолерантните щамове *S. cerevisiae* могат да растат при 3-4M глицерол (Cray et al, 2013a). Тези щамове могат да бъдат инхибирани както от ниската водна активност, така и от високата халотропност на стресовия агент (de Lima Alves et al, 2015).

Оценено е въздействието на три различни концентрации на глицерол (40%, 60% и 87%) върху Log, Q и NQ клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741 (П. Мариновска, 2023). Установена е по-висока устойчивост към стрес при Q клетките, в сравнение с NQ и Log клетките (Фиг. 15). Още на първия час след третиране с 40% глицерол жизнеността рязко спада, като се наблюдава едва 9.3% преживяемост дори и при G_0 . При Log клетките се наблюдава близо 23 пъти по-ниска преживяемост. От друга страна, NQ са напълно инхибирани и от трите концентрации на глицерола.



Фигура 15. Влияние на различни концентрации глицерол върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

С увеличаване времето на въздействие тенденцията за загуба на жизненост се запазва. При първоначална концентрация на контролните клетки 6×10^6 CFU/ml и третиране с 60% глицерол, на 2-я час се установяват едва 20 CFU/ml Log клетки. При прилагане на най-високата концентрация глицерол (87%) не се установяват жизнеспособни клетки и в трите популации, дори и на 1-я час от третирането. В същото време, при Q клетките се наблюдава спад в жизнеността съответно с 2 и 3 порядъка при 60% и 87% глицерол. При 60% глицерол Log клетките губят изцяло своята жизненост на 3-я час, а на 4-я час са налице едва 15 CFU/ml. Клетките в покой запазват макар и минимална жизнеспособност до 4-я час при концентрации 40% и 60% глицерол, съответно 0.2% и 0.023% преживяемост. При третиране с глицерол Q клетките загиват напълно след 4 часов хиперосмотичен стрес (Мариновска П, 2023). Представените експериментални данни имат ключово значение не само от гледна точка на токсичното действие на този метаболит върху еукариотната клетка, но и като ценна информация за криобиологичните изследвания.

Вероятно причината за устойчивостта на Q клетките към хиперосмотичен стрес е фактът, че *S. cerevisiae* натрупва трехалоза, която действа като антагонист и успява да поддържа високо вътреклетъчно налягане и така да противодейства на токсичните за клетката концентрации на глицерол (Cray et al, 2013a). Глицеролът и трехалозата са основните осмолити, участващи в клетъчния адаптивен отговор в условия на хиперосмотичен стрес. При изследване на мутанти по HOG пътя на *S. cerevisiae* BY4741 Duskova et al, 2015 съобщават, че най-висока преживяемост се наблюдава при дивия тип щам след прилагане на

хиперосмотичен стрес – третиране с NaCl и сорбитол. От друга страна, глицеролът е широко използван и като криопротектор за съхранение на дрожди при ниски и свръхниски температури (Cabrera et al, 2010). Неговото действие като криопротектор е свързано с разкъсване на връзките между водните молекули, като по този начин се предотвратява образуването на големи водни кристали.

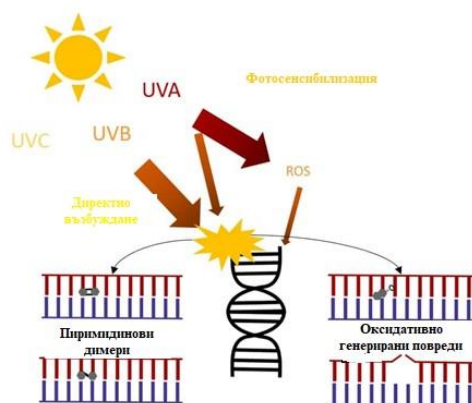
Влияние на ултравиолетовите лъчи

Ултравиолетовата светлина унищожава бактерии, дрожди, плесени, вируси и водорасли. Потискане растежа на микроорганизмите чрез UV лъчи се прилага в практиката от дълги години (Favier et al, 2001). Известно е, че UV лъчите имат стерилизиращо действие в зависимост от параметри като дължина на вълната и микробна концентрация (Wallbank et al, 1985). Дължина на вълната между 200-300 nm причинява апоптоза на клетките (Ishida et al, 1991). UV радиацията предизвиква увреждане на ДНК, което е потенциално смъртоносно за клетки и канцерогенно за животни (Hockberger, 2002). Проучванията при делящи се и пъпкуващи дрожди показват че гените, които са отговорни за оцеляването под действие на UV лъчи, кодират два фактора за възстановяване на ДНК (Phipps et al, 1985), както и контролни протеини, които регулират клетъчния цикъл в отговор на увреждане на ДНК (al-Khodairy and Carr, 1992). Тези гени са еволюционно запазени сред еукариотите, така че могат успешно да се използват при изучаване на различни молекулярни механизми (Aravind et al, 1999). Пиримидиновият димер е най-разпространената форма на ДНК увреждане, предизвикано от UV, като тази повреда се отстранява от ДНК чрез нуклеотидна ексцизионна репарация (NER) (Cadet et al, 2015).

NER е основен път за репарация на ДНК, който може да елиминира различни ДНК повреди, генерирани главно от мутагени на околната среда като ултравиолетово облъчване или химични съединения, които водят до изкривяване на ДНК спиралата (Gillet and Schärer, 2006). Еукариотният NER се състои от два подпътя: глобален геномен NER (GG-NER) и NER, свързан с процеса на транскрипция. Първият е особено важен за потискане на UV-индуцирана мутагенеза и канцерогенеза (Kusakabe et al, 2019). Когато присъстват по време на S фазата, пиримидиновите димери формират празно място в дъщерната ДНК верига (Lopes et al, 2006). Репарацията на тези повреди е пострепликационна и включва хомоложна рекомбинация, байпас полимерази и

други (Friedberg, 2005). UV лъчите имат способността да формират пиримидинови димери както в ДНК, така и в РНК, което от своя страна може да повлияе не само репликацията, но и транскрипцията (Goosen and Moolenaar, 2008).

Лесните за култивиране представители от род *Saccharomyces* са подходящ модел за изследване въздействието на UV лъчите върху молекулата на ДНК (Barahona et al, 2016).

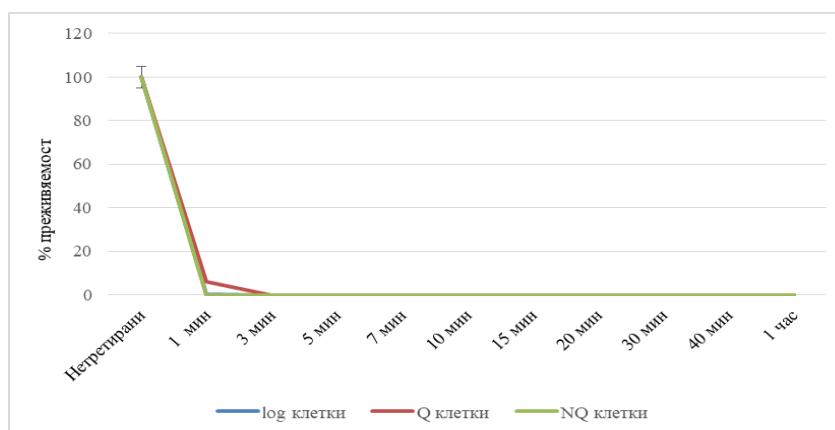


Фигура 16. UV-индуцирани повреди в ДНК, причинени от UV-A и UV-B лъчи (Mao et al, 2017)

Друга причина за широкото им използване в изследователския процес се основава на приликите в репродукцията и метаболизма им с човешките клетки. Когато са изложени на UV лъчи, дрождите мутират по механизми, сходни с тези при висшите еукариоти (**Фиг. 16**) (Alhamdy and Al-Sowayan, 2020).

Слънцето излъчва радиация с дължина на вълната под формата на видима и невидима светлина. Невидимата светлина съдържа UV светлина, която може да бъде класифицирана в три вида: UVA, UVB и UVC. UVA не се абсорбира от озоновия слой и попада директно в тропосферата. Тя прониква в клетките на кожата, причинявайки преждевременното ѝ стареене и влияе върху имунитета. UVB се абсорбира частично чрез озона. Тя е отговорна за увреждането на ДНК, което води до рак и клетъчна апоптоза. UVC се абсорбира напълно от озоновия слой. UVC обхваща бактерицидния диапазон в UV спектъра, с дължина на вълната 200 до 280 nm. Първичният механизъм на инактивиране на бактериалния растеж включва омрежването на съседни пиримидинови нуклеотидни бази в ДНК, което в крайна сметка води до клетъчна смърт (Gabriel et al, 2017).

Преживяемостта на популации от Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 е определена в рамките на експеримент, при който клетъчни суспензии ($OD_{540} = 1.0$) от трите типа са инокулирани върху YPD твърда хранителна среда и облъчени с UV-C₂₅₄ лъчи за различен период от време (1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60 min) (Мариновска П, 2023).



Фигура 17. Ефект на UV лъчи върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Още на първата минута от въздействието е налице 100% инхибиране на растежа на клетъчните популации, с изключение на клетките в G_0 (6% преживяемост). След 3-та минута не е отчетен растеж в нито една от трите популации (Фиг. 17). При клетките в Log фаза се наблюдава 10 пъти по-ниска жизнеспособност, което се дължи на факта, че те са активно делящи се. При тях възможността за формиране на мутации в молекулата на ДНК е по-голяма поради по-високата скорост в процесите на репликация и биосинтеза. За разлика от Log клетките, Q клетките притежават кондензирани хромозоми, които вероятно ги предпазват от фунгицидния ефект на UV лъчите и при тях метаболитните процеси са сведени до минимум и изявата на евентуални мутации е силно ограничена. NQ клетките губят напълно своя растеж след въздействие с UV-C₂₅₄ още на 1-ма минута (Мариновска П, 2023).

UV светлината води до образуване на тиминови димери. Въпреки че слънцето осигурява топлина и светлина, които са от съществено значение за живота на Земята, UV лъчите имат пагубен ефект за клетката. Natarajan, 2020 експериментира с дрождеви щам, мутантен по гените, отговарящи за репарация

на ДНК, и следователно чувствителен към UV лъчи. Авторът установява, че UV уврежда молекулата на ДНК, като инициира появата на тиминови димери. Ако димерът не се възстанови по правилния начин, има два пътя – да се превърне в ракова клетка, или директно да причини апоптоза на клетката. Това обяснява действителния бактерициден ефект на UV светлината върху преживяемостта на микроорганизмите.

Докладвана е пълна загуба на жизненост след облъчване с UV-C₂₅₄ на клетки в експоненциална фаза на *S. cerevisiae* след 9 минутно облъчване (Niu et al, 2021). При спорулиращи диплоидни щамове на род *Saccharomyces*, спорулирането се забавя или не настъпва поради наличие на множество увреждания (пиримидинови димери) в премейотичната ДНК след облъчване с UV лъчи (Simchen et al, 1972). Директното облъчване на дрождеви клетки с UV-C₂₅₄ лъчи оказва мощен фунгициден ефект върху тях. Молекулата на ДНК абсорбира най-добре светлина с дължина на вълната от 250 – 260 nm (Ganske, 2014), което най-вероятно е причина за този летален ефект върху клетъчните популации. След провеждане на редица експерименти Ozcelik, 2007 установява, че фунгицидният ефект на UV-C₂₅₄ е по-голям, в сравнение с този, наблюдаван след прилагане на UV-C₃₅₄, дори и за по-дълъг период от време.

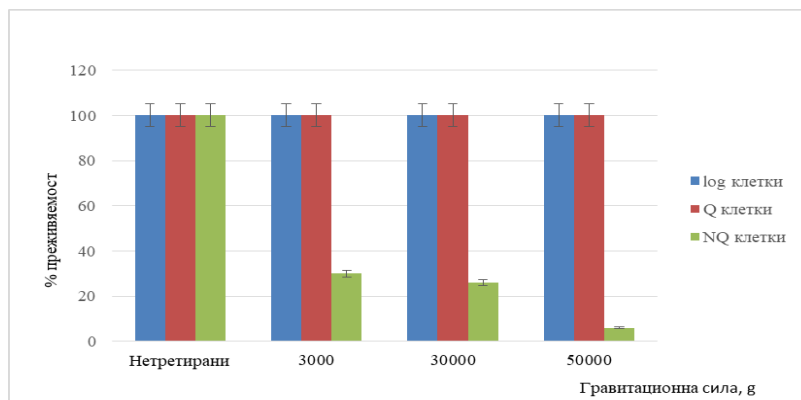
Влияние на гравитационната сила

Счита се, че микроорганизмите могат да оцелеят при гравитация над 400 000 x g, която е повече от тази на Земята. Хората могат да понасят сили, равни на 3 до 5 пъти гравитацията на повърхността на Земята (g). Екстремната "хипергравитация" от 400 000 x g обикновено се среща само в космически среди. Част от способността на микроорганизмите да издържат на хипергравитация е свързана с техните размери (Deguchi, 2011). Колкото по-голям е един организъм, толкова по-чувствителен е той към гравитационните сили. Многоклетъчните организми, включително и човека, не понасят силата само на няколко пъти g.

Въпреки че проучвания показват как условия с променени гравитационни сили влияят на физиологията, морфологията и метаболитните реакции на различни микроорганизми, причините някои от тях да проявяват по-висока устойчивост от други остават частично неясни и изискват допълнителни изследвания (Than, 2011).

Животът на Земята протича при постоянна гравитационна сила. Микроорганизмите, в това число и дрождите, са чувствителни към изменения в силата на гравитационното поле. През последните години, с развитието на космическите програми, все по-голямо внимание се обръща на влиянието на микро- и хипергравитацията върху еукариотните клетки. Установено е, че в условия на лабораторно симулирана микрогравитация клетките скъсяват своята лаг-фаза, увеличават скоростта си на растеж, повишават устойчивостта си към антибиотици и променят генната си експресия (Sheehan et al, 2007). Все още съществуват ограничен брой изследвания върху влиянието на хипергравитацията върху еукариотните микроорганизми.

Влиянието на хипергравитацията върху Log, Q и NQ клетки на S. cerevisiae BY4741 е изследвано чрез центрофугиране на трите популации ($OD_{600} = 1.0$) при различна гравитационна сила g ($g=3000$; $g=30000$ и $g=50000$) за различен период от време (1 – 4 часа). На всеки час са вземани проби и броят на преживелите клетки е изчислен в CFU/ml. Процентът преживяемост е оценен спрямо контролни проби, неподложени на хипергравитация (Мариновска П, 2023).



Фигура 18. Влияние на гравитационната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Преживяемостта на Q и Log клетките не е потисната след 4 часа центрофугиране с 3000g гравитационно поле, докато при NQ клетките тя е около 3 пъти по-ниска спрямо останалите два вида клетки и контролите (Фиг. 18). Увеличението на гравитационната сила на 30000g и 50000g води до почти пълна загуба на жизненост при NQ клетките, съответно 26% и 6%. Останалите две клетъчни популации отново запазват своята преживяемост (100%) при приложената хипергравитация (Мариновска П, 2023).

Установено е, че микрогравитацията стимулира растежа на някои бактериални видове като *S. enterica* serovar Typhimurium, *B. subtilis*, *E. coli* (Taylor, 1974). При *E. coli* Lag фазата е по-къса, а продължителността на експоненциален растеж е по-голяма, в резултат на което клетъчната плътност се удвоява по време на космически полет (Klaus et al, 1997). Микрогравитацията може да окаже ефект и върху вторичния метаболизъм на микроорганизмите, напр. продуцирането на бета-лактамни антибиотици от *Streptomyces clavuligerus* (Demain and Fang, 2001). Генната експресия на *S. cerevisiae* също се стимулира от микрогравитация (Johanson et al, 2002).

При експерименти с хипергравитация върху *S. cerevisiae* е установено, че този еукариотен микроорганизъм показва чувствителност към високи гравитационни нива. По литературни данни, след прилагане на 74558 x g, растежът на дрождите е напълно потиснат (Deguchi et al, 2011). NQ клетките се характеризират със загуба на метаболитна активност и дори способност за апоптоза, което най-вероятно е причина за пълната загубата на тяхната жизнеспособност след прилагане на хипергравитационен стрес. Тези проучвания потвърждават възможността *S. cerevisiae* да се използва като моделен организъм за изучаване реакцията на еукариотните клетки спрямо приложена хипергравитация. Значението на този тип изследвания може да намери широко приложение в различни космически изследвания.

Влияние на механичната сила

Физичните сили играят ключова роля в оцеляването и функционирането на всички живи форми на живот. Напредъкът в клетъчната биомеханика и механобиология може да даде ключови прозрения във физиологията на еукариотните организми, но малко се знае за влиянието на физичните сили върху микробния метаболизъм (Harper and Hernandez, 2020).

Механичните свойства на клетъчната стена играят съществена роля относно растежа и формата на *S. cerevisiae*. За разлика от огромните познания за генетиката на дрождите *S. cerevisiae*, малко се знае за техните механични свойства. Отговорът на цялата клетка към приложените механични сили се определя от взаимодействието на няколко фактора, включително силата и еластичността на отделните молекули, съставляващи клетъчната стена;

триизмерното подреждане на тези молекули; генетичните фактори, програмиращи състава и сглобяването им (Smith et al, 1999).

Идентифицирани са много гени, които пораждат аберантни форми, въпреки че не е известно как генните продукти влияят на формата (Friedberg et al, 1995). Последните постижения в атомно-силовата микроскопия позволяват да се измери еластичността на глюкопиранозния пръстен (основният мономер в клетъчната стена на *S. cerevisiae*) (Marszalek et al, 1998), но не е известно какви са механичните свойства на сглобяването на молекулите, нито как условията на околната среда им влияят (Ruiz-Herrera, 1992). Необходими са изследвания във всички тези области, за да може на фундаментално ниво да се разбере по-добре растежът и формирането на клетката. Определянето на механичните свойства на клетъчната стена е съществена част от този процес и към днешна дата те са слабо проучени.

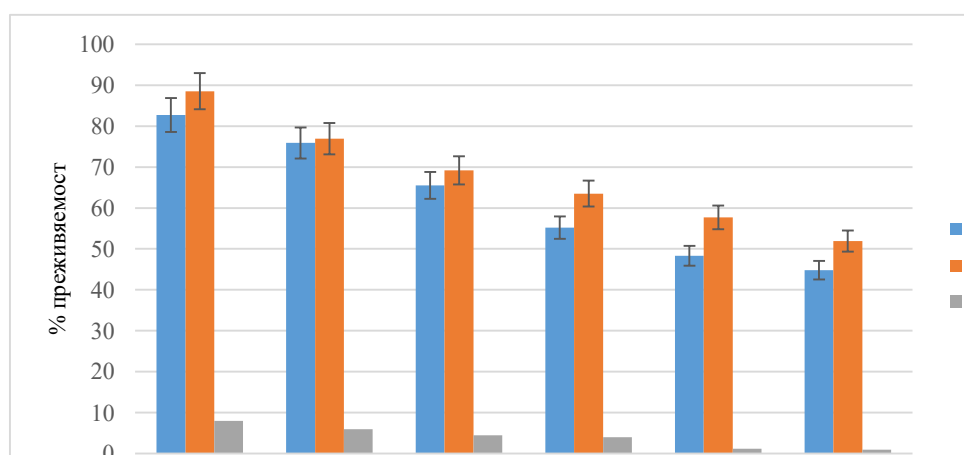
Изучаване на механиката на дрождевата клетка играе значителна роля и при изследване биологията на микробните повърхности. Потокът на течността и контактът между клетките и повърхностите са две повсеместни и важни характеристики за съществуването на дрождите в естествена среда. Напредъкът в микромащабното инженерство и микроскопията предоставят мощни инструменти за изследване влиянието на физичните сили върху микробното сензорно възприятие и адаптация (Rusconi et al, 2014).

Познанията върху механичните свойства на дрождите биха спомогнали за разработване на по-ефективни подходи за разрушаване на техните клетки. В литературата са описани различни методи за клетъчен лизис, които могат да бъдат приложени за екстракция на клетъчните компоненти. Например, за обща екстракция на протеини може да се използва литиев ацетат (LiAc) в комбинация с NaOH, което води до повишаване на пропускливостта на клетъчните стени на дрождите, освобождавайки протеини от клетките (Zhang et al, 2011). За разлика от това, за екстракция на липиди, по-ефективен подход е хомогенизирането на клетъчна суспензия в присъствието на органични разтворители и стъклени перли с диаметър 0.25 – 0.30 mm (Schneider and Daum, 2006). Авторите показват, че методът позволява разрушаване на клетките в продължение на четири цикъла от 30 sec при 1700 rpm с пауза от 30 sec между циклите.

По отношение на извличането на полизахаридите, намиращи се в клетъчните стени, първо трябва да се вземе предвид дали се цели получаването на нативни молекули или фрагменти от β -глюканите. Един от методите за извличане на β -глюкани включва клетъчно фрагментиране, което се получава чрез използване на стъклени перли или ултразвук. Някои по-сложни методи за извличане на β -глюкани включват комбинация от ултразвук, алкални вещества и ензими (Zheng et al, 2019).

При провеждане на генетични и молекулярно-биохимични експерименти е необходимо клетъчната стена на микроорганизмите да бъде частично или изцяло отстранена. Такъв тип отстраняване се осъществява чрез третирането им с ензимни разтвори (ензимен лизис), чрез прилагане на висока температура и/или разтвори на алкохол и NaCl (автолизис) или чрез въздействие с механична сила в процес на механично дезинтегриране. Икономически най-ефективният метод за получаване на безклетъчен екстракт от дрождеви клетки е чрез механично дезинтегриране. При този метод върху клетъчната стена се упражнява сила на удар от балистичен товар, което води до разрушаване на стената и мембраните, а това от своя страна предизвиква отделяне на клетъчното съдържимо в буфериращата система. Ефективността на процеса на механична дезинтеграция зависи от редица фактори, като едни от най-важните са вида на микроорганизма, структурата и химичния състав на клетъчната стена, клетъчната концентрация, размерите на балистичния товар и режима на дезинтеграция.

Степента на преживяемост на Log, Q и NQ клетки на S. cerevisiae BY4741 е изследвана при механично дезинтегриране с лабораторен дезинтегратор и стъклени перли (Мариновска П, 2023). Експериментът е проведен в режим и условия на дезинтегриране, препоръчани от търговския производител на апарата (Next Advance, USA). Установено е, че Q клетките са по-устойчиви към въздействие на механична сила, в сравнение с останалите две клетъчни популации, при които е налице плавна редукция на жизнеспособността.



Фигура 19. Влияние на механичната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

След 1-та минута е наблюдаван малък процент разрушени клетки от Log и Q популациите, съответно 17.3% и 11.5%. За разлика от тях, NQ клетките са дезинтегрирани в 92%. На всяка следваща минута процентът на дезинтегрираните клетки се увеличава с около 7 – 10% за Log клетките, 5 – 7% за G_0 клетките и 2 – 4% за NQ клетките. В края на експеримента процентът преживели клетки е съответно 44.8%, 51.9 и 1% за Log, Q и NQ клетките (Фиг. 19).

Клетките на *S. cerevisiae* притежават механосензори, които по своята същност са белтъчни молекули. Те са разположени основно в клетъчната стена, но техният C-край се свързва с клетъчната мембрана и предава сигнали при наличие на механичен стрес към други сигнални молекули, разположени във вътрешността на клетката. Това води до активиране на клетъчните регулаторни пътища за запазване интегритета на клетъчната стена и клетъчната жизнеспособност (Elhasi and Blomberg, 2019). Възможността за засилена експресия на протеините от тези метаболитни пътища в активно делящите се дрождеви клетки е и най-вероятната причина голяма част от тях да запазват интегритета на клетката дори и след продължително излагане на механичен стрес.

Дрождевите клетки в стационарна фаза притежават по-ниска устойчивост към въздействие с механична сила спрямо клетки от същия щам, но в късна стационарна фаза (Kleinig, 1997). Според авторите, при преминаването от една фаза на развитие в друга, химичният състав на клетъчната стена не се променя съществено. Промени настъпват само в нейната дебелина, което определя по-

голямата еластичност на G_0 клетките в покой и по-високата им устойчивост към механичната сила на удара.

При изследване с бактерии е установено, че те притежават по-висока устойчивост към въздействието с механичен стрес. При *E. coli* пептидоглюканът на клетъчната стена силно се омрежва по време на фазата на покой (Middelberg et al, 1992). Доказаната по-висока устойчивост на клетки в G_0 състояние след въздействие с механична сила вероятно се дължи както на по-дебелата клетъчна стена, така и на по-малките размери на техните клетки (Sun and Gresham, 2021). Установено е, че броят на ударите върху клетъчната повърхност зависи до голяма степен от нейните размери, което определя степента на увреждане на стената (Solecki et al, 2021).

Влияние на ултразвук

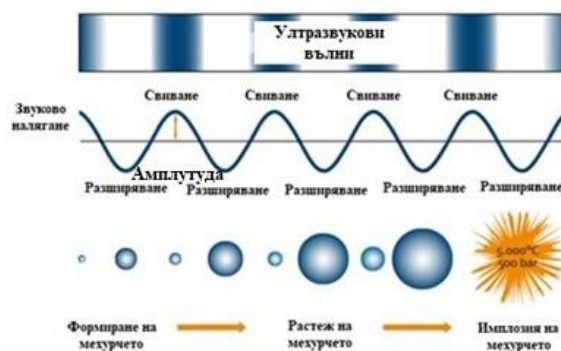
Ултразвукът се дефинира като акустична енергия или звукови вълни с честота над 20 kHz. Счита се, че ултразвукът е пагубен за клетъчния растеж. Въпреки това, клетките могат да растат в озвучаване с нисък интензитет поради следните свойства: 1) способност да ускорява транспортирането на малки молекули в разтвор и 2) неспособност да отделя напълно клетките (или дори неживите частици) от повърхностите. Първият аспект е добре известен, докато вторият е слабо проучен и всъщност неговата антитеза е общоприета – погрешното схващане, че ултразвукът е много ефективен при премахване на клетки и частици от повърхности.

Ултразвукът ускорява движението в течността чрез два основни механизма (Фиг. 20). Първият е акустичен поток, при който импулсът от насочени разпространяващи се звукови вълни се прехвърля към течността, което я кара да тече в посоката на разпространение на звука. Акустичният поток се увеличава с интензитета на озвучаване и според някои данни със скорост до 14 cm/s (Starritt and Duck, 1989).

Вторият механизъм за засилване на движението е известен като микропоток и се осъществява чрез натрупване на газови мехурчета в течността (Rooney, 1988). Циклите на ниско и високо акустично налягане карат газовите мехурчета да се разширяват и свиват, което от своя страна създава сила на срязване около осцилиращите мехурчета (Nyborg, 1982). Стабилна кавитация се получава когато акустичният интензитет е достатъчно нисък, така че

мехурчетата да не се разрушат напълно по време на цикъла на свиване. Началото на стабилна кавитация оказва влияние на транспорта. Такъв транспорт се ускорява с увеличаване на акустичния интензитет, тъй като се образуват по-големи и многобройни кавитационни мехурчета и амплитудата на трептене се увеличава.

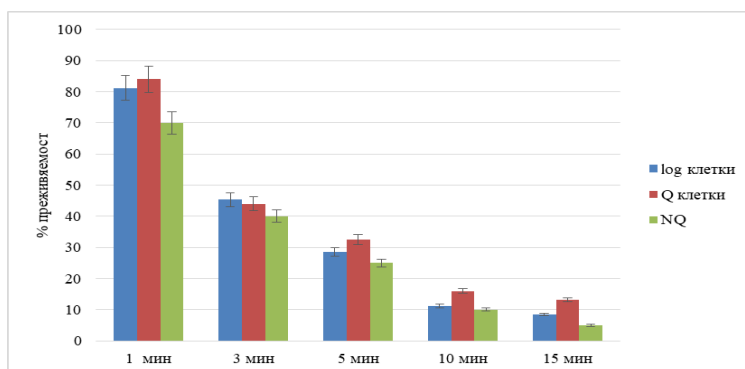
Ултразвукът с висок интензитет и ниска честота (< 100 kHz) обикновено се използва за почистване на твърди повърхности като стъклени съдове, метални инструменти, пластмасови изделия и други (Maisonhaute et al, 2002). Високочестотният ултразвук с ниска плътност се използва широко за генериране на голямо количество окислително-редукционни радикали, като например окисляване на органични замърсители във водна среда.



Фигура 20. Механизъм на въздействие с ултразвук (Johansson, 2017)

Установено е, че ултразвук с подходяща дължина на вълната може да стимулира растежа на микроорганизмите. Той променя жизненото състояние на микробните клетки, което води до ускоряване на тяхната пролиферация и биосинтеза на повече продукти на метаболизма. Всъщност ултразвукът увеличава пропускливостта на мембраната, ускорява преноса на вещества и насърчава растежа и размножаването на клетките. Изследване на Wang et al, 2003 относно влиянието на ултразвукови вълни с нисък интензитет върху натрупването на Ca^{2+} в клетките на *S. cerevisiae* показва, че то може значително да се повиши под действието на приложеното третиране. Счита се, че плесените са най-устойчиви на ултразвуково третиране, следвани от бактериалните ендоспори и вегетативните клетки (Deng et al, 2015). Установено е, че ултразвуковата кавитация и високите температури действат синергично при инактивирането на *S. cerevisiae* (Wordon et al, 2012).

Ултразвукът е един от алтернативните методи за нетермична стерилизация в хранително-вкусовата промишленост. Предимствата пред термичната пастьоризация включват по-слабата загуба на вкус и енергийно по-ефективен процес (Xu et al, 2009). Ултразвукът е използван за потискане растежа на микроорганизми в морска вода, като е установен разрушителен ефект върху микробните клетки (Xu et al, 2016).



Фигура 21. Влияние на ултразвука върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

На **Фиг. 21.** са представени експериментални данни за Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с ултразвук (40kHz) в продължение на 15 min, с последващо отчитане на резултатите като процент преживяемост, спрямо контролни клетки, неподлагани на ултразвук (Мариновска П, 2023). Още след 1-ма минута е налице висока преживяемост при Q клетките, последвани от Log и NQ, (съответно 84%, 82.5% и 70%). След 3-та се наблюдава драстичен спад в клетъчната жизненост с близо 2 пъти по-ниска преживяемост. Тенденцията за намаляване на жизнеността при трите вида клетки се запазва, като на 15-та минута процентът преживяемост за Q, Log и NQ е съответно 13.2%, 8.4% и 5% (**Фиг. 21**).

При изследвания с филаментозни гъби в късна експоненциална фаза на растеж е установено, че след първата минута клетките остават жизнеспособни, като се наблюдава от ултразвука разрушаване на филаментите и последващо повишаване на CFU/ml (Piyasena et al, 2003).

Yang et al, 2021 тестват ефекта на ултразвуковите честоти при 0, 20, 23, 25, 28, 33 и 40 kHz върху натрупването на биомаса дори повишаване на общия им брой с близо 14%. Това се дължи на индуцираното и добива на етанол при *S.*

cerevisiae. Авторите наблюдават, че третирането с ултразвук е в състояние да увеличи активността на дрождите и да подобри способността им за синтез на етанол в зависимост от честотата, която се прилага. Получените от тях резултати предполагат, че ултразвукът позволява слабо и поправимо увреждане на клетъчната мембрана, което води до подобрената ѝ пропускливост, насърчаване на транспорта през нея и повишаване способността за клетъчен растеж. Ултразвукът може да промени и чувствителността на ензимите към техните субстрати (Huang et al, 2017).

От друга страна, процесът на ултразвукова кавитация също е добре проучен. Съществуват два вида кавитация, а именно преходна и стабилна, отговорна за два ефекта: химичен и механичен (Povey and Mason, 1998). Бактерицидните и бактериостатичните ефекти, които се наблюдават след третиране на различните дрождеви клетъчни популации с ултразвукова честота 40 kHz вероятно са свързани с промяна в кавитацията, вследствие от екзогенно генерирани механични сили на срязване в течна среда, които увреждат микроорганизмите в суспензията, а също така и кавитацията, възникваща в клетката (Ciccolini et al, 1997).

ТОКСИЧНО ДЕЙСТВИЕ НА ЛЕКАРСТВЕНИ ПРЕПАРАТИ

Терапевтичните агенти имат специфичен начин на действие. В конвенционални дози тези вещества имат избирателна активност, т.е. имат тесен спектър на действие. В допълнение, фармакологичният профил на такива препарати зависи значително от химичната им структура, като простите молекулни модификации могат драстично да променят лекарствената активност. Тези белези на лекарственото действие предполагат, че съществува индивидуална тъканна специфичност. Такива тъканни елементи трябва да имат консервативни физикохимични свойства, за да позволят на определени съединения да се комбинират с тях, като едновременно с това ги инхибират. Тези „биологични партньори“ на действието на лекарството се наричат рецептори. Наличието на рецептори за екзогенно действащи медикаменти предполага, че тези агенти често имитират или инхибират действията на ендогенните лиганди за тези рецептори. Известно е, че лекарствените препарати рядко предизвикват нови ефекти, вместо това те променят съществуващите физиологични функции (Yagiela et al, 2011).

Рецептор – зависимо лекарствено действие

В продължение на много години след тяхното откриване, рецепторите остават загадка за фармаколозите. Малко се знае за тях, освен факта, че те са сложни макромолекули, притежаващи лиганд-свързващо място за взаимодействие със специфични агенти и ефекторно място за инициране на фармакологичния отговор. С развитието на биохимичните методи за изолиране, откриване и характеризиране на протеини обаче, ензимите стават достъпни като моделни системи за изследване на взаимодействията лекарство-рецептор. Ензимите проявяват много от свойствата, които се приписват на рецепторите. Те са макромолекули с измерими биологични функции, като притежават специфични реактивни места за избрани субстрати. Тясната връзка между ензимите и рецепторите е подчертана в началото на 40-те години на миналия век, когато става очевидно, че някои ензими са и лекарствени рецептори.

Нуклеиновите киселини също служат като рецептори за ограничен брой агенти. Някои антибиотици и антинеопластични съединения пречат на репликацията, транскрипцията или трансляцията на генетичния материал чрез обратимо или необратимо свързване към нуклеиновите киселини. Други вещества, включително хормоните на щитовидната жлеза, аналози на витамин D, полови стероиди и надбъбречни кортикостероиди, също променят транскрипцията, но тук засегнатата ДНК се активира или инхибира в резултат на лекарствено взаимодействие с отделен рецепторен протеин в цитозола или ядрото на клетката. Най-често рецепторите се разполагат на повърхността на клетъчните мембрани. С развитието на омикс технологиите, изучаването на рецепторите значително напредна и позволи натрупването на огромно количество данни относно ефекта и механизма на действие на голям брой фармакологични съединения ([Yagiela et al, 2011](#)).

Рецептор-независимо лекарствено действие

Нито едно описание на действието на дадено химично вещество не би било пълно без разглеждане на фармакологичните ефекти, които то упражнява чрез рецептор-независими механизми. Освен факта, че тези лекарства действат без необходими посредници, няма данни, които специфично да групират този разнороден набор от съединения. Самото разнообразие от лекарствени препарати изключва всякаква обединяваща връзка между дозата и ефекта им на

действие. Въпреки това, често се получават криви, изобразяващи зависимостта между концентрацията на лекарственото вещество и крайния резултат. Тези лекарства са разделени произволно в две категории: химично реактивни агенти и физично активни агенти (Yagiela, 2011).

Химично-реактивни агенти

Химично-реактивните агенти включват широк набор от съединения, някои от които се свързват с малки молекули или йони, докато други атакуват протеини или други макромолекули. Основно, тези препарати се активират от медикаменти, които са рецептор медиатори. С изключение на някои хелатиращи агенти, те не притежават специфичност и реагират индивидуално с широк набор от субстанции. Реакциите с тези агенти се осъществяват с ковалентно свързване или силно йонно прикрепване, като обикновено не се свързват с хидрофобни или слаби електростатични взаимодействия (Yagiela, 2011).

Физично-активни агенти

Физично-активните агенти често се използват терапевтично, защото са химически инертни и безопасни. Магнезиевият сулфат например е ефективен, защото не може да се абсорбира от гастроинтестиналния тракт и упражнява осмотичен ефект, причинен от задържане на големи количества вода в чревния лумен. Дебелото черво се разтяга и се стимулира да претърпи експулсивно свиване. Подобен физичен механизъм се предизвиква и от водородния пероксид. Въпреки че е силно реактивен, водородният пероксид е полезен при почистване на рани, поради ефервесцентното си действие. Освобождаването на газови мехурчета спомага физическото отстраняване на остатъци от наранените тъкани.

Физически активните агенти обикновено проявяват изненадваща липса на структурна специфичност. За много агенти изискванията за активност са определена фармакологична инертност, съчетана със способността да се прилагат във високи концентрации (в сравнение с повечето други лекарства), без причиняване на прекомерна токсичност (Yagiela, 2011).

Генотоксични агенти

Мутациите в ДНК могат да възникнат спонтанно или индуцирано. Индуцираните мутации са в резултат на химично действие на агенти с ендегенен или екзогенен произход. Генетичната токсикология изследва именно такива

агенти, които могат да увредят ДНК и хромозомите на клетките. При еукариотните организми генетичното увреждане на соматичните клетки може да доведе до злокачествено заболяване. Могат да се повлияят неблагоприятно репродукцията или да се провокира появата на наследствени мутации ([Philips and Arlt, 2009](#)).

Агенти, осъществяващи нековалентно свързване

Промяна на ензимната активност

По-голямата част от токсичните реакции във връзка с медицинската терапия са провеждат чрез обратимо свързване на лекарствата със специфични места на клетъчните ензими. Последните постижения във връзка с изясняването структурата на хлоринергични и адренергични рецептори показват, че това са протеини, които споделят свойствата на ензимите като алостеризъм. Изследвания показват, че някои терапевтични действия могат да се изменят, вследствие прилагане на комбинация от химичен агент и ензим ([Maynert and Hammond, 1976](#)).

Свързване с нуклеиновите киселини

Планарните молекули, като акридиновите багрила, показват идентичност с базовите двойки на двойноверижната ДНК и по време на ДНК репликацията водят до повишаване на „frameshift“ мутациите или изместване рамката на четене ([Arcos and Argus, 1974](#)). Изследването на широк набор от химични препарати, включващи актиномицин D, адриамицин, дауномицин, етидиев бромид и други, показва, че те се свързват здраво към НК, вероятно чрез интеркалация, и много от тези субстанции проявяват мутагенна активност ([Ames and Yanofsky, 1971](#)). Повечето от направените проучвания, обаче, са в микроорганизми и рискът от мутагенната активност на тези химични агенти при човек не може да бъде точно оценен. Първоначално широко застъпено е мнението, че канцерогенната активност на полицикличните въглеводороди е зависима от интеркалацията в ДНК. Сега е очевидно, че по-важна характеристика на канцерогенезата е образуването на реактивни метаболити и последващото им ковалентно свързване с макромолекулите в клетката ([Heidelberger, 1975](#)).

Свободно-радикални реакции

Смята се, че хомолитичното делене, водещо до образуване на свободни радикали е друг основен механизъм, отговорен за увреждането на редица човешки органи и тъкани ([Recknagel and Glende, 1973](#)). Този процес се катализира от смесената функция на оксидазата в ендоплазматичния ретикулум. Образуваните краткоживеещи свободни радикали откъсват водород от мембранните фосфолипиди, като по този начин се образуват нови свободни радикали, които причиняват сливане на двойните връзки и разцепване на мастните киселини, водейки до липидна пероксидация.

В обобщение може да се каже, че различните механизми на действие на токсичните агенти водят до нарушаване на клетъчната структура и функция, а това от своя страна предизвиква все по-голям научен интерес по отношение разработването на нови изследователски подходи, базиращи се на различни моделни организми.

ТОКСИЧНО ДЕЙСТВИЕ НА ИЗБРАНИ ХИМИЧНИ ВЕЩЕСТВА

Механизъм на действие на водороден пероксид

Окислителните агенти са предимно нискомолекулни съединения, които лесно преминават през клетъчните стени и мембрани, свързват се с компонентите на клетката, като ги увреждат, вследствие на което може да се стигне до апоптоза. Водородният пероксид е ключов представител на класа реактивни кислородни видове (ROS), които се генерират по-специално в процеса на дишане, но също така и като странични продукти от клетъчния метаболизъм. Водородният пероксид участва в много физиологични процеси като сигнална трансдукция, клетъчна диференциация и пролиферация, а също така играе роля в медирането на имунните отговори при висшите еукариоти. Той е слабо реактивно съединение и може да действа като слаб окислител или редуктор, който трудно реагира с различни биологични макромолекули - липиди, ДНК и белтъци (освен ако посочените не съдържат повече реактивоспособни тиолови групи или метионинови остатъци) ([Hampton et al, 1997](#)).

Водородният пероксид може да се образува вътреклетъчно, в резултат на някои ензимни реакции, или да действа като екзогенен генератор на оксидативен стрес. Високите нива на H_2O_2 са токсични за всички клетки и предизвикват

клетъчна смърт в зависимост от типа на клетката, нейното физиологично състояние, времето на излагане на този агент, концентрацията на H_2O_2 и средата за култивиране (Halliwell and Gutteridge, 1999). Токсичният му механизъм се дължи на способността му да се превръща в изключително реактивоспособен хидроксилен радикал ($\text{OH}\cdot$). Това се осъществява чрез излагане на ултравиолетова светлина или в присъствието на преходни метални йони.



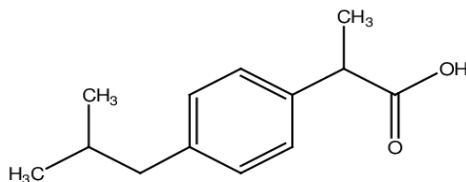
Фигура 22. Реакция на Фентън и Хабер-Вайс (Ayala et al, 2014)

При свързване на H_2O_2 и преходен метал, като желязо или мед, протича Хабер-Вайс реакция, която е тип Фентънова реакция, силно токсична за биологичните системи (**Фиг. 22**). Редуцираната форма на преходните метали (M^n) реагира чрез реакцията на Фентън с H_2O_2 , което води до образуване на хидроксилен радикал ($\text{OH}\cdot$). Супероксидният радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) също може да реагира с окислената форма на преходни метали ($\text{M}^{(n+1)}$) в реакцията на Хабер-Вайс с генериране на M^n и това отново повлиява редокс цикъла (Ayala et al, 2014). Хидроксилният радикал индуцира серия от верижни реакции на прекисно окисление на липидите в клетките като може да доведе до увреждане на ДНК и клетъчна смърт.

Механизъм на действие на ибупрофен

Нестероидните противовъзпалителни средства (NSAIDs) се използват широко при лечението на болка и възпаление. Приемането на лекарства от тази група е свързано със сериозни нежелани лекарствени реакции. Ето защо, механизмите, които обуславят токсичността им, са обект на интензивни проучвания, в които дрождите *S. cerevisiae* играят ключова роля като еукариотна моделна система.

Ибупрофенът е NSAIDs, което се получава от пропионова киселина и се счита за първият от пропион-производните лекарствени препарати ([Adams, 1992](#)) (**Фиг. 23**).



Фигура 23. Структурна формула на ибупрофен ([Abualhasan, 2015](#))

Формулата на ибупрофен е 2-(4-изобутилфенил) пропионова киселина. Първоначалната разработка на този препарат е през 1960 г., а проучванията са свързани с използването му като по-безопасната алтернатива на аспирин ([Rainsford, 2003](#)). Ибупрофенът е патентован през 1961 г. и е пуснат за употреба срещу ревматоиден артрит в Обединеното кралство през 1969 г. и в САЩ през 1974 г. Това е първото предлагано без рецепта NSAID ([Halford, 2012](#)).

Въз основа на механизма си на токсичност, NSAIDs се разделят в три класа: клас I включва диклофенак, индометацин и кетопрофен. Основна роля при токсичното им действие играят митохондриалното дишане и формирането на радикали, които повишават токсичността им, докато ABC-транспортите я понижават. Митохондриите и оксидативният метаболизъм също допринасят за токсичността на лекарства от клас II (ибупрофен и напроксен), но те не са главната клетъчна мишена на тези съединения. Ибупрофенът е единственото NSAIDs, което не активира механизмите, участващи в клетъчния отговор при множествената лекарствена резистентност. Клас III NSAIDs (сулиндак, кеторолак и зомепирак) са нетоксични при дрожди ([van Leeuwen et al, 2011](#)).

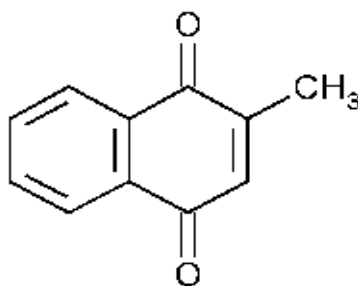
Точният механизъм на действие на ибупрофен не е известен. Въпреки това, се счита за NSAID и като такъв е неселективен инхибитор на циклооксигеназата (COX) - ензим, участващ в синтеза на простагландини (медиатори на болка и треска) и тромбоксан (стимулатори на кръвосъсирването), по пътя на арахидоновата киселина ([Rao and Knaus, 2008](#)). Ибупрофенът инхибира активността както на Cox-1, така и на Cox-2. Инхибирането на активността на Cox-2 намалява синтеза на простагландини, участващи в медирането на възпаление, болка, треска и подуване, докато инхибирането на Cox-1 се смята,

че причинява някои от страничните ефекти на ибупрофен, включително язва (Rao and Knaus, 2008). Установено е, че ибупрофенът може да повлияе пакетирането на фосфолипидните монослоеове чрез свързване на липидни компоненти, които се знае, че присъстват в еукариотните клетки. От друга страна ефектът на ибупрофена върху мембранните структури предполага, че тази молекула може да има и алтернативни мембранни мишени, протеините. Следователно са необходими допълнителни проучвания, за да се установят механизмите, чрез които ибупрофенът проявява своето действие на молекулно ниво (Lygre and Moe, 2003).

Механизъм на действие на менадион

Структурно хиноните обхващат пигменти, антибиотици, витамин К и коензими. Тези се различават химично при различните еукариотни организми и активно участват като агенти на едноелектронен трансфер в аеробния метаболизъм. Тези химични агенти често са използвани в изследването на оксидативния стрес (De Paiva et al, 2004). Интересът към тях е силно засилен и поради факта, че някои хемотерапевтични агенти съдържат хинонови ядра (De Paiva et al, 2004).

Менадионът (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин К3) е полициклично ароматно съединение от групата на хиноните, което се използва широко в проучванията на оксидативния стрес, както и като хемотерапевтично средство при лечение на артрити и като антитуморен агент (Pitsillides et al, 1991) (**Фиг. 24**). Той може да функционира и като прекурсор в синтеза на витамин К.



Фигура 24. Структурна формула на менадион (Wilk, 2007)

Описани са два основни механизма на цитотоксично действие на менадиона в различни биологични системи. Първият механизъм е свързан с индуциране на оксидативен стрес в клетката, вследствие процес на редукционно циклизиране и генериране на супероксидни радикали (Hassan and Fridovich, 1989). Менадионът претърпява едноелектронна редукция от ензими като микрозомална НАДНФ-цитохромна Р-450 редуктаза или митохондриална НАДН убихинонова оксидоредуктаза, при което се получават съответните полухинонови радикали. При аеробни условия, те участват в редукционното циклизиране, при което се генерират ROS като супероксиден анион ($O_2^{\cdot-}$) и водороден пероксид (H_2O_2). При втория механизъм менадионът действа като потенциален електрофилен агент, способен да взаимодейства с тиолови групи от белтъчни молекули и глутатион (Di Monte et al, 1984).

Оксидативният стрес сам по себе си е процес, който уврежда мембраните, белтъците и ДНК, което може да доведе до апоптоза (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Доказано е, че това е свързано с естествените процеси на стареене и заболявания като атеросклероза, рак, Алцхаймер и други невродегенеративни нарушения (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Този тип стрес може да бъде генериран ендогенно, по аеробен път, или екзогенно, чрез излагане на токсични вещества (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Менадионът е мултивитамин и терапевтичен агент за хипотромбонемия и рак, като неговият цитотоксичен механизъм е свързан с прекомерно генериране на ROS като супероксидни радикали, синглетен кислород и водороден пероксид. Поради тази причина, това съединение широко се използва като модел за изучаване на оксидативен стрес (Chung et al, 1999).

Механизъм на действие на зеоцин

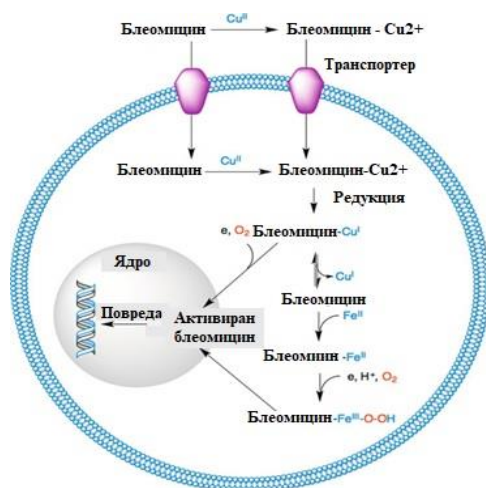
Редица вещества, които генерират окислителни промени, действат главно върху молекулата на ДНК. Такова съединение е зеоцинът – водно-разтворим, Cu^{2+} - съдържащ гликопептид. Той принадлежи към групата на блеомицините (BLM)/флеомицините/. Те са естествени гликопептиди, продуцирани от вида *Streptomyces verticillus* и приложими в клиничната практика като противотуморни лекарства. Терапевтичният им ефект включва способност да причиняват едно- или двойноверижни разриви в молекулата на ДНК в присъствие на необходимите кофактори Fe^{2+} , O_2 и едноелектронен редуктор (Chen and Stubbe, 2004).

Обикновено блеомицините се активират след навлизане в клетките, в присъствието на редуцирани преходни метали (Fe^{2+} или Cu^{+}) и кислород (Burger et al, 1981). Активираният BLM може да отстрани 4'-водородния атом от C4' на дезоксирибозната част на пиримидините, като се получават 4'-радикални междинни съединения. Тези съединения могат допълнително да бъдат превърнати в 4'-окислени апуринови/апиримидинови (AP) места или ДНК с празно пространство с 3' -фосфоглюколат/5'-фосфат (3'-PG/5'-P) краища (Rabow et al, 1990). Нарушаването на водородните връзки между комплементарните бази може да доведе до разкъсване на двойноспиралната ДНК верига (DSBs), което е пагубно за клетката, ако не се поправи правилно (Chen et al, 2008). BLM-индуцираните ДНК лезии не са произволно разпределени в генома, тъй като 5'-GT* и 5'-GC* динуклеотидите (звездичката [*] показва разцепения нуклеотид) са предпочитаните места за свързване на BLM (Andrea and Haseltine, 1978). Мутагенезата на BLM е потвърдена в множество организми (Fernandez et al, 2020). В допълнение към заместването на базата, лечението с BLM също води до честа делеция на една база (Povirk et al, 1994). При навлизането на зооцина в клетката, той е в неактивна форма, но след редукция на медния катион до Cu^{1+} и отстраняването му от сулфохидрилни съединения в клетката, зооцинът се свързва с ДНК, като индуцира едно- или двуверижни разриви в ДНК. Те водят най-често до хромозомни реорганизации и са трудно поправими (Krol et al, 2015) (Фиг. 25).

Третираните с BLM клетки показват повишен процент на мутации, но основните механизми на тяхното токсично действие остават неясни. Изследвани са напр. глобалните геномни промени в третираните с BLM клетки на дрождите *S. cerevisiae*.

Използвайки генетичен анализ и секвениране на целия геном се открива, че степента на мутации може да бъде значително повишена в клетките на *S. cerevisiae*, които са третирани със зооцин. Делецията на една база и заместването на тимин (T) с гуанин (G) в мотива 5'-GT-3' представят най-яркият пример за индуцираните от зооцин генетични промени. Това е главно резултат от транслезия на синтеза на ДНК, включваща Rev1 и полимераза ζ . Третирането със зооцин води до честа загуба на хетерозиготност и хромозомни пренареждания в диплоидните щамове. В проведените експериментални изследвания са идентифицирани и множество геномни промени, които

допринасят за BLM резистентност в третираните със зеоцин мутанти. Като цяло, тези проучвания предоставят нови прозрения за генотоксичността на BLM (Zheng et al, 2022).



Фигура 25. Механизъм на действие на блеомицините (Avendaño and Menéndez, 2015)

Доказано е, че зеоцинът има преоксидантен, мутагенен и канцерогенен ефект в *S. cerevisiae* (Todorova et al, 2015b). Полимеразите са от решаващо значение за жизнеспособността на третираните със зеоцин дрождени клетки при прилагане на по-високи дози. Потвърждава се, че множество геномни промени са свързани с повишена резистентност към зеоцин, предоставяйки нови данни за това как се развива устойчивостта към блеомицините в клетките (Zheng et al, 2022).

ОЦЕНКА НА ТОКСИКОЛОГИЧНОТО ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА ИЗБРАНИ ХИМИЧНИ ВЕЩЕСТВА ВЪРХУ ДРОЖДИТЕ

Приложимостта на дрождите *S. cerevisiae* за изследване токсикологичното действие на различни химични агенти се оценява чрез използване на набор от моделни съединения, намиращи широко приложение в медицинската и научно-изследователската практика, напр. H_2O_2 , менадион, ибупрофен и зеоцин. Както менадиона, така и H_2O_2 упражняват своето токсично действие посредством генерирането на оксидативен стрес. Това е процес, който води до появата на повреди в клетъчните мембрани, белтъците, както и в ДНК, което от своя страна може да доведе до индуциране на апоптоза и загуба на жизнеспособност (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Цитотоксичният механизъм на действие на менадиона е

свързан с широкото генериране на ROS, като супероксидни радикали, синглетен кислород и водороден пероксид, което обяснява и високо отчетената загуба на жизнеспособност при G₀ клетки, които се характеризират с висока вътреклетъчна концентрация на ROS ([Adusumilli et al, 2021](#)). От друга страна, H₂O₂ се очертава като основния редокс метаболит, който участва в сигнализирането и редокс регулацията, като е основният и най-разпространен първичен реактивен кислороден вид, образуван в еукариотните клетки като страничен продукт или дори целенасочено, от различни ензимни реакции ([Korovila et al, 2017](#)). Този факт обяснява и по-слабият ефект, упражняван от този агент върху клетъчната жизнеспособност на изследвания щам *S. cerevisiae* BY4741.

Ибупрофенът е относително безопасно лекарство, приложимо без рецепта; крие малък риск от някои свързани с възрастта патологии; няма данни, че ибупрофенът участва в процесите на стареене (напр. пътищата TOR), което от своя страна дава предпоставка и възможност за нови открития, касаещи специфичните му механизми на действие. Например, сред изследваните нестероидни противовъзпалителни средства, ибупрофенът води до намаляване риска от Алцхаймер (40 %), докато други лекарствени препарати от същата група като целекоксиб, нямат такъв ефект ([Vlad et al, 2008](#)). По подобен начин само ибупрофенът намалява риска от болестта на Паркинсон ([Gao et al, 2011](#)).

Все по-широкото разпространяващите се туморни образувания сред населението насочват вниманието към зеоцина, чийто молекулен механизъм се основава на свързване с ДНК на раковите клетки, което води до невъзможност за делене и растеж. Този механизъм предизвиква образуването на свободни радикали в човешкото тяло, които допълнително увреждат ДНК.

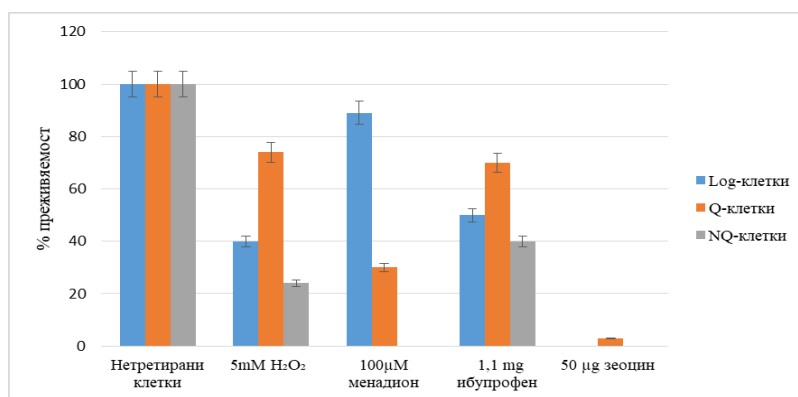
Ефектът на водороден пероксид, менадион, ибупрофен и зеоцин върху клетъчната преживяемост може да бъде проследен върху три типа дрождеви култури - пролифериращи, Q и NQ. Токсикологичното им въздействие се определя на базата на три ключови показателя: клетъчна преживяемост, цитотоксичност и генотоксичност.

КЛЕТЪЧНА ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Определянето на клетъчната преживяемост е един от най-често използваните методи при анализ на цито- или генотоксичност след въздействие с различни химични, физични или екзогенни фактори. Анализът на този

параметър е много важен и за промишлените процеси, при които се използват микроорганизми (Nikolova et al, 2000–2002). Количествената оценка на преживяемостта при дадени условия е сред най-широко използваните техники в микробиологията (Xu et al, 2014).

Токсичното действие на менадион, H_2O_2 , ибупрофен и зеоцин върху Log и G_0 клетки на *S. cerevisiae* BY4741 е изследвано посредством колониен анализ на хранителна среда с различни концентрации от тези химични вещества (Мариновска П, 2023). Определена е LD_{50} (доза, при която се наблюдава частично инхибиране на растежа) $100\mu M$ за менадион, 5 mM за H_2O_2 , 1.1 mg/ml за ибупрофен и 50 $\mu g/ml$ за зеоцин. На Фиг. 26 е представен процентът на преживелите клетки след третиране с определените LD_{50} за 1 час на стайна температура.



Фигура 26. Преживяемост на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с избрани химични агенти

Най-висок процент преживяемост след третиране с менадион е наблюдаван при клетките в експоненциална фаза на растеж (89%). При въздействие с H_2O_2 е отчетена най-висока преживяемост при Q клетките (74%), докато при тези в Log фаза жизнеспособността спада до 40%. Същевременно G_0 клетките показват ниска устойчивост към менадион – 30% преживели клетки. При NQ клетките се наблюдава 100% потискане на жизнеспособността след третиране с менадион, докато след излагане на действието на H_2O_2 преживяемостта е 24%, съответно около два и три пъти по-ниска от тази при Log и Q клетките. Тези ефекти вероятно са следствие от токсичния механизъм на действие на менадиона и H_2O_2 (Мариновска П, 2023).

Според проучвания на Aragon et al, 2008, след определен период на култивиране една част от NQ клетките губят способността си да се възпроизвеждат, а друга част претърпяват апоптоза и стават значително по-чувствителни на действието на различни токсични агенти. Установено е, че клетките в стационарна фаза се характеризират с нарастване на термостабилността, ниска метаболитна активност, намалена скорост на транскрипция и транслация, резистентност към приложен стрес, а също и слаба пропускливост на плазмената мембрана (Srivastava et al, 2016).

Клетъчният отговор към менадион е свързан със синтеза на голям брой белтъци, част от които са специфични и се образуват само при въздействие с този токсичен агент (Flattery-O'Brien et al, 1993). По-високата устойчивост на Log клетките, вероятно е свързана с повишената им метаболитна активност и по-висока скорост на белтъчна синтеза, което от своя страна осигурява по-добра адаптация към действието на менадион. Изследвайки токсичността на хиноновите производни към *S. cerevisiae* Rodrigues et al, 2004 наблюдават, че някои от тях, включително менадионът, упражняват токсичен ефект при наличие на кислород в средата. Счита се, че по-силната токсичност в кислородна среда вероятно отразява способността им да действат като катализатори при генерирането на ROS, което е вследствие от редокс-циклизиращата им активност. При клетки в покой е наблюдавана по-ниска консумация на енергия и съдържание на АДФ за реакции на фосфорилиране, което може да доведе до увеличаване на вътреклетъчните нива на кислород и едноелектронни кислородни редуктори. Такива условия могат да се появят и при хронологичното стареене на дрождевите клетки, когато те се развиват до късна стационарна фаза. Цитотоксичното действие на менадиона при G_0 е по-силно и вероятно се дължи на по-слабата метаболитна активност и по-високите нива на кислород в клетките (Rodrigues et al, 2004).

Скорошни проучвания относно ефекта на оксидативния стрес в дрождите *S. cerevisiae* показват, че когато растат аеробно те са чувствителни към милимоларни концентрации на менадион. Дрождите могат да придобият резистентност към този медикамент, ако предварително са третирани с ниски концентрации. Адаптацията към менадион се различава от тази към H_2O_2 и се блокира от циклохексимид (Flattery-O'Brien, 1993). Предварителното третиране на дрождевите клетки с H_2O_2 може да ги направи чувствителни към действието на

менадион. Предполага се, че тази чувствителност се дължи на намаляване нивата на вътреклетъчния глутатион (Jamieson, 1992). Антиоксидантната роля на глутатиона и ролята му за резистентността на *S. cerevisiae* към менадион чрез индукция на *GSH1* гена, кодиращ ензима гама-глутамил-цистеин синтетаза, е доказана в дрожди след третиране с менадион (Stephen et al, 1995).

Известно е, че генерирането на ROS може да представлява централен обединяващ механизъм, чрез който се медираат антинеопластичните ефекти на NSAIDs, като се има предвид, че оксидативният стрес е съчетан с много проапоптотични сигнали и активиране на MAP киназа (Adachi et al, 2007). NSAIDs, към които спада и ибупрофенът, могат да медираат апоптоза в клетките на пъпкуващите дрожди чрез генериране на ROS и чрез индуциране на оксидативен стрес (Farrugia and Balzan, 2013).

Зеоцинът притежава радиомиметични свойства, като има способността да индуцира единични (Miné-Hattab and Rothstein, 2013) и двойноверижни разриви (Todorova et al, 2015a) в молекулата на ДНК (Guénolé et al, 2013). Доказано е, че този препарат има прооксидативни, мутагенни и канцерогенни ефекти в *S. cerevisiae* (Todorova et al, 2015b). Въпреки наличието на дебела клетъчна стена при клетките в стационарна фаза, ниската скорост на транскрипция и трансляция, по-слабото действие на репарационните механизми, най-вероятно са основната причина за този пагубен ефект на антибиотика зеоцин върху Q клетките.

Микроорганизмите имат стратегии за оцеляване при промяна на условията на околната среда. Дрождевите клетки притежават различна устойчивост към токсични съединения в зависимост от фазата на клетъчния цикъл (Bayliak et al, 2006). Дори и неочаквано въздействие може да доведе до промяна в клетъчната функция, както и до спиране на растежа (Gasch and Washburne, 2002), като дрождите притежават способността да отговарят бързо на промени в условията на средата и да предотвратяват клетъчната апоптоза (Zheng et al, 2001).

ЦИТОТОКСИЧНОСТ

Цитотоксичността на избрани химични агенти може да се определи чрез проследяване нивата на индуцираните вътреклетъчни повреди (ROS, окислени белтъци, липиди и количество на общ глутатион).

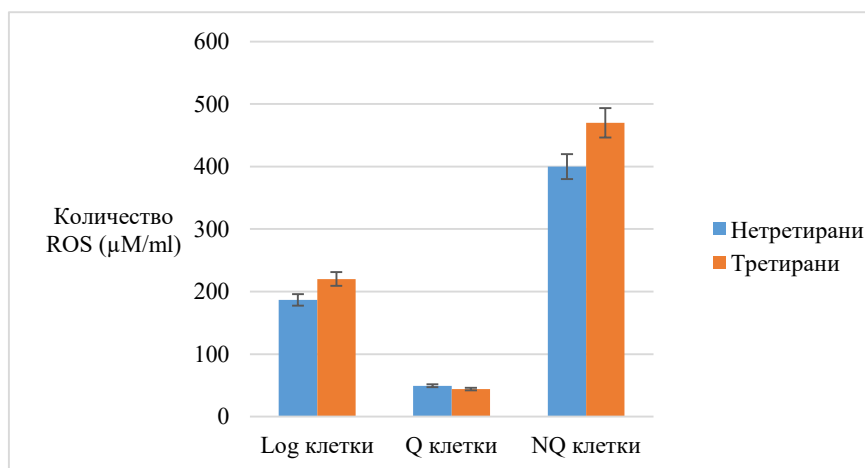
Водороден пероксид

Количество ROS

Всички еукариотни организми имат кислород-зависим метаболизъм, като тази молекула се съхранява през еволюцията като краен електронен акцептор в процеса на дишане (Davies, 1995). По време на този процес се продуцират цитотоксични ROS, някои от които представляват нестабилни молекули, съдържащи несдвоени електрони или свободни радикали. ROS се формират *in vivo*, основно в процеса на окислителното фосфорилиране по време на митохондриалното дишане. Когато нивата на ROS се увеличат драстично, оксидативният стрес причинява сериозни повреди на повечето макромолекули (липиди, белтъци и ДНК). От друга страна, въз основа на интензивността на приложения стрес, той може да се разглежда като полезен или вреден (Lushchak, 2014). Лекият стрес може да стимулира биологичните функции на организмите и да доведе до придобиване на устойчивост към високи дози от същия стресов агент (Calabrese, 2015). Това явление, известно още като хормезис, се наблюдава при различни организми, реагиращи на широк спектър от химични, физични и биологични стресови фактори.

Ефектът на оксидативен стрес върху три популации на S. cerevisiae BY4741 е проследен чрез третиране на клетъчни суспензии ($OD_{540}=1.0$) с 5mM H_2O_2 за 1 час на стайна температура. След отстраняване на стресовия агент, клетките са подложени на механично разрушаване и получените безклетъчни екстракти са използвани за установяване нивата на индуцираните от стреса вътреклетъчни повреди. Наблюдавана е 2 пъти по-висока концентрация на генерираните ROS в апоптозните NQ клетки (470 $\mu M/ml$), в сравнение с пролифериращите (220 $\mu M/ml$) (Фиг. 27). Не е установено генериране на допълнителни ROS при Q клетките, в сравнение с контролните клетки. Сходно увеличение на ROS се наблюдава и при активно делящите се клетки, което вероятно е свързано с техните характеристики: висока скорост на метаболизъм и невъзможност на антиоксидантната система да се справи с голямото количество генерирани ROS (Мариновска П, 2023).

Известно е, че Q клетките са по-устойчиви на стрес и могат да останат репродуктивно компетентни за по-дълъг период от време. Обратно, NQ клетките са силно чувствителни към топлинен и други видове стрес и бързо губят своята способност за репродукция (Davidson et al, 2011).

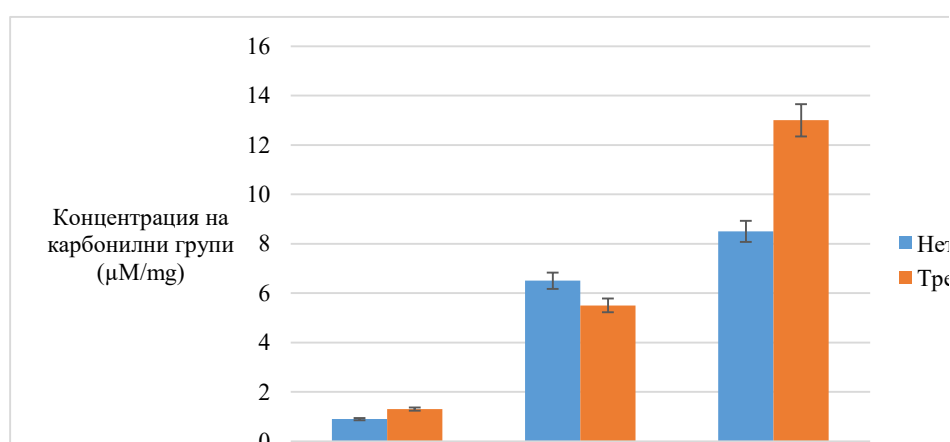


Фигура 27. Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 5mM H₂O₂

Нива на окислени белтъци

Окислението на протеини обикновено се случва на ниво специфични аминокиселинни остатъци. Напр., H₂O₂ окислява тиоловата група (-SH) на цистеинов (Cys) остатък, за да образува сулфени (-SOH), което може да доведе до образуване на дисулфидна връзка (-S-S-). Излишъкът от H₂O₂ може да генерира форми на цистеин сулфинова (-SO₂H) и сулфонова (-SO₃H) киселина. ROS могат също да окислят серния остатък на метионина, което води до превръщането му в метионин сулфоксид или метионин сулфон (Schieber and Chandel, 2014). Допълнително основното въздействие на H₂O₂ върху редокс регулацията се осъществява чрез тиол пероксидази и включва обратимо окисление на цистеина до сулфенилирани или дисулфидни форми. Средният процент на окисление на цистеиновите остатъци в протеома е между 5–12 % и може да се увеличи до 40 % след действие на оксиданти (Go and Jones, 2013). Въпреки това, поради тяхната нестабилност и относителната липса на методи за тяхното изследване, обхватът на редокс регулацията чрез цистеиново сулфенилиране все още е слабо разбран.

Влиянието на H_2O_2 върху еукариотни клетки е проследено чрез измерване нивата на окислени белтъци в *S. cerevisiae* BY4741 при въздействие с 5mM H_2O_2 (Мариновска П, 2023). Този тип протеиново карбонилиране е най-често срещаната ROS-индуцирана протеинова модификация, която се счита за необратима и индуцира разграждане на белтъците в клетката. В условията на експеримента NQ клетките показват 1.5 пъти по-висока концентрация на окислени белтъци при третиране с H_2O_2 (13 μ M/mg), в сравнение с контролните такива (8.5 μ M/mg) (Фиг. 28).



Фигура 28. Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 5mM H_2O_2

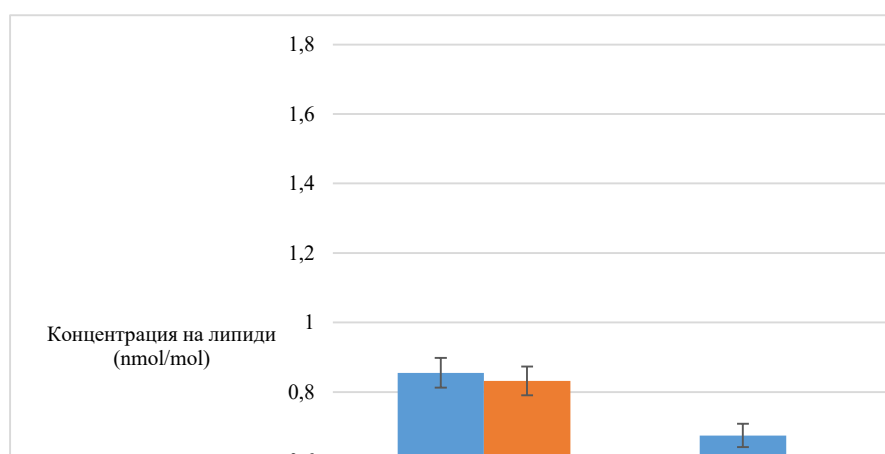
Навлизането на дрождевите клетки в началото на стационарната фаза води до повишаване на устойчивостта им към оксиданти като H_2O_2 (Izawa et al, 1996). Точните механизми на резистентност към окислителни не са изяснени, но се предполага, че тази повишена толерантност към стрес може да се дължи на дерепресия на отрицателния регулаторен ефект, упражняван от RAS-cAMP-РКА пътя върху експресията на гените, отговорни за стрес (Rolland et al, 2002). Друга причина може да е повишената експресия на гени, кодиращи антиоксидантни ензими, включително тези, отговорни за отстраняването на H_2O_2 от клетката (Jamieson, 1998).

Нива на окислени липиди

Оксидативният стрес е терминът, даден за условия, при които се наблюдава нарушаване на антиоксидантно-прооксидантния баланс в полза на втория. В такива условия някои ROS имат способността да реагират с

макромолекулите в клетката, причинявайки протеиново окисление и липидна пероксидация (Esterbauer et al, 1991). Ненаситените мастни ацилни групи в мембраните са основна мишена за хидроксилните радикали и супероксидните аниони и тази атака иницира автокаталитична липидна пероксидация, водеща до образуване на реактивни липидни радикали и липидни хидропероксиди (Gunstone, 1996). Разграждането на липидните хидропероксиди, от своя страна, води до генериране на голямо разнообразие от силно реактивни алдехиди (Levine, 2002).

В проучване на Мариновска П, 2023 токсичното действие на H_2O_2 върху дрождеви липиди е оценено чрез промяна във вътреклетъчните нива на техните окислени форми (Фиг. 29). При изследване на три клетъчни популации (Log, Q и NQ) на *S. cerevisiae* BY4741 не е установено повишаване на нивата спрямо контролните такива. В Q и NQ клетките са отчетени съответно 1.3 и 1.2 пъти по-ниски стойности на прекисно окислени липиди (0.573 nmol/mol и 1.31 nmol/mol), спрямо контролните клетки (0.675 nmol/mol и 1.57 nmol/mol). Наблюдаваните промени най-вероятно са вследствие от повишените нива на трехалоза в стационарните клетки, която ги предпазва от вредното влияние на H_2O_2 (Мариновска П, 2023).



Фигура 29. Нива на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H_2O_2

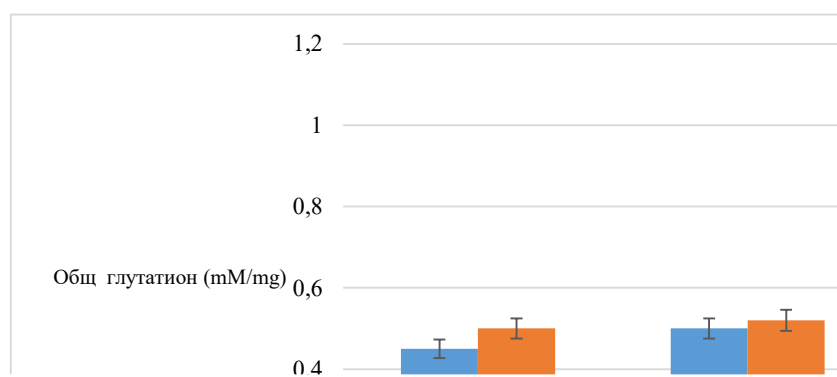
Дизахаридът трехалоза е способен да понижава *in vitro* скоростта на окисление на ненаситените мастни киселини и да предпазва липидите от оксидативно увреждане, причинено от H_2O_2 (Oku et al, 2003). Трехалозата се открива в много организми, като растения, насекоми и безгръбначни, както и еукариотни микроорганизми и бактерии, в които се натрупва значително при

неблагоприятни условия (Richards et al, 2002). Навлизането в стационарна фаза на растеж и в последствие в G_0 състояние на покой при дрожди се характеризира именно с повишаване нивата точно на този дизахарид. Всъщност устойчивостта към оксидативен стрес предизвиква сложен физиологичен отговор, който обхваща ензими като каталаза и супероксид дисмутаза, както и синтеза на редица защитни молекули (Finkel and Holbrook, 2000). Редица изследвания показват, че активно делящите се клетки на бозайници и дрожди, подложени на промяна в околната среда като температурни колебания и повишени нива на ROS, активират бързо широка гама от реакции, необходими за бързото им приспособяване към неблагоприятните условия на средата (Estruch, 2000).

Нива на тотален глутатион

Една от първите линии на защита в клетката при екзогенно въздействие с токсични агенти е активиране на експресията на трипептида глутатион (Dawes, 2004). Глутатионът (GSH), е повсеместно разпространен тиол, участващ в множество клетъчни процеси, включително транспорт на аминокиселини, синтез на протеини и нуклеинови киселини, модулиране на ензимната активност и метаболизъм на ксенобиотици, обезвреждане на канцерогени и реактивни кислородни видове.

Нивата на тотален вътреклетъчен глутатион при въздействие с 5mM H_2O_2 са изследвани в проучване на Мариновска П, 2023. Най-високи нива на този антиоксидант са установени в апоптозните NQ клетки (0.99 mM/mg), което вероятно представлява компенсаторен механизъм с цел преодоляване на силно нарушената хомеостаза (Фиг. 30). В останалите две клетъчни популации – Q и Log клетки, отчетените стойности са по-ниски (0.52 mM/mg и 0.5 mM/mg, съответно), като не се различават от тези, измерени при контролните дрождеви култури. Получените резултати корелират и с отчетената най-висока устойчивост при G_0 клетките, което предполага и липса на необходимост за по-висока експресия на този трипептид. Токсичната концентрация от 5mM H_2O_2 действа по-силно върху NQ клетките, в резултат на което при тях се отчита и високо ниво на генерирани ROS, окислени белтъци и липиди (Мариновска П, 2023).



Фигура 30. Количество общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 5mM H₂O₂

Значителни нива на окислително увреждане на протеини могат да бъдат открити в клетките след излагането им на ниски концентрации H₂O₂, както и в мутанти, дефицитни по GSH метаболизъм в отсъствието на екзогенни оксиданти (Poljak et al, 2003). Известно е, че при NQ клетките прилагането на високи дози H₂O₂ може да доведе до некротичен фенотип и индукция на апоптоза (Carmona-Gutierrez et al, 2010).

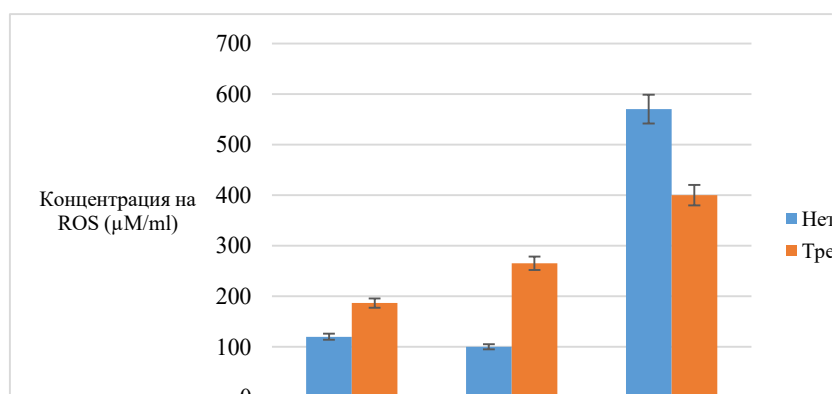
Менадион

Количество ROS

Увреждащите ефекти, упражнявани от ксенобиотиците (канцерогени, токсини, замърсители на околната среда и лекарства) се дължат както на физиологичните фактори и взаимодействия с околната среда, така и на специфичните генетични характеристики на организмите. Токсичността зависи не само от концентрацията на медикамента, но и от процесите, протичащи в клетката (Cascorbi, 2006). Менадионът индуцира клетъчна смърт чрез апоптоза и инхибира растежа на различни видове ракови клетки (Lee et al, 2016).

Ефектът на менадион върху три клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741 е проследен чрез третиране с LD₅₀ = 100μM менадион за 1 час на 25°C и последващо измерване нивата на генерираните ROS (Мариновска П, 2023). Установено е, че цитотоксичния ефект на менадиона в G₀ клетките е посилен (265 μM/ml) отколкото в Log клетките (186.6 μM/ml). При Log и Q клетките е налице 40% до 60% повишаване на нивата на токсични кислородни форми в клетката. В NQ дрождевата популация е наблюдаван

точно противоположен ефект на намаляване концентрацията на ROS (Фиг. 31).



Фигура 31. Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 при третиране със 100µM менадион

Известно е, че генерираната енергия в Q клетките е свързана с по-високи нива на кислород в клетките (Bonawitz et al, 2007). Според Fabrizio and Longo, 2008 клетките в покой се характеризират с по-ниска консумация на енергия и съдържание на АДФ, което може да доведе до повишени нива на вътреклетъчен кислород и едноелектронни кислородни редуктори. Този феномен вероятно се дължи на високия процент умиращи клетки в тази популация, за които добавянето на тосичен агент като менадиона е пагубно (Davidson et al, 2011).

Нива на окислени протеини

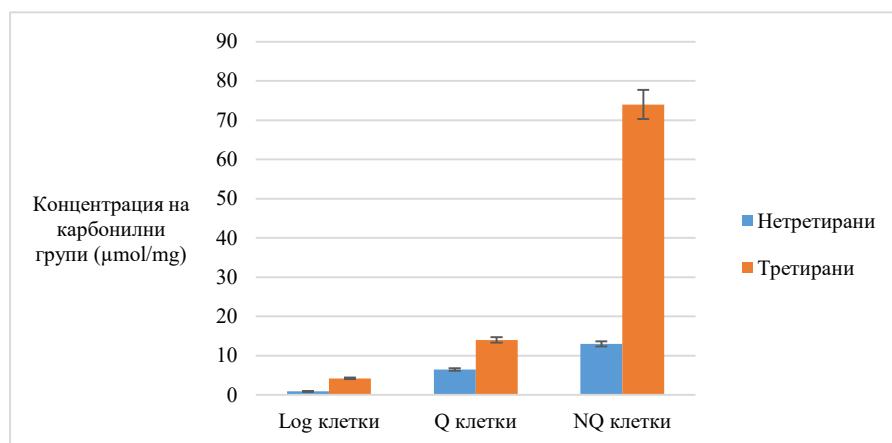
За разлика от H_2O_2 , който е директен оксидант, менадионът (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин K3) е прооксидантен медикамент. Цитотоксичността му е резултат от образуване на ROS при редокс циклизиране на семихинонови радикали, генерирани от ензимна едноелектронна редукция на менадион и от неговата електрофилна способност да реагира с тиоловите групи на протеините и GSH (Castro et al, 2008).

Оксидативният стрес обикновено се разглежда като състояние, при което генерирането на ROS в клетъчната система надвишава буферния капацитет на ендогенната антиоксидантна защита (Sies and Cadenas, 1985), което води до оксидативно увреждане на липиди, ДНК и протеини (Stadtman, 1992).

Сред методите за оценка на увреждането в клетъчните биомолекули, карбонилирането на протеини е най-широко използвано и служи като маркер за оксидативен стрес (Sorolla et al, 2008). Карбонилните модификации могат да бъдат

вследствие от голямо разнообразие ROS, както и от продукти на липидното окисление. Освен в използването им като биомаркери за оксидативен стрес, карбонилираните белтъци могат да функционират и като биологични сигнали (Wong et al, 2010) или да доведат до необратима загуба на протеинова функция (Sultana et al, 2010).

Въздействието на менадион върху различни клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741 е определено чрез измерване количество окислени протеини в описана по-горе експериментална постановка (Мариновска П, 2023). При NQ клетките е измерено най-високо количество окислени протеини – 74 $\mu\text{M}/\text{mg}$, вероятна причина за което е тяхната апоптозна природа. При Q клетките стойността на карбонилираните белтъци се увеличава двукратно и достига 14 $\mu\text{M}/\text{mg}$. Тази стойност е 3 пъти по-висока от измерената в Log клетките (4.2 $\mu\text{M}/\text{mg}$). Анализът на нивата на карбонилни групи в протеините на дрождевите култури показва около 7 пъти по-високи стойности в Q клетките, в сравнение с Log клетките (Фиг. 32). Този феномен вероятно е свързан с гладуването на клетките по време на стационарна фаза и дължащото се на този процес натрупване на карбонилирани протеини (Coliva et al, 2019).



Фигура 32. Нива на окислени белтъци в Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 100 μM менадион

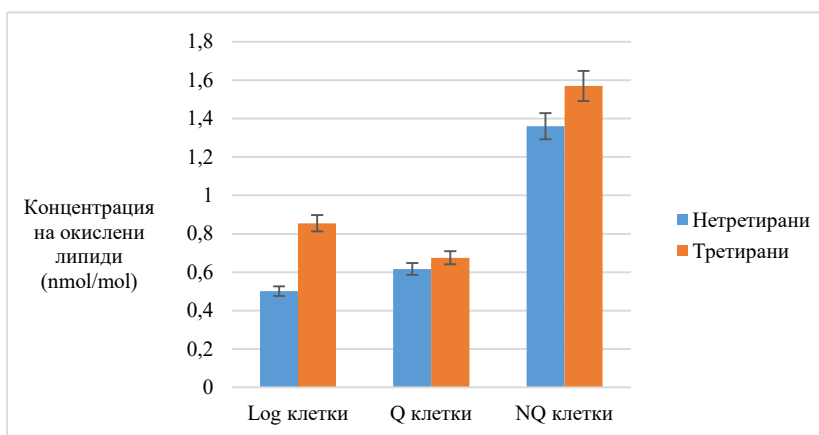
Нива на окислени липиди

Един от молекулните механизми, който води до увреждане и клетъчна смърт по време на оксидативен стрес, е атакуването на фосфолипидите в мембраните и свързаната с това липидна пероксидация (Scandalios, 2005).

Методът, използван за определяне нивата на окислени липиди се базира на количеството MDA (малоналдехид), който е краен продукт от окислението на липидите.

При третиране с менадион на щам *S. cerevisiae* BY4741 е установено, че нивата на MDA при Q и Log клетките са приблизително сходни (Фиг. 33). NQ клетките обаче показват значително по-високи концентрации на MDA. Най-значимата индукция на липидно окисление (около 2 пъти) е отчетена в Log клетките. Противоположно на резултатите от предходните експерименти, където клетките в експоненциална фаза показват по-висока устойчивост към действието на менадион, тук се наблюдават по-ниски нива на окислени липиди именно при Q клетките (Marinovska et al, 2022).

По данни от специализираната литература, по време на стационарна фаза в клетките на *S. cerevisiae* се натрупва голямо количество трехалоза, която в условия на оксидативен стрес предпазва липидите от окисление (Herdeiro et al, 2005).



Фигура 33. Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100μM менадион

Сравнително високите нива на MDA в NQ клетките най-вероятно са следствие от факта, че в голям процент от тях са активирани процесите за програмирана клетъчна смърт и съответните антиоксидантни защитни системи не са функционални (Мариновска П, 2023).

Нива на тотален глутатион

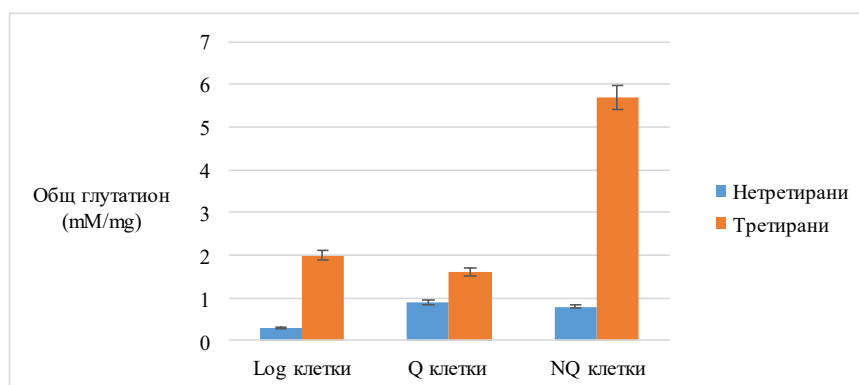
Излагането на еукариотните организми на високи дози менадион обикновено води до генериране на значителни вътреклетъчни увреждания.

Именно поради това той се подлага на детоксикация в клетката, която обикновено протича на три етапа. В етап I менадиона и подобните ксенобиотици се активират чрез реакции на окисление, редукция или хидроксилиране, включващи цитохром P450 ензими, които са отговорни за излагане на реактивни места и/или въвеждане на функционална група. При етап II, функционалната група е конюгирана с глутатион, глюкуронова киселина или глюкоза, ензимно или неензимно. По-специално, S-конюгатите на GSH се образуват от цитозолни ензими, наречени глутатион трансферази (GST). На етап III, GSH-конюгатите напускат цитозола с помощта на специфични ефлуксни помпи, принадлежащи към MRP (протеини, свързани с множествена лекарствена резистентност) подсемейство на ABC транспортери (Sharma et al, 2002). В дрождите е описано подобно семейство от протеини, наречено Ycf1.

Хиноните, към които спада и менадионът, са потенциални електрофили, които имат способността да реагират с тиоловите групи на белтъци и GSH. Всъщност генерирането на GS-конюгати, катализирано от изоформи на GST с изчерпване на GSH, е свързано с индуцираната от менадиона цитотоксичност и оксидативен стрес (Rodriguez et al, 2004).

В тази насока е проведен експеримент, целящ измерване нивата на тотален глутатион в три клетъчни популации на S. cerevisiae BY4741 при третиране с токсична концентрация от 100µM/ml менадион. Установено е, че концентрацията на GSH в нетретираните Q клетки е 3 пъти по-висока от тази в Log клетките (Фиг.34). Интересно е, че третирането с менадион на дрождите в G₀ състояние не води до значително повишаване на базовите нива на GSH в клетките. Концентрацията му се увеличава не повече от двукратно в резултат на излагането на този токсичен агент. В същото време, при Log клетките се наблюдават близо 7 пъти по-високи нива на GSH (2 mM/mg), в сравнение с контролните такива (0.3 mM/mg). Драматичен ръст в нивата на тоталния глутатион е отчетен и в NQ клетките (5.7 mM/mg).

Получените резултати вероятно се дължат на факта, че Log и част от NQ клетките, които притежават способността да се размножават, успяват успешно да индуцират повишена експресия на ензимите, отговорни за биосинтеза на глутатион (Gsh1 и Gsh2). Противоположно на тях, за метаболитно неактивните G₀ клетки, ефективността на биосинтеза на глутатион е значително по-слаба (Мариновска П, 2023).



Фигура 34. Нива на общ глутатион в Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 100μM менадион

Ибупрофен

Изследването на влиянието на ибупрофена върху дрождевите клетъчни популации е интересно поради няколко причини. Първо, това е относително безопасно лекарство, за което не е необходима рецепта. Второ, ибупрофенът може да бъде свързан с намален риск от някои свързани с възрастта патологии. Трето, независимо от наблюдавания ефект върху репликативния цикъл, до момента няма данни, че ибупрофенът е насочен към някой от известните пътища на стареене.

Подобно на други представители от тази група, ибупрофенът има аналгетично и антипиретично действие. Тези въздействия произтичат от добре установената роля на ибупрофена като инхибитор на циклооксигеназата, който пречи на биосинтезата на простагландин ([Rome and Lands, 1975](#)). Дългосрочната употреба на ибупрофен намалява с повече от 30% риска от болести като Алцхаймер ([Vlad et al, 2008](#)) и Паркинсон ([Gao et al, 2011](#)). Малко вероятно е обаче тези благоприятни резултати да се дължат единствено на противовъзпалителната роля на ибупрофена, тъй като те не са наблюдавани при други NSAIDs. До момента няма точни и достатъчно експериментални данни, показващи продължителността на живот при организмите след употреба на ибупрофен.

В сравнение с бозайниците, в дрождите няма циклооксигеназни ензими ([Simmons et al, 2004](#)), следователно ибупрофенът повлиява клетките им чрез неизвестни нецелелеви механизми. Сред възможните такива е и дестабилизацията

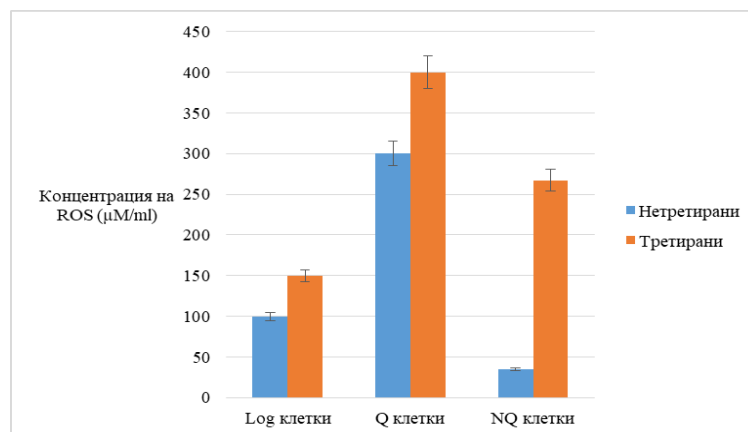
на триптофановия транспортер, което възпрепятства усвояването на ароматни аминокиселини. Третираните с ибупрофен дрожди се характеризират с по-малък размер, ниска скорост на клетъчно делене и респективно удължаване на репликативния жизнен цикъл (He et al, 2014). Публикуваните експериментални данни, касаещи влиянието на ибупрофена върху дрождеви клетки са относително малко.

Количество ROS

Действието на ибупрофена е оценено чрез изследване нивото на вътреклетъчни повреди в Q, NQ и Log клетки на S. Cerevisiae BY4741 при третиране с 1.1mg/ml ибупрофен (Мариновска П, 2023). Установено е, че в тази концентрация препаратът инхибира 30% до 60% от растежа на трите типа дрождеви популации, като клетките в експоненциална фаза на растеж показват само 1.5 пъти по-високи нива на ROS (150µM/ml) спрямо контролните нетретиранни клетки (100µM/ml) (Фиг. 35). Тъй като NQ клетките се характеризират с бърза загуба на жизнеспособност, не е изненадващо наблюдаваното драстичното повишаване на ROS след третиране с този токсичен агент – близо 8 пъти по-високи стойности (267 µM/ml) спрямо контролните клетки (35 µM/ml) (Мариновска П, 2023).

Според някои публикации причината е в нарушен метаболизъм на клетките, вследствие инхибиране действието на специфична триптофан пермеаза (Tat2) и невъзможност за пълноценно усвояване на хранителни вещества (He et al, 2014).

Метаболитният дисбаланс, възникващ при гладуване на клетките, се отразява и в повишаване количеството на ROS. Изследването на ефектите на NSAIDs при бозайници показва, че тези агенти могат да индуцират повишаване на вътреклетъчните нива на ROS и в техните клетки (Klaunig and Kamendulis, 2004). Същевременно при дрожди информацията е оскъдна, но е потвърдено, че ибупрофенът инхибира приема на ароматни аминокиселини с последващо понижаване на нивата им в клетката (Chong et al, 2014).



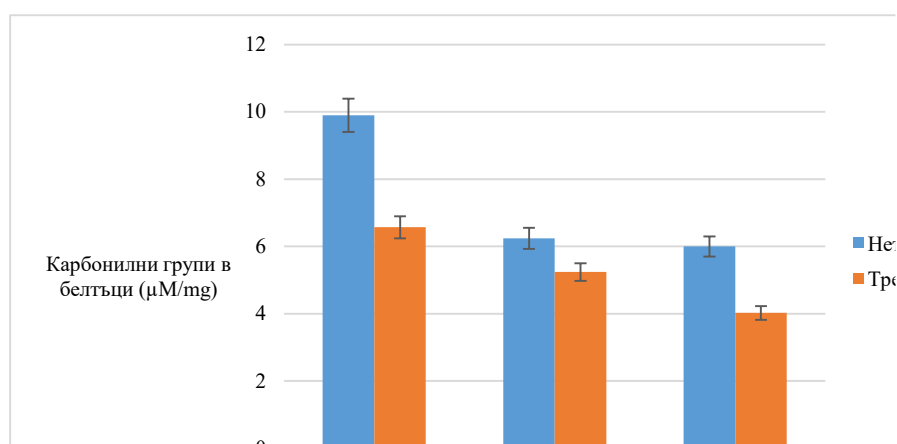
Фигура 35. Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

Van Leeuwen et al, 2011 наблюдават редуциране на клетъчния растеж и жизненост на *S. cerevisiae* след третиране с диклофенак и последваща митохондриална дисфункция, свързана с инхибиране на електрон-транспортните вериги, по-точно на протеини Rip1p от комплекс III и Cox9p от комплекс IV. Това води до инхибиране на клетъчното дишане и последващо генериране на ROS и клетъчна смърт. Инхибиране на клетъчното дишане, индуцирано от аспирин, е наблюдавано в MnSOD-дефицитни дрождеви клетки, култивирани на среда с етанол (Sapienza et al, 2008). Авторите установяват, че аспиринът води до проапоптичното генериране на митохондриални супероксид радикали в тези клетки.

Окислени белтъци

Нагрупването на окислени протеини в клетката е друг показател, изследван при третиране с ибупрофен (Мариновска П, 2023). Въпреки наблюдаваното повишаване на ROS в Log, G_0 и NQ клетките на *S. cerevisiae* BY4741, не са установени промени в съдържанието на карбонилни групи в белтъците, което подчертава липсата на значителен токсичен ефект след прилагането му върху клетката (Фиг.36). Това е съединението, което има най-слаб токсичен ефект върху дрождевите клетки.

По литературни данни, употребата на противовъзпалителното лекарство ибупрофен се характеризира с понижен риск от възникване на клетъчна патология (Chong et al, 2014).



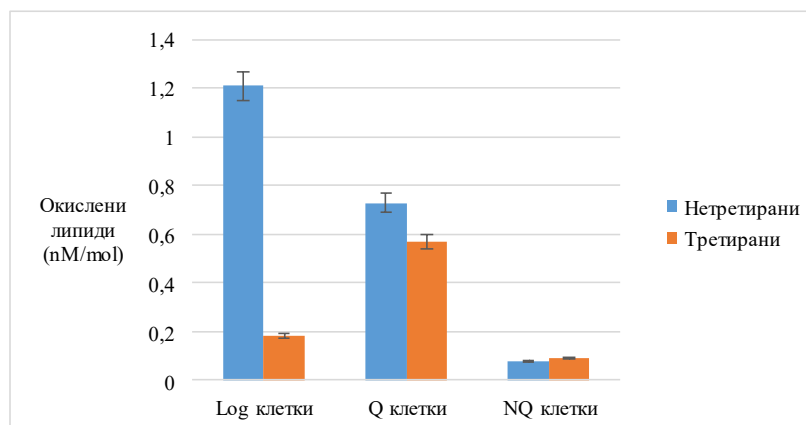
Фигура 36. Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

Протеиновото окисление може да доведе до конформационни промени, свързани с намаляване на активността когато целевите аминокиселини са в близост до активните центрове. Към аминокиселините със способност да се окисляват се отнасят триптофан, тирозин, лизин, аргинин и пролин. Хистидинът, цистеинът и метионинът също са силно податливи на окисление (Mirzaei and Regnier, 2006). Ето защо, изучаването на дрождите на белтъчно ниво има важно значение относно идентификацията на специфично окислени белтъци, което предоставя нови насоки в изследването на редокс-регулираните физиологични процеси и механизмите на цитотоксичност на различни лекарствени препарати (Costa et al, 2007).

Окислени липиди

Излагането на три клетъчни типа на *S. cerevisiae* BY4741 на LD_{50} концентрация на ибупрофен показва липса на увреждащ ефект върху клетъчните мембрани и даже наличие на протектиращ такъв (Мариновска П, 2023). При клетките в експоненциална фаза на развитие се наблюдава близо 7 пъти по-ниска концентрация на окислени липиди спрямо контролните клетки. От друга страна, при клетките в G_0 състояние е налице 1.3 по-ниска стойност на третираните клетки спрямо контролните (Фиг. 37).

Установено е, че добавянето на 0.2 mM ибупрофен води до значително удължаване на репликативната продължителност на живота при *S. cerevisiae* BY4742, което още веднъж потвърждава до определена степен благоприятния ефект на това нестероидно противовъзпалително средство върху дрождевите клетъчни мембрани (Chong et al, 2014).

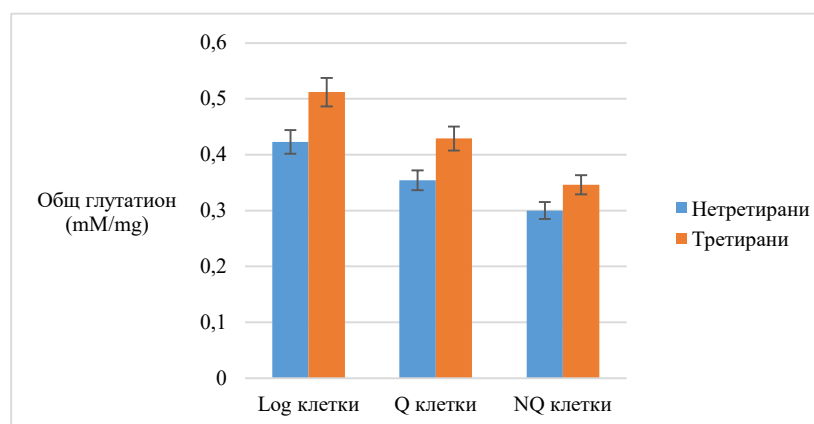


Фигура 37. Количество окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

Тотален глутатион

По литературни данни, третирането на клетки на бозайници с NSAIDs води до повишаване нивата на глутатион-S-трансферазата, която е важен компонент от глутатионовия метаболизъм в клетката и играе ключова роля в детоксикацията на различни ксенобиотици (Hayes and Pulford, 1995).

Установено е, че при третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен нивото на общия глутатион се повишава с около 20 – 30% (Фиг. 38), което корелира с увеличената концентрация на ROS в клетките (Мариновска П, 2023).



Фигура 38. Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

Напълно очаквано, повишените нива на GSH са признак за наличие на окислителни процеси в клетката, но в сравнение с останалите токсични агенти ибупрофенът има най-слаб, пренебрежим токсичен ефект, което е в съответствие и с по-слабото повишаване нивата на глутатион.

Зеоцин

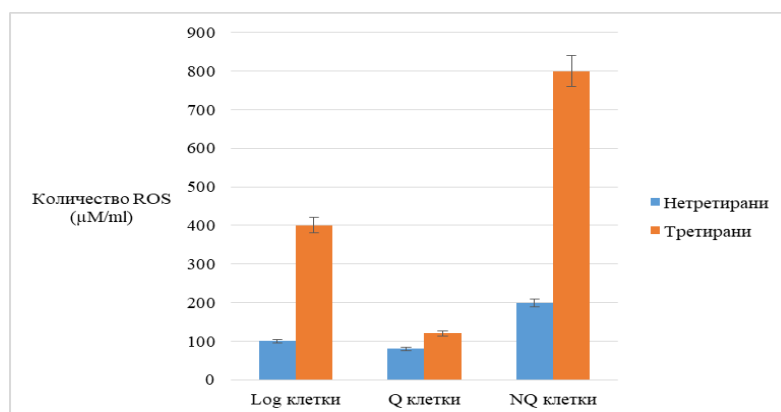
Двойноверижните разриви в молекулата на ДНК са най-критичните повреди, причинени от йонизираща радиация или радиомиметици. Един от генотоксичните агенти, основен източник на двойноверижни разриви е зеоцинът, препарат от групата на блеомицините (Todorova et al, 2019). Делецията на една база и заместването на Т с G при 5'-GT-3' мотива представят най-ясна картина за индуцирани от зеоцин мутации. Това е главно резултат от транслезионен синтез на ДНК, включващ Rev1 и полимераза ζ . Излагането на дрождеви клетки на действието на зеоцин води до честа загуба на хетерозиготност и хромозомни пренареждания в диплоидните щамове (Zheng et al, 2022).

Широката употреба на зеоцина както в биотехнологичната практика, така и в редица научни изследвания е важна предпоставка за провеждането на по-задълбочено изследване механизмите на неговото токсично действие. Влиянието на този токсичен агент върху нивото на вътреклетъчни повреди в зависимост от фазата на клетъчния цикъл е проучено върху дрождите *S. cerevisiae* като моделна система.

Количество ROS

Резултатите за натрупаните ROS в Log, Q и NQ клетъчни популации на S. cerevisiae BY4741 при въздействие с 50 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин са в съответствие с данните за преживяемостта на дрождевите микроорганизми (Мариновска П, 2023). При клетките в експоненциална фаза на растеж се наблюдават 4-кратно по-високи нива на ROS (400 $\mu\text{M/ml}$), в сравнение с контролните култури (100 $\mu\text{M/ml}$) (Фиг. 39). Причината за този скок в нивата на окисление най-вероятно е вследствие от високата скорост на транскрипция и трансляция при активно делящите се клетки, което води до по-често генериране на мутации и невъзможност на репарационните системи да се справят с възникналите повреди. Тази тенденция се запазва и при Q клетките, но там нивата на генерирани кислородни радикали са едва 1.5 пъти по-високи (120 $\mu\text{M/ml}$) спрямо контролата (80 $\mu\text{M/ml}$). Апоптозните NQ клетки показват най-слаба преживяемост и съответно излагането на действието на зеоцин води до формиране на 4 пъти по-висока концентрация на ROS (800 $\mu\text{M/ml}$) в сравнение с контролата (200 $\mu\text{M/ml}$) (Мариновска П, 2023).

В изследвания със *S. cerevisiae* и *S. pombe* е показано, че ДНК повредите или индукцията на мутации, генерирани по време на репликация могат да доведат до ускорена апоптоза (Marchetti et al, 2006), което от своя страна е свързано с натрупване на ROS. Окислителните изменения, възникващи в клетките в резултат на тези процеси, водят до генериране на повреди в основни клетъчни биомолекули като белтъци и липиди (Perrone et al, 2008).

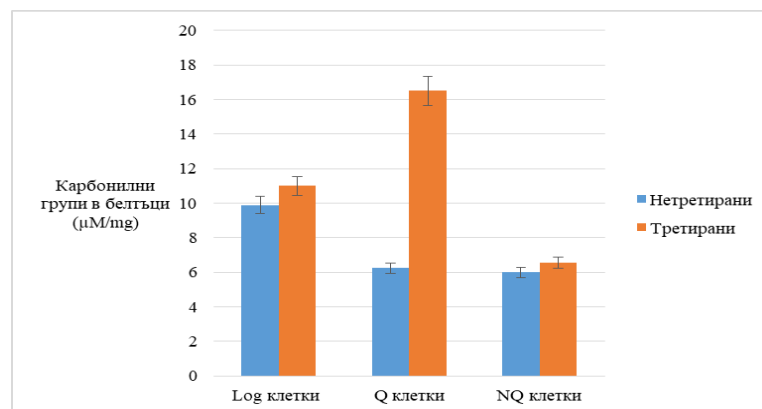


Фигура 39. Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 50 µg/ml зеоцин

Окислени белтъци

Директен показател за промени в редокс-баланса след излагане на зеоцин е появата на карбонилни групи в белтъците. Окислителното им увреждане засяга процесите, поддържащи клетъчната хомеостаза, което компрометира клетъчната жизнеспособност (Farrugia and Balzan, 2012). Окислителното увреждане на протеините под действието на блеомицините води до множество продукти, произтичащи от модификацията на широка гама аминокиселини. Те включват увреждане на сярна-съдържащи, ароматни и алифатни аминокиселини (Pietzsch, 2000). Протеиновите карбонилати представляват необратима форма на протеинова модификация. Доказано е, че те са относително стабилни за разлика от продуктите на липидната пероксидация, които се отстраняват в рамките на минути (Grune et al, 1996).

След третиране на *S. cerevisiae* BY4741 със зеоцин се наблюдават повишени окислителни модификации в белтъците при Q-клетките (Мариновска П, 2023). В NQ клетки количеството на карбонилираните протеини е сравнимо с това в контролните клетки, съответно 6.56 и 6.06 µM/mg (Фиг. 40).



Фигура 40. Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 50µg/ml зеоцин

Тъй като Q-клетките се характеризират с много ниски метаболитни нива и по-ниска способност да поправят увредени молекули, получените резултати не са изненадващи. Това може да се дължи и на координираните токсични ефекти на зеоцина и стреса, причинен от липсата на хранителни вещества в околната среда. При NQ клетките появата на окислени протеини е по-скоро следствие от физиологичното състояние на клетъчната популация, а не пряк резултат от индуцирания от зеоцин оксидативен стрес.

При активно делящите се дрождеви микроорганизми, повишаването на нивото на окислени протеини е пренебрежимо малко, вероятно дължащо се на активно функциониращата убиквитинова система и бързото отстраняване на увредените молекули от клетката (Zhou et al, 2020).

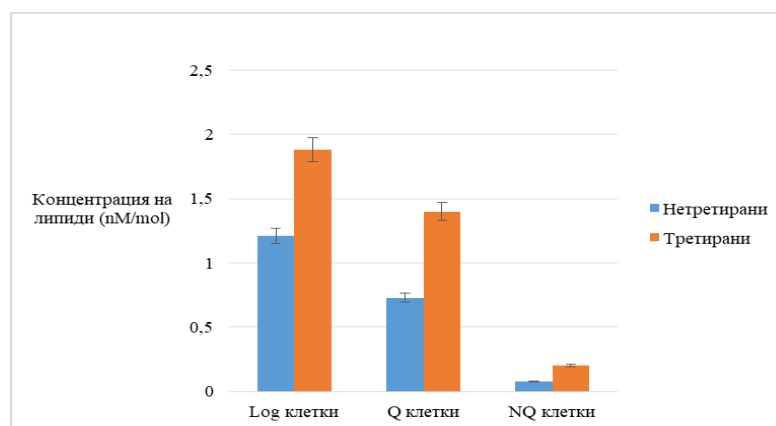
Друг важен показател, сигнализиращ за нарушаване на клетъчната хомеостаза от увреждащото действие на зеоцин, е повишаване нивата на перекисно окислени липиди.

Окислени липиди

В проучване на П. Мариновска, 2023 са установени по-високи нива на окислени липиди в Log клетките на *S. cerevisiae* BY4741 в сравнение с тези в Q и NQ клетките (Фиг. 41).

Измерената по-висока вътреклетъчна концентрация на малоналдеhid в третиране със зеоцин клетъчни популации потвърждава, че един от цитотоксичните ефекти на този препарат е свързан с индуцирането на оксидативен стрес в клетката. Това води до увреждане на мембранната функционалност и пропускливост, причинявайки вероятно освобождаване на

вътреклетъчното съдържание (Hodges et al, 1999). Очевидно, когато метаболитната активност на клетката е по-висока и транспортът през мембраната е динамичен, клетките на дрождите са по-уязвими към действието на ксенобиотиците, включително и на зеоцина.



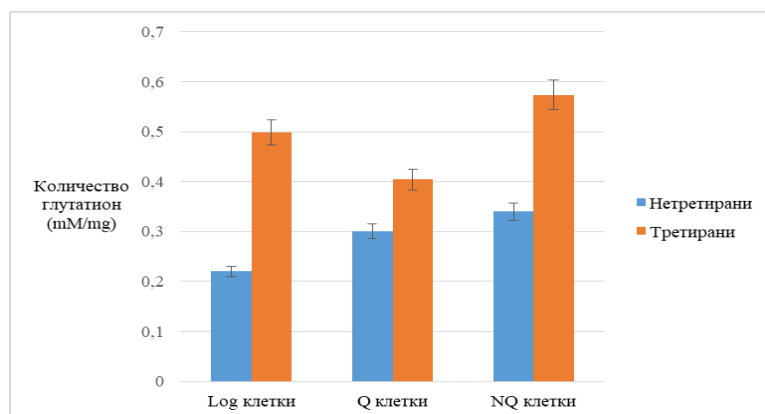
Фигура 41. Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 50 µg/ml зеоцин

Количество глутатион

Известно е, че глутатионът е най-разпространената неензимна защитна система в живите организми. Според много изследователи, GSH играе важна роля в отговора на дрождите към оксидативен стрес, и по-специално в обезвреждането на ROOH като ендогенни липидни хидропероксиди (LOOH), генерирани в биологичните мембрани от ненаситени мастни киселини (OIV, 2015). За да се предотврати небалансираното натрупване на ROS и последователни клетъчни увреждания, клетките на дрождите реагират със специфична индукция както на неензимни, така и на ензимни антиоксидантни защитни механизми (Marinovska et al, 2022). Основната молекула, действаща срещу окислителни повреди, е глутатионът. Общото вътреклетъчно количество на този трипептид е важен параметър за измерване на нивата на оксидативно увреждане.

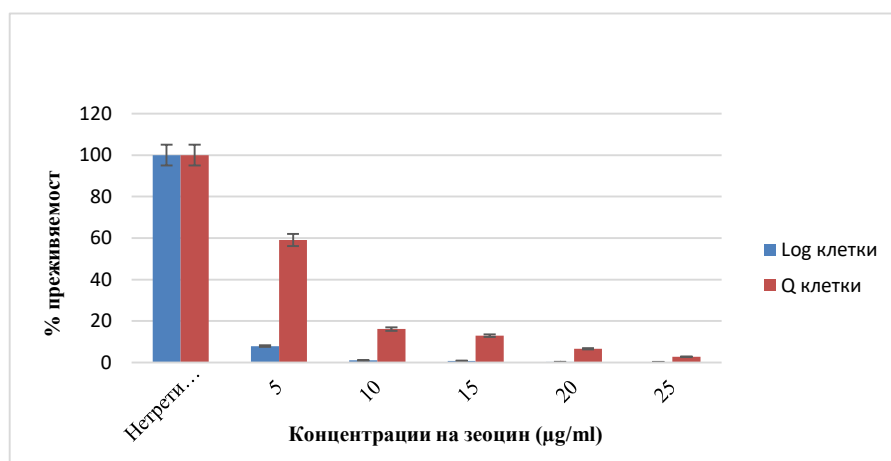
При излагане на зеоцин се наблюдават повишени вътреклетъчни нива на глутатион в дрождевите популации, като най-високи стойности са установени при логаритмично растящи клетки (2.5кратно увеличение), където и нивото на нарушени липиди е най-високо (Мариновска П, 2023). При клетките в G₀ състояние се отчита индукция на биосинтеза на глутатион, но тя е само с около 30% по-висока. При апоптозните NQ клетки също са налице високи концентрации на глутатион (Фиг. 42).

Тези данни корелират с наблюдаваната тенденция за вътреклетъчните ROS. При апоптозните NQ клетки високи нива на глутатион, вероятно са свързани с излишните нива на вътреклетъчни ROS като цяло (Aragon et al, 2008).



Фигура 42. Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 50 µg/ml зеоцин

Във връзка с токсичния ефект на зеоцина, както и широката употреба на препарати от групата на блеомицините, са проведени допълнителни изследвания върху токсичността чрез проследяване преживяемостта на две дрождеви клетъчни популации (активно делиращи се и в състояние на покой) след третиране за 1 час с по-ниски от установената LD_{50} доза на зеоцин (5, 10, 15, 20, 25 µg/ml) (Мариновска П, 2023).

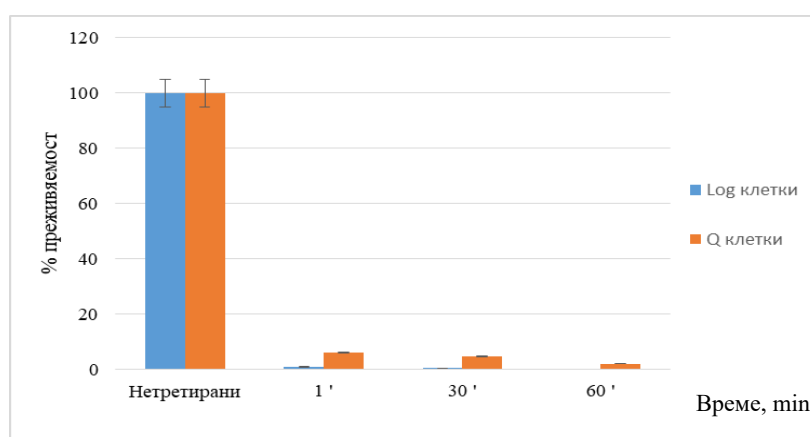


Фигура 43. Преживяемост при Log и Q клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с различни концентрации зеоцин

Наблюдава се намаляване на преживяемостта на дрождевите микроорганизми след увеличаване концентрацията на този токсичен агент, като при Q клетките се запазва сравнително по-висока устойчивост в сравнение с намиращите се в експоненциална фаза на растеж клетки (**Фиг. 43**). Този факт е свързан с един от специфичните механизми на действие на зеоцина – нарушаване структурата на клетъчната ДНК. G₀ клетките от своя страна се характеризират с наличието на кондензирани хромозоми (Pinon, 1978), които правят молекулата на ДНК по-добре защитена от токсичното влияние на редица екзогенно добавени стресови агенти, включително и на зеоцин.

Устойчивостта на двете дрождеви популации е проследена при прилагане на LD₅₀ = 50 µg/ml зеоцин за различни периоди от време (1, 30 и 60 минути) (Мариновска П, 2023). Установен е рязък спад на преживяемостта след третиране дори и за 1 минута, като Q клетките отново показват значително по-висока устойчивост (**Фиг. 44**). Тези данни още веднъж подчертават изключително силния токсичен ефект на зеоцина, което представлява важна информация от медико-биологична гледна точка.

Метаболитно неактивните еукариотни клетки, намиращи се в G₀ клетъчен цикъл, са много по-слабо податливи на действието на гликопептидните препарати, които имат способността да причиняват едно- или двойноверижни разриви в молекулата на ДНК и в клиничната практика се използват като антитуморни агенти.



Фигура 44. Преживяемост при Log и Q клетки на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с 50µg/ml зеоцин за различно време

Стресов отговор при дрождите *S. cerevisiae*

Как отговарят дрождевите клетки на постоянните въздействия от околната среда? Оказва се, че тези микроорганизми се характеризират с бърза молекулна реакция към настъпващите промени. Различни изследвания показват, че дрождевите организми притежават разнообразни механизми, които им позволяват бързо да реагират на вредни въздействия, дори и в условия на много ниски концентрации на токсични агенти. Един такъв механизъм е стохастичният процес на пренареждане на гените (стохастично превключване), който стимулира определени клетки от популацията да станат резистентни към ефекта на вредния фактор от околната среда. Друг вид адаптация е адаптивната устойчивост, появяваща се като следствие от активирането на специфична програма за стресов отговор. При дрождите функционират различни такива механизми, сред които различаваме стресов отговор към външни фактори на средата (ESR), предизвикан от много и различни изменения в околната среда и известен още като общ стресов отговор (CER). Съществуват и множество механизми, специфични за конкретни стресови фактори ([Causton et al, 2001](#)). ESR представлява метаболитна програма, свързана с активността на два хомоложни транскрипционни фактора, Msn2p и Msn4p (наричани Msn2p/Msn4p), които са общи за много различни видове екологичен стрес. Тази програма се характеризира с инхибиране експресията на голям набор от гени, чиито продукти са свързани с растежа на клетките, и активиране на гени, контролиращи процесите на протеолиза, възстановяване на увредените протеини, предотвратяване на окислителното увреждане и реорганизацията на клетъчните структури. Включването на тези защитни механизми осигурява поддържането на метаболитната хомеостаза в клетката. В тези условия се активират и гени, продуктите на които позволяват икономично използване на наличните въглеродни и енергийни източници или използване на алтернативни източници на въглерод ([Chen et al, 2003](#)).

Реакцията към конкретен фактор от околната среда е уникална, тъй като се състои от елементи както от специфичния, така и от ESR. В дрождевите митохондрии, например са идентифицирани елементи на стресов отговор, характерни и за бактериални клетки, които се явяват медиатори на строгия стресов отговор (гуанозин тетрафосфат (ppGpp) и гуанозин пентафосфат

(pppGpp). Активирането на тези процеси може допълнително да повлияе на фенотипа на дрождевата клетка в условия на стрес ([Hamagishi et al, 1981](#)). Изследвания на [Ochi et al, 2012](#) потвърждават, че (p) ppGpp в дрождевите клетки могат да регулират експресията на няколко гена, включително гени, отговарящи при стрес. Въпреки че при дрождите не е наблюдавана активност на ppGpp-синтезиращ ензим, продукцията на този уникален нуклеотид в цитозола на клетката, вследствие експресията на хетероложен ген Sj-RSH от халофилното растение *Suaeda japonica* (хомолог на бактериалния ген *SpoT/RelA*, кодиращ ppGpp синтетаза), успява да осигури устойчивост към различни видове стрес, като осмотичен стрес, както и такъв, породен от етанол, водороден пероксид, висока температура и замръзване. По този начин, освен системите за стресов отговор, специфични за еукариотите, дрождевите клетки могат да имат и латентна консервативна система, аналогична на тази при прокариоти, в която ppGpp е молекула медиатор.

Предходни проучвания показват, че голям набор от дрождеви гени (около 900) показват подобен драстичен отговор към голямо разнообразие от промени в околната среда, включително температурен шок, водороден пероксид, менадион, диамид, дитиотреитол, хипер- или хипоосмотичен шок, лимитация по аминокиселини, изчерпване на азотен източник и преминаване в стационарна фаза ([Gasch et al, 2000](#)). Проведени са и много наблюдения върху глобалните ефекти на голямо разнообразие от лекарствени препарати върху генната експресия. В повече от 27 е направено паралелно сравнение (т.е. контролни клетки срещу изложени на стрес клетки), като в някои случаи провежданите експерименти за дълги периоди от време. Въпреки че в тези проучвания е събрана много ценна информация, хетерогенността в последващите протоколи изключва просто сравнение между различните лекарствени реакции. По-специално е изключително трудно да се идентифицират различните регулаторни мрежи и да се установят техните хронологични връзки. Въпреки това подобни подходи са особено ценен източник на информация, в случай на анализ на клетъчния цикъл ([Pramila et al, 2002](#)); те обаче са по-малко подходящи за описание на хронологията на транскрипционните събития в случай на стресов отговор. Това вероятно се дължи на естествената сложност на геномния отговор, който трябва да се справи с голямо разнообразие от химични фактори.

При *S. cerevisiae* съществува голямо разнообразие от общи транскрипционни фактори като Yap1 или Msn2/Msn4, както и по-специализирани фактори като семейство Pdr, които предлагат широк спектър от геномни отговори към новите условия на околната среда. Yap1 е по-известен с ролята си в регулирането на транскрипционния отговор при оксидативен стрес (Moye-Rowley, 2003). В този контекст Yap1 активира две групи гени, i) кодиращи H_2O_2 и ROS - обезвреждащи ензими (*SOD1-2*, *CTT1*, *TSA1* и др.) и ii) редокс активни съединения, които поддържат цитозола в редуциран вид чрез НАДФН (*TRR1-2*, *GLR1*, *GRX1* и др.).

Редица изследователи твърдят, че ключова роля играе тиоловата пероксидаза Grx3, която е необходима за образуването на дисулфиден мост между N- и C-крайния цистеинов регион (с-CRD) на Yap1 фактора в присъствието на H_2O_2 . Тази модифицирана форма на Yap1, освободена от Crm1p – медиран ядрен експорт, се натрупва в ядрото и може да активира съответните репортерни гени (Delaunay, 2002). В допълнение, Yap1 може да регулира отговора на дрождите към действието на някои химични вещества и токсични метали (Wemmie et al, 1997). Също така е наблюдавано, че Yap1 разграничава оксидативен стрес, предизвикан от окислителния агент H_2O_2 и химичен стрес, предизвикан от диамид. Реакцията при оксидативен стрес, генериран от менадион или синглетен кислород, включва бързо активиране на група от специфични гени, медирано също от транскрипционен фактор Yap1p и/или Skn7p. Продуктите на тези гени са отговорни за детоксикацията на формираните супероксидни радикали (супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза 3 и антиоксиданти, специфични за тиоловите групи). При тези условия също се активират гени, чиито продукти участват в окислително-редукционни реакции (Brombacher et al, 2006).

При специфичният отговор на стресови въздействия се активират специфични пътища за определения тип стрес. Тук се включва активирането на специфични защитни и възстановяващи механизми, чийто краен ефект е устойчивост на същите фактори на стрес. Пример за специфичен отговор е индуциране синтезата на шаперони (Hsp), които улесняват нагъването на други протеини, в условия на топлинен шок. Реакциите на 28 различни нагъвания, зависими от Hsp активността, изискват присъствието на АТФ. Намаляването на нивото на АТФ обикновено води до повишена експресия на гени, чиито продукти

участват в процесите за генериране на енергия (Hardie, 1999). Посредник на специфичния отговор при топлинен шок е транскрипционният фактор на топлинния шок - Hsf1p-протеин, консервативен при дрожди и човек.

Специфичният отговор при повишено външно осмотично налягане включва активиране на транскрипционния фактор Smp1p, медиран от протеин кинази (МАРК), участващи в пътя на високо-осмоларния глицерол (HOG). Този път играе значителна роля за регулирането на активността на редица гени, чиито продукти са необходими на клетките, за да се адаптират към условията на хипер- или хипоосмотична среда (De Nadal et al, 2003). Наред с това, изчерпването на глюкозата, която е предпочитан въглероден и енергиен източник за дрождите, води до дерепресия синтезата на специфични ензими, които позволяват растежа на дрождевите клетки върху алтернативни субстрати, като етанол или глицерол (Boy-Marcotte et al, 1998).

Във всички случаи, ранният стадий на стресов отговор включва промяна в активността на вече съществуващи ензими и подготовка на клетките за синтеза на нови протеини, т.е. възприемане на стресов стимул и активиране на пътищата за предаване на стресови сигнали и транскрипционни фактори, регулиращи активността на специфични гени. На този етап може да бъде избран един от двата различни пътя за последваща трансформация на клетката: забавяне на растежа в условия на лек и/или умерен стрес или спиране на растежа, но с шанс за оцеляване, в условия на силен стрес. Отговорът към слаб стрес зависи от характера и интензивността на фактора, предизвикващ стреса, и води до устойчивост на клетките към последващ силен стрес от същия тип (същата устойчивост на стрес) или кръстосана стресова устойчивост между двойки различни стресови фактори. Тя включва биосинтеза на специфичен набор от протеини, посттранслационни модификации на тези протеини и техните специфични реакции в клетката. Стрес-индуциращите фактори може да действат в различна степен на интензивност. Лекият стрес обикновено се отнася до фактор, действащ в сублетална доза, който не редуцира преживяемостта на клетките, а само забавя растежа им. Най-често такъв стимул активира стресовия отговор, който мобилизира клетъчните защитни механизми. Силният стрес се отнася до състояния, които временно спират клетъчния цикъл във фаза G1 (Johnston and Singer, 1980).

Ефектите от силния стрес обикновено причиняват увреждане на клетъчните макромолекули и предизвикват структурни и функционални промени с различен обхват. Последните симптоми на силен стрес могат да бъдат ускоряване на процеса на стареене или индуциране на апоптоза или некроза в клетката ([Galluzzi et al, 2011](#)). Следователно, един и същ стимул, в зависимост от дозата, може да предизвика противоположни физиологични ефекти.

БИОИНФОРМАТИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ИЗУЧАВАНЕ СЪСТОЯНИЕТО НА ПОКОЙ ПРИ ДРОЖДИТЕ *S. cerevisiae*

Биоинформатика и системна биология

В днешно време биоинформатиката се превръща в основна част от повечето научни изследвания, свързани с живота ([Marcus, 2008](#)). Тя представлява важна интердисциплинарна част от науката, с която се извличат биологични данни, с помощта на изчислителен анализ. Биоинформатиката прилага концепции и методи от много области като математика, статистика, генетика, компютърни науки, физика, химия, медицина и биология и предоставя информация от различни биологични данни ([Marcus, 2008](#)).

Основните направления на биоинформатиката могат да бъдат обединени в три различни групи:

1) да се улесни управлението на данни и достъпа и споделяне на съществуваща информация под формата на база данни, като база данни за ДНК последователности GenBank ([Benson et al, 2013](#)), за функционална геномика ArrayExpress ([Rustici et al, 2013](#)), за молекулни взаимодействия BioGRID ([Stark et al, 2011](#));

2) да се стимулира разработването на алгоритми и инструменти за разрешаване на биологични въпроси, например алгоритъм за идентифициране на специфични биологични характеристики в списък от гени ([Oliveira et al, 2008](#)), Cytoscape за визуализация на мрежи за взаимодействие ([Shannon et al, 2003](#)) и metaMA за мета-анализ ([Marot et al, 2009](#));

3) да се подпомогне прилагането на инструменти и методи за извличане на полезни знания от данните, например анотации на геноми, реконструкция на метаболитни пътища и анализ на експресия в целия геном ([Luscombe et al, 2001](#)).

Наличието на експерименти с висока производителност позволява разглеждането на клетките като системи, при които свойствата на системата се изучават като цяло, а не като отделни части (Palsson, 2006). Системната биология може да се разглежда и като подход за разбиране на биологичните системи, които лежат в основата на мрежи от взаимодействащи си компоненти (Munoz et al, 2012). Също така обединява биолози, математици, компютърни специалисти, инженери и физици за изследване на комплексни биологични системи.

Основната цел на системната биология е да получи количествено представяне на данни, които представляват интерес и могат да бъдат описани под формата на различни математически модели. Тези модели се използват за прогнозиране поведението на клетките/организмите при различни условия или като модели за интегративни анализи (Munoz et al, 2012). Всичко това включва използването на биологични бази данни, включително тези, генерирани от високопроизводствени технологии (метабономика, транскриптомика и интерактомика) и прилагането на изчислителни подходи за интегриране на получените данни, с цел реконструкция на моделно поведение и извършване на последващи анализи.

Проектиране и развитие на биологична база данни

След развитието на технологиите за секвениране на ДНК с висока производителност, биоинформатиката стана основна дисциплина за извличане на информация от геномните последователности (Barnes, 2007). Терминът информатика е описан от Altman, 2012 който гласи: „това е изследване, свързано с представянето, съхраняването, търсенето, извличането и анализирането на съответната информация“. Биологичните данни могат да дадат информация, съхранявана в ДНК последователности, експресия на РНК, триизмерни протеинови структури, протеинови взаимодействия, клинични данни и публикувана литература. С други думи, биоинформатиката е област от науката, която използва различни методологии и изчислителни технологии за структурно съхраняване на биологична информация под формата на бази данни, които спомагат за разрешаването на биологични мистерии и експериментално проектиране.

Биоинформатичните бази данни и софтуерни инструменти стават незаменима част от научните изследвания в наши дни. Те съдържат информация от научни изследвания за живота, вариращи от необработени данни с висока производителност до резултати от различни анализи. Такива бази данни могат да бъдат класифицирани в различни категории, например бази данни за последователност и структура на нуклеинова киселина ([GenBank Overview \(nih.gov\)](#)), бази данни за протеинова последователност и структура ([UniProt](#)), бази данни за метаболитни и сигнални пътища ([KEGG GENOME Database](#)), бази данни за специфични организми ([Saccharomyces Genome Database |SGD \(yeastgenome.org\)](#)) и бази данни за микрочипове и гена експресия ([ArrayExpress < BioStudies < EMBL-EBI](#)).

Геномен анализ и изследване ролята на гени, отговорни за стресовия отговор и навлизане в G₀ състояние

S. cerevisiae е един от най-широко използваните моделни организми в областта на молекулярната биология, биотехнологията и за изследване на процеси, свързани с човешкото здраве и заболявания ([Petranovic and Nielsen, 2008](#)). Принципите на действие на фундаментални клетъчни механизми, като репликация на ДНК, рекомбинация на ДНК, клетъчно делене, протеинова хомеостаза и везикуларен трафик, са еволюционно запазени при дрожди и повисши еукариоти ([Winderickx et al, 2008](#)). Установено е, че гените на дрождите също имат хомолози при бозайници, например *RAS1* и *RAS2* са хомолози на *RAS* протоонкогените на бозайници ([Botstein et al, 1997](#)). Ето защо, провеждане на изследвания с дрожди (или чрез класически комплементарни анализи за човешки протеини, които имат хомолог при дрожди или от хуманизирани дрождеви системи за човешки протеини, които нямат дрождев аналог) допринася за разкриване на функционалните роли или биологичните последици от мутации в човешки протеини ([Botstein and Fink, 2011](#)). В днешно време за дрождите има относително изчерпателен набор от омикс данни на ниво геном, транскриптом, интерактом и метаболом. Тази налична информация улеснява изследванията в областта на системната биология, която наблюдава повече от индивидуални гени и протеини, но разглежда как тези молекули взаимодействат и работят заедно, за да установят свойствата на живите клетки. Бидейки моделен организъм, който се използва широко за изследване на основни клетъчни

процеси, каквито са навлизането в състояние на покой и стресов отговор, за дрождите понастоящем има натрупана значителна по обем информация, описваща клетъчните компоненти, техните взаимодействия и състояния на биологичните мрежи. Данните, описващи тези компоненти и взаимодействията между тях, включително геномни секвенции (Bussey et al, 1997), протеинови комплекси (Gavin et al, 2006) и белтък-ДНК взаимодействия (Harbison et al, 2004) могат да бъдат използвани, за изучаването на мащабните мрежи от взаимовръзки между молекулите на биологичната система, като по този начин се изгражда основа за глобалното разбиране на биологичните процеси. Дали дрождевата клетка ще навлезе в пролиферативен клетъчен цикъл или ще премине в състояние на покой, е строго регламентирано и изключително важно решение.

Подобно на дрождевата клетка, човешките клетки също са в състояние обратимо да излязат от клетъчния цикъл, в отговор на промени в околната среда (липса на хранителни вещества и растежни сигнали) и да преминат във фаза на покой. Неадекватният клетъчен отговор към външни промени може да доведе до неконтролирано клетъчно делене, което е в основата на раковите заболявания, или до невъзможност за размножаване, което от своя страна води до дефекти в развитието, преждевременно стареене и дефекти при зарастване на рани. Основните сигнални пътища и гени, за които се знае, че участват в регулирането на процесите на навлизане и излизане от стационарна фаза, включително пътищата TORC, Ras/PKA и AMPK, са консервативни при дрождите и човека (Longo and Fabrizio, 2012). Въз основа на това е удачно създаването на *in silico* модели за изучаване на сигналните механизми на оксидативния стрес и навлизането на клетките в покой при човека, разгледан в сравнителен аспект с моделния обект *S. cerevisiae*.

В проучвания на Мариновска, 2023 е извършен биоинформатичен анализ с цел характеризиране на регулаторните механизми, отговорни за навлизане в G₀ състояние при дрожди S. cerevisiae и разглеждането им в сравнителен аспект с тези при човека.

TOR протеин киназа

Анализът на SGD потвърди, че дрождите *Saccharomyces cerevisiae* притежават два гена *TOR1* и *TOR2*, които кодират съответни протеин кинази: Tor1p и Tor2p. *TOR1* и *TOR2* кодират два тясно свързани фактора, които

ClustalW анализът на първичната структура на двата дрождени белтъка *Tor1p* и *Tor2p* със серин/треонин протеин киназата при човек – *mTOR* (protein ID NP_004949.1) показва 42.21 % хомоложност между тях (**Фиг. 45, 46**). Това дава основание да се предположи, че тези гени при дрождите и човека са ортолози. В потвърждение на това са и данните за функцията на човешката протеин киназа *mTOR*, която подобно на дрождевите протеин кинази, принадлежи към семейство на фосфатидилинозитол киназа свързани кинази, регулиращи клетъчния отговор при стресови условия като увреждане на ДНК и липса на хранителни вещества.

Фигура 45. Сравняване на протеинови секвенции на Tor1 и Tor2 при *S. cerevisiae* с mTOR на човек

Фигура 46. Матрица за процент идентичност между изследваните TOR1 и TOR2 при *S. cerevisiae* с mTOR на човек, генерирана от ClustalW

РКА е компонент на сигналния път, който контролира различни клетъчни процеси, включително метаболизъм, клетъчен цикъл, стресов отговор, стационарна фаза и спорулация. РКА действа основно като инхибитор на навлизането в състояние на покой (Gray et al, 2004). Мутанти с нарушена

аденилатциклазна активност не могат да се размножават и техният растеж спира в състояние, подобно на G_0 (Tsukada and Ohsumi, 1993). Инактивацията на PKA е от решаващо значение за навлизане на клетките в G_0 , а нейното активиране е важен момент за правилното им излизане от това състояние.

Биоинформатичният анализ на генома на *Saccharomyces cerevisiae* детектира наличието на три гена - *TPK1*, *TPK2* и *TPK3*, които кодират протеините Трк1р, Трк2р, Трк3р, изграждащи три каталитични субединици на цикличната АМФ - зависима протеин киназа (BCY1). *In silico* анализът на човешкия геном показва наличието на три гена *PRKACA*, *PRKACB* и *PRKACG*, които кодират каталитичните субединици на PKA (фиг.47).

При човека са идентифицирани четири различни регулаторни и три каталитични субединици. цАМФ-зависимо фосфорилиране на протеините от протеин киназа А е важно за много клетъчни процеси, включително диференциация, пролиферация и апоптоза. Процентът на идентичност между гените, кодиращи регулаторните субединици на PKA при дрожди и човек е сравнително нисък (33.52 %) – фиг. 48.

Въпреки ниската идентичност, основната функция на регулаторните субединици (свързване на сАМР и контрол върху каталитичните субединици) е запазена, защото консервативни ключови мотиви и домейни често остават идентични или подобни. Това означава, че дрождите и човека използват подобен механизъм за активиране на PKA, но протеините са еволюционно доста различни, вероятно поради разлика в сложността на клетъчните процеси.



Фигура 47. Сравняване на протеинови секвенциите протеин киназа А при *S. cerevisiae* и човек

1:	NP_001158230.1	100.00	33.52
2:	BCY1	33.52	100.00

***Snf1p* протеин киназа**

In silico анализът на генома на *S. cerevisiae* детектира наличие на един ген, кодиращ Snf1p протеин киназа, който показва 46.93% хомоложност в аминокиселинната последователност с 5`АМФ – активирана протеин киназа (AMPK) (NP_006243.2) при човек (Фиг. 49 и 50). Сравнително високият процент на сходство доказва, че генът, кодиращ Snf1p протеин киназа е ортолог на AMPK при човека.

[illegible]

104

1: SNF1	100.00	46.93
2: AAB32732.1	46.93	100.00

Фигура 7. Матрица за идентичност между изследваните Snf1p и AMPK.

Протеин киназа C

PKC е от семейството на сериновите и треониновите протеин кинази (Lew, 1999). Тя участва във фосфорилирането на голяма група таргетни белтъци и е свързана с вътреклетъчното сигнализиране. Доказано е, че играе важна роля в регулирането на различни клетъчни функции като: клетъчна активация, индукция на апоптоза и др. (Gray et al, 2004).

Дрождевата протеин киназа C (Pkc1p) основно е отговорна за стабилизирането на клетъчната стена в активна конформация по време на вегетативната пролиферация. Изследвания обаче показват, че тя по-скоро действа като негативен регулатор на различни вътреклетъчни процеси, като временно се индуцира от инактивирането на TOR сигналния път (Krause and Gray, 2002). Установено е, че Pkc1p-MAP киназата е необходима за поддържане на клетъчната жизнеспособност при гладуване по въглерод, както и за увеличаване на преживяемостта на култури в стационарна фаза (Torres et al, 2002).

В генома на S. cerevisiae посредством приложено биоинформатично изследване беше доказано наличие на един ген PKC1, кодиращ синтеза на серин/треонин протеин киназа C (1151 aa).

За разлика от S. cerevisiae, при човека in silico анализа показва наличието на пет гена, кодиращи протеини от семейството на протеин кинази C – PRKCA, PRKCB, PRKCD, PRKCE, PRKCZ, разположени на различни хромозоми. След провеждане на множество сравняване на секвенциите на съответните пет протеина с дрождевата протеин киназа C чрез ClustalW беше установено наличие на сходство от 34.5 % между тях (Фиг. 51 и 52). Сходството между дрождевата PKC1 и човешките PRKC протеини показва, че въпреки ниската идентичност на последователностите, основните каталитични и регулаторни региони са консервативни, което отразява еволюционното съхранение на функцията на серин/треонин протеин кинази C.

PKC1	IXVLKXDIQWIDIESAAEKVFLATKTHMPFLNLVCSFQTEH---RIYFA	337
XP_016857279.1	PRVKKLWDEDEDIQTERHVFQA--SNPFVLGHSCFQTSALRLSPSCRLFLV	445
NP_001341605.1	ISGLKXDVLLDQDVCTHKEKRLVLA--AKPPFLTLCTFQTD-----RLFFV	485
NP_005391.1	VEVLKXDVLLQDDVECTHKEKRLVLA--AKPPFLTLQVCFQTD-----RLFFV	416
NP_002728.2	IKELKXDVLLQDDVECTHKEKRLVLA--AKPPFLTLQVCFQTD-----RLFFV	419
NP_002729.2	VEVLKXDVLLQDDVECTHKEKRLVLA--AKPPFLTLQVCFQTD-----RLFFV	419
PKC1	HEFVGGDLNHNQ--RLSVRAKFAAEVLALKYFHONGVTVYDLKLELLTPEH	962
XP_016857279.1	IEVYNGDLNHNQ--RLSVRAKFAAEVLALKYFHONGVTVYDLKLELLTPEH	397
NP_001341605.1	HEFVNGDLNHNQ--RLSVRAKFAAEVLALKYFHONGVTVYDLKLELLTPEH	545
NP_005391.1	HEVYNGDLNHNQ--RLSVRAKFAAEVLALKYFHONGVTVYDLKLELLTPEH	476
NP_002728.2	HEVYNGDLNHNQ--RLSVRAKFAAEVLALKYFHONGVTVYDLKLELLTPEH	479
NP_002729.2	HEVYNGDLNHNQ--RLSVRAKFAAEVLALKYFHONGVTVYDLKLELLTPEH	479
PKC1	IKTADVGLCKDENNGHRTSTFCGTFEPAPELLEKEVYKAVDMAFGLVYQLCQS	1822
XP_016857279.1	IKLTDVGLCKDENNGHRTSTFCGTFEPAPELLEKEVYKAVDMAFGLVYQLCQS	457
NP_001341605.1	IKTADFQCKENFEGSRSTFCGTFEPAPELLEKEVYKAVDMAFGLVYQLCQS	565
NP_005391.1	IKLADFQCKENFEGSRSTFCGTFEPAPELLEKEVYKAVDMAFGLVYQLCQS	485
NP_002728.2	IKTADFQCKENFEGSRSTFCGTFEPAPELLEKEVYKAVDMAFGLVYQLCQS	536
NP_002729.2	IKTADFQCKENFEGSRSTFCGTFEPAPELLEKEVYKAVDMAFGLVYQLCQS	539
PKC1	PFSG-----DEDEVFHAILTDELPYDMAGETVQFQILLTKDPEKRLGAP--RD	1873
XP_016857279.1	PDITTDNDPNTEDYLVLEKPIATPRFLSVKASHVGLFNDPKERLCRP-QTG	516
NP_001341605.1	PFHG-----DDELFESIRVDTHPPHMTKESKDLLEKLFEREPTORLVGT	614
NP_005391.1	PFEG-----DDELFESTLMDVYVPLLSKAVSKAGDTHPPHMTKESKDLLEK	658
NP_002728.2	PFEG-----DDELFESTLMDVYVPLLSKAVSKAGDTHPPHMTKESKDLLEK	587
NP_002729.2	PFEG-----DDELFESTLMDVYVPLLSKAVSKAGDTHPPHMTKESKDLLEK	590

Фигура 51. Сравнителен анализ на секвенции на протеин киназа С при *S. cerevisiae* и човек

1: PKC1	100.00	32.65	33.93	33.43	36.52	36.20
2: XP_016857279.1	32.65	100.00	36.30	43.33	44.19	44.33
3: NP_001341605.1	33.93	36.30	100.00	43.66	49.36	48.99
4: NP_005391.1	33.43	43.33	43.66	100.00	52.73	53.23
5: NP_002728.2	36.52	44.19	49.36	52.73	100.00	80.15
6: NP_002729.2	36.20	44.33	48.99	53.23	80.15	100.00

Фигура 52. Матрица за процент идентичност между човешките и дрождевата протеин киназа С, генерирана от ClustalW

Вътреклетъчна локализация на белтъци

Една от основните цели в клетъчната биология и протеомика е да се идентифицират субклетъчните места и функции на протеините, за да се разберат пътищата, които регулират биологичните процеси на клетъчно ниво. Този подход има важно значение за развитието на системната биология и разработването на нови лекарствени препарати. От особен интерес са протеините с много локации или динамични характеристики, тъй като те могат да имат някои много специални биологични функции, които са интригуващи както от фундаментална, така и от фармакологична гледна точка (Smith, 2008). Специфичното насочване на протеини към вътреклетъчните компартменти се медира от дефинирани сигнални последователности. За да се постигне мултинасочване към различни части на клетката се използват различни стратегии.

При *in silico* предсказване на субклетъчната локализация на протеините, в зависимост от тяхната последователност, се използват няколко подхода. Единият подход се опитва да идентифицира мотиви, разпознаваеми от транспортните белтъци и рецептори на белтъчния транспортен механизъм, за да се насочат протеиновите продукти от цитозола към други субклетъчни

локализации ([Mott et al, 2002](#)). Този подход е ограничен от сравнително малките познания за тези сигнали (липсата на детекция на известни мотиви не е сигурно доказателство, че протеинът остава в цитозола). Вторият подход използва хомоложни последователности на белтъците от експериментално проверена локализация ([Nair et al, 2002](#)). Третият подход използва аминокиселинния състав на белтъка, основавайки се на хипотезата, че физикохимичните свойства на белтъчните остатъци трябва да бъдат свързани по някакъв начин с физикохимичните свойства на средата, в която протеинът изпълнява своята функция ([Höglund et al, 2006](#)). Този подход има предимството, че може да се прилага към всеки набор от компартменти и белтъци, при условие че има достатъчно данни.

Повечето съществуващи методи за предсказване на протеинова субклетъчна локализация могат да покрият само 5 до 12 места за локация. Също така, те са ограничени да се справят с протеини с едно местоположение и по този начин не успяват да работят за мултиплексни протеини, които могат едновременно да съществуват или да се таргетират до две или повече локации. Всъщност мултиплексните протеини от този вид обикновено притежават някои важни биологични функции, достойни за специално внимание. Понастоящем един от най-ефективните софтуери е този разработен от [Chou and Shen, 2010](#), наречен „Euk-mPLOC 2.0“, който позволява идентифициране на еукариотни протеини сред следните 22 места: (1) акрозома, (2) клетъчна стена, (3) центриола, (4) хлоропласти, (5) цианела, (6) цитоплазма, (7) цитоскелет, (8) ендоплазмен ретикулум, (9) ендозома, (10) извънклетъчно, (11) апарат на Голджи, (12) хидрогенозома, (13) лизозома, (14) меланозома, (15) микрозома (16) митохондрия, (17) ядро, (18) пероксизома, (19) плазмена мембрана, (20) пластид, (21) тяло на Шпиндел и (22) вакуола.

Анализ на генна експресия

Според централната догма на молекулярната биология, генната експресия е процес, при който ДНК последователността се транскрибира в генен продукт или РНК. Микрочиповете и наскоро РНК секвенирането (RNA-seq) се използват широко за измерване нивата на генна експресия, които са прилагат в няколко контекста, включително изследване на генните функции, разкриване на регулаторни модели, изучаване на съвместна експресия и идентифициране на

предполагаеми маркери. Данните за транскриптома са достъпни в няколко публични бази данни като ArrayExpress ([Rustici et al, 2013](#)) и Gene Expression Omnibus (GEO) ([Barrett et al, 2013](#)). Изчислителните и статистическите методи играят важна роля в обработката и извличането на информация от тези бази данни. Една от най-известните платформи е Bioconductor, която съдържа R софтуерни пакети за анализ на микрочипове и други високо производствени геномни данни ([Reimers and Carey, 2006](#)).

Появата на високопроизводителни геномни техники, заедно със завършването на проекти за секвениране на генома, идентифициране на протеин-протеинови взаимодействия и реконструкция на геномни пътища, ускори развитието на системните биологични изследвания в дрождите *S. cerevisiae*. По-специално, откриването на биологични пътища в дрождите се превърна във важен аспект на системната биология, която има за цел да разбере взаимодействията между молекулите вътре в клетката, водещи до определени клетъчни процеси в отговор на специфичната среда. Докато съществуващите теоретични и експериментални подходи позволяват изследването на добре известни пътища, участващи в метаболизма, генната регулация и сигнална трансдукция, биоинформатичните методи предлагат нови прозрения за изчислително моделиране на биологичните пътища. Тези подходи разглеждат серия от молекулни взаимодействия в клетката при различни условия, които водят до крайни биологични функции. Сигналите от външната среда предизвикват вътрешни химични реакции с цел справяне с конкретни задачи. Например, функцията на MAPK-съдържащ комплекс може да бъде променена чрез фосфорилиране на компонентите му от активна MAPK в съответния сигнален път ([Chen and Thorner, 2007](#)). През последното десетилетие са разработени много мащабни експериментални и изчислителни подходи за дешифриране на химичните реакции в метаболитните пътища, генната регулация в регулаторната мрежа и предаването на сигнали в сигналните пътища. Идентифицирането на връзката между гени, протеини или молекули в биологичните пътища е от решаващо значение за разбирането на сложните биологични дейности и биологичните функции.

S. cerevisiae обикновено се използва като моделен организъм за откриване на подобни клетъчни процеси и специфични протеинови функции в други организми. Съществуват редица много важни функционални пътища, като липидният метаболизъм (Nielsen, 2009) и клетъчният цикъл (Hartwell, 2002), които са идентифицирани при дрождите и екстраполирани в човек (Botstein et al, 1997). Именно чрез развитието на системните биологични изследвания в дрождите, *S. cerevisiae* успешно се използват за характеризиране на пълната картина на клетъчните процеси и при висшите еукариотни клетки.

Така например стареенето е процес, свързан с прогресивно намаляване на възможността за противодействие на клетъчния стрес и повреда (Sharon et al, 2009). Също така, това е и ендегенен стимул за апоптоза. Има две парадигми на стареене, описани в дрождите: репликативна продължителност на живот (RLS) и хронологична такава (CLS). RLS се измерва чрез броя удвоявания на майчината клетка преди нейната смърт, докато CLS е времето за оцеляване на неделящите се популации при дълъг период на култивиране (Longo and Fabrizio, 2012). И при двата типа се стига до клетъчна апоптоза, като започват активно да се натрупват кислородни радикали и се активира клетъчната каспаза (Sharon et al, 2009).

Репликативното стареене на дрожди е потенциален модел за процеса на стареене при пролифериращи клетки (напр. човешки стволови клетки), докато хронологичното стареене илюстрира стареенето на постмитотични типове клетки, като мозъчни и мускулни (Rockenfeller and Madeo, 2008). За разлика от RLS, CLS се влияе пряко от наличието на хранителни вещества. Липсата на хранителни вещества кара клетките да влязат в диауксична и стационарна фаза, показвайки няколко физиологични промени, като ниска скорост на транскрипция, намален метаболизъм, намален белтъчен синтез, дебели клетъчни стени и липса на пъпкуване. Дрождевата клетка също натрупва молекули за съхранение като гликоген, триацилглицерол, полифосфат и трехалоза (Galdieri et al, 2010). Пътища на сигнална трансдукция, които регулират преживяемостта и реакциите на стрес са идентифицирани и са установени като еволюционно запазени. Те са рапамицин (TOR), протеин киназа А (PKA) и път на Snf1 (Galdieri et al, 2010).

Промените в околната среда могат да повлияят негативно клетъчната хомеостаза, което може да е в резултат на клетъчна повреда, а не в резултат от липса на растеж или смърт. По този начин живите организми могат бързо да се адаптират в отговор на оцеляването към околната среда. Дрождите развиват

стратегии за отговор при стрес чрез ремоделиране на програмата за генна експресия с промени в рН, температура, хранителни условия, осмотично налягане, нива на кислород, лекарства и токсични компоненти (Gasch et al, 2000). Репрограмирането на генната експресия може да се проследи именно чрез ДНК микрочипове (Knijnenburg et al, 2009). Тези геномни изследвания позволяват да се придобие представа за регулиране реакциите на стрес.

В повечето проучвания дрождите реагират на промените в околната среда чрез промени в генната експресия на хиляди гени (Gasch and Werner-Washburne, 2002). Сред тях около 900 гена се променят при различни условия на външната среда и те се обозначават като гени за отговор при стрес от околната среда (ESR). Има приблизително 300 гена, участващи при стресовия отговор и това са гени, които се включват във въглехидратния метаболизъм (например *FBP26*, *TPS1,2,3* и *GSY2*), нагъването на протеини (например *HSP26,42,78* и *SSA3*), при разграждане на протеини (например *UBC5,8* и *UBI4*) и при оксидативен стресов отговор (напр. *CTT1* и *SOD1*) (Gasch and Werner-Washburne, 2002). Повечето от тези ESR гени съдържат STRE мотив (AGGGG) в своите промотори, разпознаващ се от Msn2 и Msn4, които могат да се считат за общи транскрипционни фактори на стреса.

Въпреки това, гените в ESR се регулират от различни транскрипционни фактори, които са специфични за това състояние, напр. Yap1 и Hsf1 регулират ESR гените в отговор на оксидативен стрес или топлинен шок, съответно (Gasch and Werner-Washburne, 2002). Общо около 600 репресирани гени участват в метаболизма на РНК, рибозомните протеини и протеиновия синтез, което показва, че клетките се опитват да съхранят енергия по време на адаптацията си към нови условия (Gasch and Werner-Washburne, 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всички живи организми са изложени постоянно на различни стресови фактори от околната среда, включително липса на хранителни вещества, химични съединения, ултравиолетови лъчи, топлина и др. Ето защо всяка клетка притежава различни защитни механизми за поддържане на жизнения статус в условия на стрес. Многобройни проучвания показват, че редица протеини, играещи ключова роля в регулацията на клетъчния адаптивен отговор към външен стрес, са функционално консервативни при дрожди и човек и се кодират

от съответни гени ортолози. Изучаването на тяхната роля и вътреклетъчна локализация при човека се улеснява чрез използване на дрождеви клетки в състояние на покой, които наподобяват клетките на бозайниците и човешките стволови клетки. Изследването на регулаторните механизми, които са отговорни за навлизането и оцеляването в G_0 състояние е важно не само за изучаване на механизмите на стресов отговор, но и за разработването на терапии за различни заболявания.

*Въз основа на проведени изследвания и анализ на научни данни е съставен „Физиологичен профил“ (Фиг. 53) за отговор към стрес на клетъчни популации *S. cerevisiae*, намиращи се в различна фаза на жизнения цикъл – пролиферативна, G_0 и стационарна непролиферативна фаза (Мариновска П, 2023).*

Прилагането на такива *in vitro* модели при оценка на риска при използването на различни токсични съединения значително би подобрило нашето ограничено разбиране за лекарствените препарати и механизмите на тяхното токсично действие. От обществена гледна точка моделните *in vitro* системи са много по-полезни и хуманни. Усъвършенстването на тези *in vitro* модели за осъществяване на последователни, бързи и рентабилни тестове за токсичност е от голямо значение, тъй като те имат различни предимства: намаляване на броя на опитни животни, намалената цена за поддръжка на тези животни, както и необходимост от по-малки количества на химичните вещества, които се тестват. Всичко това предполага и съкращаване на необходимото време и увеличаване на производителността за оценка на голям брой химични съединения и техния метаболизъм. През годините са използвани много различни *in vitro* модели за тестване на лекарствена токсичност, но именно установяването на възможността на еукариотните дрождеви микроорганизми *S. cerevisiae* да навлизат в състояние на покой G_0 , силно наподобяващо това при човешки клетки, предостави нови възможности за разработване на моделни тест системи на базата на тези микроорганизми.

Изучаването на вариациите в генната експресия или нивото на метаболити при излагане на токсичен агент допринасят за идентифициране на клетъчните компоненти и пътищата, играещи ключова роля в токсикологичния отговор (North and Vulpe, 2010).

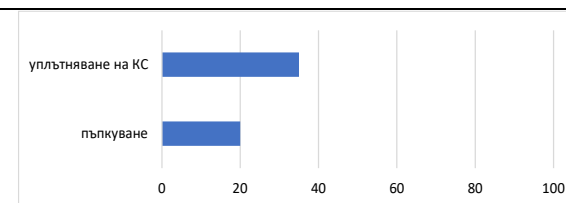
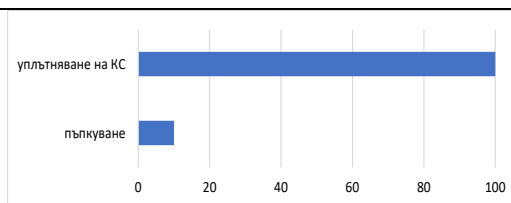
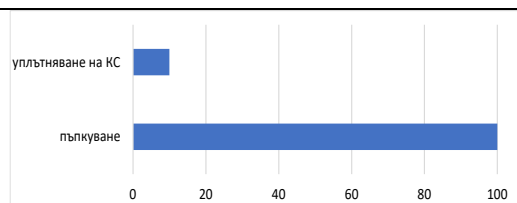
„Функционален профил на стресов отговор“ при *S. cerevisiae* BY4741

*Клетки в пролиферативна фаза
(Log)*

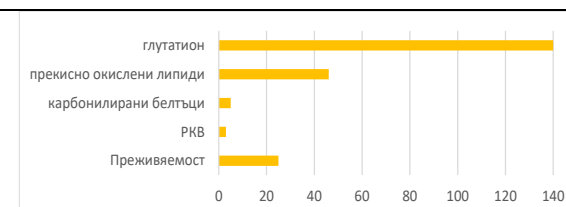
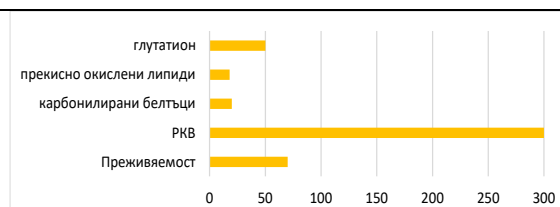
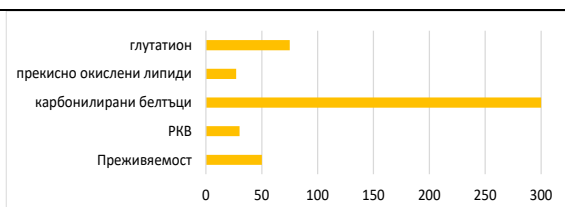
*Клетки във фаза на покой
(Go)*

*Стационарни непролиферативни клетки
(NQ)*

Морфологични характеристики



Метаболитни характеристики





Фигура 53. Функционални профили на стресов отговор при Log, Q и NQ клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741. Представените данни изобразяват в % изменението на изследваните показатели спрямо нетретиран контролни култури.

Библиография

1. **Abualhasan M. (2015).** Synthesis And Formulation Of Ibuprofen Pro-Drugs For Enhanced Transdermal Absorption". Int J Pharm Pharm Sci, vol. 7, no. 2, pp. 352–354.
2. **Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, et al. (2007).** Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. J Reprod Dev. 53(2):367-78. doi: 10.1262/jrd.18146. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17213691.
3. **Adams SS. (1992).** The propionic acids: a personal perspective. J Clin Pharmacol. 32(4):317-23.
4. **Adusumilli VS, Walker TL, Overall RW, Klatt GM, Zeidan SA, et al. (2021).** ROS Dynamics Delineate Functional States of Hippocampal Neural Stem Cells and Link to Their Activity-Dependent Exit from Quiescence. Cell Stem Cell. 28(2):300-314.e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.10.019. PMID: 33275875.
5. **Airoidi EM, Huttenhower C, Gresham D, Lu C, Caudy AA, Dunham MJ, Broach JR, Botstein D, Troyanskaya OG. (2009).** Predicting cellular growth from gene expression signatures. PLoS Computational Biology 5(1): e1000257.
6. **Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. (1994).** GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. Journal of Molecular and Cellular Biology, 14(6): 4135–4144. doi:10.1128/MCB.14.6.4135-4144.1994.
7. **Alhamdy T, Al-Sowayan N. (2020).** The Effect of Sunscreens on Yeast to Prevent Ultraviolet Damage. Advances in Bioscience and Biotechnology, 11, 111-122.
8. **al-Khodairy F, Carr AM. (1992).** DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J. 11(4):1343-50. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05179.x. PMID: 1563350; PMCID: PMC556583.
9. **Allison SD, Chang B, Randolph TW, Carpenter JF. (1999).** Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration induced protein unfolding, Arch. Biochem. Biophys. 356, 289 - 298.

10. **Altman RB. (2012).** Introduction to translational bioinformatics collection. PLoS Comput Biol. 8(12):e1002796. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002796. Epub 2012 Dec 27. PMID: 23300404; PMCID: PMC3531318.
11. **Altmann K, Durr M, Westermann B. (2007).** *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. Methods Mol Biol. 372:81–90.
12. **Ames BN, Yanofsky C. (1971).** The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. Chemical Mutagens. Hollaender, A., ed. New York, Plenum Press pp. 267-287.
13. **Aragon AD, Rodriguez AL, Meirelles O, Roy S, Davidson GS, Tapia PH, Allen C, Joe R, Benn D, Werner-Washburne M. (2008).** Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. Mol. Biol. Cell. 19:1271–1280.
14. **Aravind L, Koonin EV. (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. Nucleic Acids Res. 27(23):4658-70. doi: 10.1093/nar/27.23.4658. PMID: 10556324; PMCID: PMC148756.
15. **Arcos JC, Argus MF. (1974).** Chemical Induction of Cancer. New York, Academic Press, 11A:338-339.
16. **Arthur H, Watson K. (1976).** Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. J Bacteriol. 128(1):56-68. doi: 10.1128/jb.128.1.56-68.1976. PMID: 988016.
17. **Avendaño C, Menéndez JC. (2015).** Anticancer Drugs Acting via Radical Species: Radiotherapy and Photodynamic Therapy of Cancer. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. 133-195.
18. **Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014).** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. PMID: 24999379; PMCID: PMC4066722.
19. **Babazadeh R. (2014).** Integrative analysis of osmoregulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ISBN: 978-91-628-9020-9.
20. **Badotti F, Dário MG, Alves JS. (2008).** Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Microb Cell Fact. 7, 111.
21. **Barahona S, Yuivar Y, Socias G, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M. (2016).** Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. Extremophiles 20:479–491.

22. **Barnes S, Brown KW, Krusemark E, Campbell WK, Rogge RD. (2007).** The role of mindfulness in romantic relationship satisfaction and responses to relationship stress. *J Marital Fam Ther.* 33(4):482-500. doi: 10.1111/j.1752-0606.2007.00033.x. PMID: 17935531.
23. **Barnett JA, et al. (2016).** Fermentation in yeasts: physiology and applications. *FEMS Yeast Research,* 16(5), fow045. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow045>.
24. **Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, et al. (2013).** NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research,* 41(Database issue), D991–D995.
25. **Bayliak M, Semchyshyn H, Lushchak V. (2006).** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain-specific. *Biochemistry (Mosc).* 71(9):1013-20. doi: 10.1134/s0006297906090100. PMID: 17009956.
26. **Bellinger Y, Larher F. (1987).** ¹³C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeast *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media, *Can. J. Microbiol.* 34, 605 - 612 A.
27. **Bennett CB, Lewis LK, Karthikeyan G, Lobachev KS, Jin YH, Sterling JF, Snipe JR, Resnick MA. (2001).** Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nat Genet* 29(4):426-34.
28. **Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. (2013).** GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195. PMID: 23193287; PMCID: PMC3531190.
29. **Bhaganna P, Volkers RJ, Bell AN, Kluge K, Timson DJ, McGrath JW, Ruijsenaars HJ, Hallsworth JE. (2010).** Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. *Microb Biotechnol.* 3(6):701-16. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00203.x. PMID: 21255365.
30. **Biddick R, Young ET. (2009).** The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast.* 26:205–220.
31. **Bivi N, Romanello M, Harrison R, Clarke I, Hoyle DC, Moro L, Ortolani F, Bonetti A, Quadri-Foglio F, Tell G, Delneri D. (2009).** Identification of secondary targets of N-containing bisphosphonate in mammalian cells via parallel competition analysis of the barcoded yeast deletion collection. *Genome Biol.* 10, R93.
32. **Blomberg A, Adler L. (1992).** Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* 33:145-212.

33. **Bonawitz, ND, Chatenay-Lapointe M, Pan Y, Shadel GS. (2007).** Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metabolism*, 5(4):265–277.
34. **Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM. (1997).** Yeast as a model organism. *Science*. 277(5330):1259-60. doi: 10.1126/science.277.5330.1259. PMID: 9297238.
35. **Botstein D, Fink GR. (2011).** Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*. 189(3):695-704. doi: 10.1534/genetics.111.130765. PMID: 22084421.
36. **Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M. (1998).** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(5):1044-1052, ISSN 0021-9193.
37. **Brocard-Masson C, Dumas B. (2006).** The fascinating world of steroids: *S. cerevisiae* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 22:213-252.
38. **Brombacher K, Fischer BB, Rüfenacht K, Eggen RI. (2006).** The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast* 23: 741–750.
39. **Brown AD, Simpson JR. (1972).** Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72: 589–591.
40. **Burger RM, Peisach J, Horwitz SB. (1981).** Activated bleomycin: a transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *Journal of Biological Chemistry* 256(22): 11636–11644. doi:10.1016/S0021-9258(19)68452-8.
41. **Bussey H, Storms RK, Ahmed A, Albermann K, Allen E, et al. (1997).** The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. *Nature*. 387(6632 Suppl):103-5. PMID: 9169875.
42. **Cabrera M, Langemeyer L, Mari M, Rethmeier R, Orban I, Perz A, Bröcker C, Griffith J, Klose D, Steinhoff HJ, Reggiori F, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. (2010).** Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering. *J Cell Biol* 191(4):845-59.
43. **Cadet J, Douki T, Ravanat JL. (2015).** Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochemistry and Photobiology* 91(1): 140–155. doi:10.1111/php.12368.

44. **Calabrese EJ, Dhawan G, Kapoor R, Iavicoli I, Calabrese V. (2015).** What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*, 16(6):693–707.
45. **Carmelo V, Santos H, Sá-Correia I. (1997).** Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1325(1):63-70. doi: 10.1016/s0005-2736(96)00245-3. PMID: 9106483.
46. **Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Büttner S, Meisinger C, Kroemer G, Madeo F. (2010).** Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death & Differentiation*, 17(5):763–773.
47. **Cascorbi I. (2006).** Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals, *Toxicol. Lett.* 15 (2006) 16–28.
48. **Castro-González MI, Méndez-Armenta M. (2008).** Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environ Toxicol Pharmacol*. 26(3):263-71. doi: 10.1016/j.etap.2008.06.001. PMID: 21791373.
49. **Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. (2001).** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 12(2):323-37. doi: 10.1091/mbc.12.2.323. PMID: 11179418.
50. **Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J. (2003).** Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14:214 - 229.
51. **Chen J, Stubbe J. (2004).** Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:175–181.
52. **Chen RE, Thorner J. (2007).** Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1773(8):1311-40. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.05.003. Epub 2007 May 22. PMID: 17604854; PMCID: PMC2031910.
53. **Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G et al. (2012).** *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40 (Database issue), D700–D705.
54. **Choder M. (1991).** A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary-phase of yeast. *Genes Dev.* 5: 2315–2326.
55. **Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. (2014).** Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate

- non-human primate hearts. *Nature*. 510(7504):273-7. doi: 10.1038/nature13233. Epub 2014 Apr 30. PMID: 24776797.
56. **Chou KC, Shen HB. (2010).** A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS One*. 5(4):e9931. doi: 10.1371/journal.pone.0009931. PMID: 20368981.
 57. **Chung SH, Chung SM, Lee JY, Kim SR, Park KS. (1999).** The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS Lett*. 23:235–240.
 58. **Ciccolini L, Taillandier P, Wilhelm AM, Delma H, Strehaiano P. (1997).** Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: Effect of temperature and of ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, 65: 145–149.
 59. **Clark WR, Gao D. (2002).** Properties of membranes used for hemodialysis therapy. *Semin Dial*. 15(3):191-5. doi: 10.1046/j.1525-139x.2002.00019.x. PMID: 12100457.
 60. **Coliva G, Duarte S, Pérez-Sala D, Fedorova M. (2019).** Impact of inhibition of the autophagy-lysosomal pathway on biomolecules carbonylation and proteome regulation in rat cardiac cells. *Redox Biology*. 23: 101123.
 61. **Costa V, Moradas-Ferreira P. (2001).** Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol aspects Med* 22:217–246.
 62. **Costa V, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. (2007).** Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* 59 (4-5):293-8.
 63. **Cray JA, Russell JT, Timson DJ, Singhal RS, Hallsworth JE. (2013a).** A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ Microbiol* 15:287–296. doi:10.1111/1462-2920.12018.
 64. **Crowe JH, Crowe IM, Chapman D. (1984).** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose, *Science* 223, 701-703.
 65. **Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. (1992).** Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol*, 54:579-599.
 66. **D'Andrea AD, Haseltine WA. (1978).** Modification of DNA by aflatoxin B¹ creates alkali-labile lesions in DNA at positions of guanine and adenine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75(9):4120–4124. doi:10.1073/pnas.75.9.4120.

67. **Davidson GS, Joe RM, Roy S, Meirelles O, Allen CP, Wilson MR, Tapia PH, Manzanilla EE, Dodson AE, Chakraborty S, Carter M, Young S, Edwards B, Sklar L, Werner-Washburne M. (2011).** The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Mol Biol Cell.* 22(7):988-98.
68. **Davidson JRT, Crawford C, Ives JA, Jonas WB. (2011).** Homeopathic treatments in psychiatry: A systematic review of randomized placebo-controlled studies. *The Journal of Clinical Psychiatry,* 72(6), 795–805.
69. **Davies KJ. (1995).** Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 1995;61:1–31.
70. **Dawes IW. (2004).** Stress responses. In: Dickinson JR., Schweizer M., *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae.* CRC Press; 376 – 438.
71. **de Cabo R, Carmona-Gutierrez D, Bernier M, Hall MN, Madeo F. (2014).** The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. *Cell.* 157(7):1515-26. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.031. PMID: 24949965.
72. **de Lima Alves F, Stevenson A, Baxter E, Gillion JL, Hejazi F, Hayes S, Morrison IE, Prior BA, McGenity TJ, Rangel DE, Magan N, Timmis KN, Hallsworth JE. (2015).** Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr Genet.* 61(3):457-77. doi: 10.1007/s00294-015-0496-8. PMID: 26055444.
73. **de Nadal E, Casadomé L, Posas F. (2003).** Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 23: 229–237.
74. **De Paiva SR, Lima LA, Figueiredo MR, Kaplan MAC. (2004).** Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *An Acad Bras Cienc.* 76:499–504.
75. **Deguchi S, Matsui TS, Iio K. (2011).** The position and size of individual focal adhesions are determined by intracellular stress-dependent positive regulation. *Cytoskeleton (Hoboken).* 68(11):639-51. doi: 10.1002/cm.20541. PMID: 22021203.
76. **Delaunay AD, Pflieger MB, Barrault J, Vinh MB, Toledano. (2002).** A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111:471–481.

77. **Demain AL, Fang A. (2001).** Secondary metabolism in simulated microgravity. *The Chemical Record (Chem. Rec.)* 1(4): 333–346. doi:10.1002/tcr.1018.
78. **Deng Y, Liu J, Li L, Fang H, Tu J. (2015).** Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strain 2011-8. *Int. J. Food Microbiol.*, 20 (2015), pp. 96–101.
79. **DeNobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, (2000).** Cell wall perturbations in yeast result in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinases and the Slt2- mediated increase in FKS-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 146: 2121–2123.
80. **Di Monte D, Ross D, Bellomo G, Eklöw L, Orrenius S. (1984).** Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 235(2):334–42.
81. **Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, Remião F, Bastos ML, Carvalho F. (2008).** Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol.* 38(1):13–71. doi: 10.1080/10408440701669959. PMID: 18161502.
82. **Dmitrieva IN, Burg MB. (2004).** Hypertonic stress response, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Mutation Research 569 (2005) 65–74.
83. **Duskova M, Borovikova D, Herynkova P, Rapoport A, Sychrova H. (2015).** The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiology Letters.* 362(3): 1–8. doi:10.1093/femsle/fnu041.
84. **Elhasi T, Blomberg A. (2019).** Integrins in disguise - mechanosensors in *Saccharomyces cerevisiae* as functional integrin analogues. *Microb Cell.* 6(8):335–355. doi: 10.15698/mic2019.08.686. PMID: 31404395.
85. **Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991).** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine,* 11(1):81–128.
86. **Estruch F. (2000).** Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 24(4):469–86. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00551.x. PMID: 10978547.
87. **Evison LM, Rose AH. (1965).** *Journal of General Microbiology,* 39,555.

88. **Fabrizio P, Longo VD. (2003).** The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 2(2):73-81. doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00033.x. PMID: 12882320.
89. **Fabrizio P, Longo VD. (2008).** Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1783(7), 1280–1285.
90. **Farrugia G, Balzan R. (2012).** Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol*. 2:64. doi: 10.3389/fonc.2012.00064. PMID: 22737670.
91. **Farrugia G, Balzan R. (2013).** The proapoptotic effect of traditional and novel nonsteroidal anti-inflammatory drugs in mammalian and yeast cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:504230. doi: 10.1155/2013/504230. PMID: 23983899.
92. **Favier R, Aoki N, de Moerloose P. (2001).** Congenital alpha (2) - plasmin inhibitor deficiencies: a review. *Br J Haematol*. 114(1):4-10. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02845.x. PMID: 11472338.
93. **Feldmann H, Butenandt A. (2005).** Yeast molecular biology: a short compendium on basic features and novel aspects.
94. **Fernandez K, D'Souza S, Ahn JJ, Singh S, Bacasen EM, Mashiach D, Mishail D, Kao T, Thai J, Hwang S, Yaramada L, Miller JH. (2020).** Mutations induced by bleomycin, 4-nitroquinoline-1-oxide, and hydrogen peroxide in the *rpoB* gene of *Escherichia coli*: Perspective on mutational hotspots. *Mutation Research* 821: 111702. doi:10.1016/j.mrfmmm.2020.111702.
95. **Finkel T, Holbrook NJ. (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247.
96. **Flattery-O'Brien J, Collinson LP, Dawes IW. (1993).** *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J Gen Microbiol*. 139:501 - 507.
97. **Foster JW. (2004).** *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*. 2(11):898-907. doi: 10.1038/nrmicro1021. PMID: 15494746.
98. **Foury F. (1997).** Human genetic diseases: across-talk between man and yeast. *Gene* 195: 1 - 10.
99. **Friedberg EC, Walker GC, Siede W. (1995).** DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press.

100. **Friedberg EC. (2005).** Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6:943–953. doi:10.1038/nrm1781.
101. **Fuge EK, Braun EL, Werner-Washburne M. (1994).** Protein-synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 176, 5802–5813.
102. **Gabriel AA, Vera DD, Lazo OMY, Azarcon VB, De Ocampo CG, Marasigan JC, Sandel GT. (2017).** Ultraviolet-C inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* in liquid egg white. *Food Contr.*, 73:1303-1309.
103. **Galdieri L, Mehrotra S, Yu S, Vancura A. (2010).** Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS* (6):629-38. doi: 10.1089/omi.2010.0069. Epub 2010 Sep 23.
104. **Galluzzi LV, Berghe T, Vanlangenakker N, Buettner S, Eisenberg T, Vandenabeele P, Made F, Kroemer G. (2011).** Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int rev cell mol biol* 289:1–35.
105. **Gammie AE, Erdeniz N, Beaver J, Devlin B, Nanji A, Rose MD. (2007).** Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 177: 707 - 721.
106. **Ganske F. (2014).** UV absorbance DNA quantitation. *BMG LABTECH*.
107. **Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. (2011).** Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology* 76: 863–869.
108. **Garcia JF, Parker R. (2016).** Ubiquitous accumulation of 3' mRNA decay fragments in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs with chromosomally integrated MS2 arrays. *RNA* 22(5):657–659. doi:10.1261/rna.056325.116
109. **Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol biol cell* 11: 4241–4257.
110. **Gasch AP, Werner-Washburne M. (2002).** The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics*. 2(4-5):181-92. doi: 10.1007/s10142-002-0058-2. Epub. PMID: 12192591.
111. **Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, et al. (2006).** Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*. 440(7084):631-6. doi: 10.1038/nature04532. PMID: 16429126.

112. **Giaever G, Flaherty P, Kumm J, Proctor M, Nislow C, Jaramillo DF, Chu AM, Jordan MI, Arkin AP, Davis RW. (2004).** Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecule sin yeast. *Proc. natl. acad. Sci.U.S.A.* 101:793–798.
113. **Gillet LCJ, Schärer OD. (2006).** Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev.* 106:253–76.
114. **Go YM, Jones DP. (2013).** The redox proteome. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26512–26520.
115. **Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. (1996).** Life with 6000 genes. *Journal article. Science.* 274(5287):546, 563-7.
116. **Goosen N, Moolenaar GF. (2008).** Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst).* 7(3):353-79. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.09.002. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17951115.
117. **Granot D, Snyder M. (1993).** Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast:* 465 – 479.
118. **Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, Werner-Washburne M. (2004).** “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 187–206.
119. **Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. (1996).** Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* 1996;271(26):15504–15509.
120. **Guénolé F, Louis J, Creveuil C, Baleyte JM, Montlahuc C, Fournieret P, Revol O. (2013).** Behavioral profiles of clinically referred children with intellectual giftedness. *Biomed Res Int.* 2013:540153. doi: 10.1155/2013/540153. Epub. PMID: 23956988.
121. **Guerreiro N, Staedtler F, Grenet O, Kehren J, Chibout SD. (2003).** Toxicogenomics in drug development. *Toxicol. pathol.* 31, 471–479.
122. **Gunstone FD. (1996).** Fatty acid and lipid chemistry. Springer/Chapman and Hall. ISBN 9780751402537.
123. **Halford GM, Lordkipanidzé M, Watson SP. (2012).** 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams. *Platelets.* 23(6):415-22. doi: 10.3109/09537104.2011.632032. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22098129.
124. **Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999).** Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25.

125. **Hamagishi Y, Yoshimoto Y, Oki T. (1981).** Determination of guanosine tetraphosphate (ppGpp) and adenosine pentaphosphate (pppGpp) in various microorganisms by radioimmunoassay. Arch microbiol.; 130: 134–137. doi: 10.1007/BF00411065.
126. **Hampton MB, Orrenius S. (1997).** Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett. ;414(3):552-6. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01068-5. PMID: 9323034.
127. **Harbison ST, Yamamoto AH, Fanara JJ, Norga KK, Mackay TF. (2004).** Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. Genetics 166(4): 1807–1823.
128. **Hardie DG. (1999).** Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. Biochem Soc Symp 64:13–27.
129. **Hardie DG, Carling D, Carlson M. (1998).** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? Annual Review of Biochemistry. 67: 821–855.
130. **Harmes DC, Di Renzo J. (2009).** Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? J Mammary gland biol neoplasia, 2009, 14:19 - 27.
131. **Harper CE, Hernandez CJ. (2020).** Cell biomechanics and mechanobiology in bacteria: Challenges and opportunities. APL Bioeng. 4(2):021501. doi: 10.1063/1.5135585. PMID: 32266323.
132. **Hartwell LH. (2002).** Nobel Lecture. Yeast and cancer. Biosci Rep. 22(3-4):373-94. doi: 10.1023/a:1020918107706. PMID: 12516780.
133. **Hassan HM, Fridovich I. (1989).** Microbial superoxide dismutases. Advances in Genetics 26:65–97.
134. **Hayashi M, Ohkuni K, Yamashita I. (1998).** Control of division arrest and entry into meiosis by extracellular alkalinisation in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14, 905–913.
135. **Hayes JD, Pulford DJ. (1995).** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol. 30(6):445-600. doi: 10.3109/10409239509083491. PMID: 8770536.
136. **He Y, Leung KW, Ren Y, Pei J, Ge J, Tombran-Tink J. (2014).** PEDF improves mitochondrial function in RPE cells during oxidative stress. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 55(10), 6742–6755.
137. **Heidelberger C. (1975).** Chemical carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem. 44:79–121.

138. **Heinicke S, Livstone MS, Lu C, Oughtred R, Kang F, Angiuoli SV, White O, Botstein D, Dolinski K. (2007).** The Princeton protein orthology database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *Plos one* 2, e766.doi:10.1371/journal.
139. **Helen E, Adrian L. (2001).** Measurement of microvessel density in primary tumors. *Methods Mol Med.* 57:115–21. doi: 10.1385/1-59259-136-1:115. PMID: 21340894.
140. **Herdeiro MT, Figueiras A, Polónia J, Gestal-Otero JJ. (2005).** Physicians' attitudes and adverse drug reaction reporting: a case-control study in Portugal. *Drug Saf.* 28(9):825–33. doi: 10.2165/00002018-200528090-00007. PMID: 16119975.
141. **Herman PK. (2002).** Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:602–607.
142. **Hirshfield IN, Terzulli S, O'Byrne C. (2003).** Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci Prog.* 86(4):245–69. doi: 10.3184/003685003783238626. PMID: 15508892.
143. **Hockberger PE. (2002).** A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem Photobiol.* 76(6):561–79. doi: 10.1562/0031-8655(2002)0760561AHOUFP2.0.CO2. PMID: 12511035.
144. **Hodges PE, McKee AH, Davis BP, Payne WE, Garrels JI. (1999).** The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic acids res* 27(1):69–73. PMID: 9847145.
145. **Höglund A, Dönnies P, Blum T, Adolph HW, Kohlbacher O. (2006).** MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics.* 22(10):1158–65. doi: 10.1093/bioinformatics/btl002. PMID: 16428265.
146. **Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. (2007).** Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* 428:29–45.
147. **Hohmann S. (2002).** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66(2):300–372. doi:10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002.
148. **Hohmann S. (2002b).** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372.

149. **Hou J, Tyo KE, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J. (2012).** Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS yeast Res 12 (5): 491-510.
150. **Huang G, Chen S. (2017).** Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. Ultrason. Sonochem. 37:144–149.
151. **Huen MSY, Chen J. (2008).** The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. Cell Research 18(1): 8–16. doi:10.1038/cr.2007.109.
152. **Hunter K, Rose AH. (1972).** Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. Biochimica et Biophysica Acta. 260:639–653.
153. **Ishida T, Ando H, Fukuhara M. (1991).** Estimation of complex refractive index of soft particles and its dependence on soil chemical properties, Remote Sens. Environ. 38:173-182.
154. **Ishmayana S, Learmonth RP, Kennedy UJ. (2011).** Fermentation performance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in media with high sugar concentration. Proceedings of the 2nd International Seminar on Chemistry (pp. 379-385) Jatinangor, 24-25, ISBN 978-602-19413-1-7.
155. **Izawa S, Inoue Y, & Kimura A. (1996).** Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Journal, 320(1), 61–67.
156. **Jamieson DJ. (1992).** *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. J. Bacteriol. 174: 6678-6681.
157. **Jamieson, D. J. (1998).** Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14(16):1511–1527.
158. **Jelinsky SA, Estep P, Church GM, Samson D. (2000).** Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. Mol Cell Biol 20:8157–8167.
159. **Johanson K, Allen PL, Lewis F, Cubano LA, Hyman LE, Hammond TG. (2002).** *Saccharomyces cerevisiae* gene expression changes during rotating wall vessel suspension culture. J Appl Physiol (1985). 93(6):2171-80. doi: 10.1152/japplphysiol.01087.2001. PMID: 12391061.
160. **Johansson MT, Ellegaard HR, Tankisi H, Fuglsang-Frederiksen A, Qerama E. (2017).** Fasciculations in nerve and muscle disorders - A prospective study of muscle ultrasound compared to electromyography.

- Clin Neurophysiol. 128(11):2250-2257. doi: 10.1016/j.clinph.2017.08.031. PMID: 29028499.
161. **Johnston GC, Singer RA. (1980).** Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol gen et 178(2):357–360.
162. **Kandror O, Bretschneider N, Kreydin E, Cavalieri D, Goldberg AL. (2004).** Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. Mol Cell. 13(6):771-81. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00148-0. PMID: 15053871.
163. **Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. (2011).** *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. PLoS ONE 6(2): e16015.
164. **Kayingo G, Kilian SG, Prior BA. (2001).** Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress. Arch Microbiol. 177(1):29-35. doi: 10.1007/s00203-001-0358-2.
165. **Klaunig JE, Kamendulis LM. (2004).** The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 44:239-67. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851. PMID: 14744246.
166. **Klaus D, Simske S, Todd P, Stodieck L. (1997).** Investigation of space flight effects on *Escherichia coli* and a proposed model of underlying physical mechanisms. Microbiology (Reading). 143(2):449–455. doi: 10.1099/00221287-143-2-449. PMID: 9043122.
167. **Kleinig AR. (1997).** Cell disruption mechanics. Ph.D. thesis. Faculty of Engineering, University of Adelaide, Australia.
168. **Knijnenburg TA, Wessels LF, Reinders MJ, Shmulevich I. (2009).** Fewer permutations, more accurate P-values. Bioinformatics. 25(12):i161-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btp211. PMID: 19477983.
169. **Korovila I, Hugo M, Castro JP, Weber D, Höhn A, Grune T, Jung T. (2017).** Proteostasis, oxidative stress and aging. Redox Biol. 13:550–567. doi: 10.1016/j.redox. PMID: 28763764; PMCID: PMC5536880.
170. **Krause SA, John V. Gray. (2002).** Integration of nutrient signals by the cAMP-dependent protein kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 19(9):649–662.
171. **Krol K, Brozda I, Skoneczny M, Bretner M, Bretne M, Skoneczna A. (2015).** A genomic screen revealing the importance of vesicular trafficking pathways in genome maintenance and protection against genotoxic

- stress in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. Plos one. 10(3):e012070.
172. **Krulwich TA, Sachs G, Padan E. (2011).** Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. Nat Rev Microbiol. 9(5):330-43. doi: 10.1038/nrmicro2549. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21464825.
 173. **Kupiec M, Byers B, Esposito RE, Mitchell AP. (1997).** Meiosis and sporulation. In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Cell Cycle and Cell Biology. 3:889–1036.
 174. **Kusakabe M, Sun AC, Tyshchenko K, Wong R, Nanda A, Shanna C, Gusscott S, Chavez EA, Lorzadeh A, Zhu A, Hill A, Hung S, Brown S, Babaian A, Wang X, Holt RA, Steidl C, Karsan A, Humphries RK, Eaves CJ, Hirst M, Weng AP. (2019).** Synthetic modeling reveals HOXB genes are critical for the initiation and maintenance of human leukemia. Nat Commun. 10(1):2913. doi: 10.1038/s41467-019-10510-8. PMID: 31266935.
 175. **Lee KS, Levin DE. (1992).** Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. Mol Cell Biol 12:172–182.
 176. **Lee MH, Cho Y, Kim DH, Woo HJ, Yang JY, Kwon HJ, Yeon MJ, Park M, Kim SH, Moon C, Tharmalingam N, Kim TU, Kim JB. (2016).** Menadione induces G2/M arrest in gastric cancer cells by down-regulation of CDC25C and proteasome mediated degradation of CDK1 and cyclin B1. Am J Transl Res. 8(12):5246-5255. PMID: 28077999.
 177. **Lennon JT, Jones SE. (2011).** Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. Nat Rev Microbiol. 9(2):119-30. doi: 10.1038/nrmicro2504. PMID: 21233850.
 178. **Levine TP, Munro S. (2002).** Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns-4-kinase-dependent and – independent components. Current Biology. 12: 695-704.
 179. **Lew BD, Dempsey BK, Zhao Y, Muthalif M, Fatima S, Malik K. (1999).** β -hexosaminidase-induced activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase is dependent on p21Ras and protein kinase C and mediates bovine airway smooth muscle proliferation. Am J Respir Cell Mol Biol. 21(1):111-118. doi:10.1165/ajrcmb.21.1.3542.
 180. **Lillie SH, Pringle JR. (1980).** Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. Journal of Bacteriology. 143(3): 1384–1394. doi:10.1128/JB.143.3.1384-1394.1980.

181. **Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. (2002).** Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*. 10(3): 457–468.
182. **Longo VD, Fabrizio P. (2012).** Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem*. 57:101-21. doi: 10.1007/978-94-007-2561-4-5. PMID: 22094419.
183. **Lopes M, Foiani M, Sogo JM. (2006).** Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell*. 21:15 – 27.
184. **Lum PY, Armour CD, Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK, Butler JS, Hinshaw JC, Garnier P, Prestwich GD, Leonardson A, Garrett-Engele P, Rush CM, Bard M, Schimmack G, Phillips JW, Roberts CJ, Shoemaker DD. (2004).** Discovering modes of action for the rapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell*. 116:121–137.
185. **Lunn JE. (2008).** Sucrose metabolism. In *Encyclopedia of Life Science (ELS)* (Smith, A.M., ed.). Chichester, UK: Wiley, doi: 10.1002/9780470015902.a0021259.
186. **Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. (2001).** What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med*. 40(4):346-58. PMID: 11552348.
187. **Lushchak VI. (2014).** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 224:164–175.
188. **Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S. (1995).** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J*. 14:1360–1371.
189. **Lygre H, Moe G, Holmsen H. (2003).** Interaction of ibuprofen with eukaryotic membrane lipids. *Acta Odontol Scand*. 61(5):303-9. doi: 10.1080/00016350310006555. PMID: 14763783.
190. **Maisonhaute E, Prado C, White PC, Compton RG. (2002).** Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: Shear stress in ultrasonic cleaning. *Ultrason Sonochem*. 9(6):297-303. doi: 10.1016/s1350-4177(02)00089-5. PMID: 12404794.

191. **Mao P, Wyrick JJ, Roberts S A, Smerdon MJ. (2017).** UV-Induced DNA Damage and Mutagenesis in Chromatin. *Photochemistry and Photobiology*. 93(1), 216–228.
192. **Marchetti MA, Weinberger M, Murakami Y, Burhans WC, Huberman JA. (2006).** Production of reactive oxygen species in response to replication stress and inappropriate mitosis in fission yeast. *Journal of Cell Science*. 119(1), 124–131.
193. **Marcus G, Zoe Hilioti W, Sabbagh S, Paliwal A, Bergmann L, Bardwell A, Levchenko. (2008).** Oscillatory phosphorylation of yeast Fus3 MAP kinase controls periodic gene expression and morphogenesis. *Curr Biol*. 11; 18 (21): 1700–1706. doi:10.1016/j.cub.2008.09.027.
194. **Marot G, Foulley JL, Mayer CD, Jaffrézic F. (2009).** Moderated effect size and P-value combinations for microarray meta-analyses. *Bioinformatics*. 15;25(20):2692-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp444. PMID: 19628502.
195. **Marques WL, Mans R, Marella ER, Cordeiro RL, van den Broek M, Daran JG, Pronk JT, Gombert AK, van Maris AJ. (2017).** Elimination of sucrose transport and hydrolysis in *Saccharomyces cerevisiae*: a platform strain for engineering sucrose metabolism. *FEMS Yeast Res*. 17(1):fox006. doi: 10.1093/femsyr/fox006. PMID: 28087672.
196. **Marszalek PE, Oberhauser AF, Pang YP, Fernandez JM. (1998).** Polysaccharide elasticity governed by chair–boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature*. 396(6712): 661–664. doi:10.1038/25322.
197. **Martinez MJ, Roy S, Archuletta AB, Wentzell PD, Anna-Arriola SS, Rodriguez AL, Aragon AD, Quiñones GA, Allen C, Werner-Washburne M. (2004).** Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression and identification of novel essential genes. *Mol Biol Cell* 15(12):5295-305. PMID: 15456898.
198. **Martínez-Muñoz GA, Kane PM. (2008).** Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 283(29): 20309–20319. doi:10.1074/jbc.M710470200.
199. **Mata J, Nurse P. (1998).** Discovering the poles in yeast. *Trends in Cell Biology*. 8(4), 163–167. doi:10.1016/S0962-8924(98)01224-0.
200. **Mathiesen JM, Vedel L, Bräuner-Osborne H. (2013).** Chapter Eleven - cAMP Biosensors Applied in Molecular Pharmacological Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Methods in Enzymology*. 522:191-207.

201. **Maynert EW, Hammond BG. (1976).** Modes of action of toxic agents. *Ann Clin Lab Sci.* 6(4):322-31. PMID: 962296.
202. **Mayr JA, Kohlwein SD, Paltauf F. (1996).** Identification of a novel, Ca(2+)-dependent phospholipase D with preference for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 393(2-3):236-40. doi: 10.1016/0014-5793(96)00893-9. PMID: 8814297.
203. **Meikle AJ, Reed RH, Chudek JA, Gadd GM. (1988).** Natural abundance ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acrylic polyol and trehalose accumulation by several yeast species in response to salt stress, *FEMS Microbiol. Let.* 82, 163 - 168.
204. **Merritt NR. (1966).** *Journal of the Institute of Brewing*, 72, 374.
205. **Middelberg APJ. (1992).** A model for the disruption of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization, Ph.D. thesis, University of Adliade, Australia.
206. **Miermont A, Uhlenndorf J, McClean M, Hersen P. (2011).** The dynamical systems properties of the HOG signaling cascade. *J. Signal Transduct.* 2011:930940. doi:10.1155/2011/930940.
207. **Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro TF. (2008).** Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J.* 3:325 - 338.
208. **Miné-Hattab J, Rothstein R. (2013).** DNA in motion during double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* 23(11):529-36. doi: 10.1016/j.tcb.2013.05.006. PMID: 23867212.
209. **Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortigüela R, Marqués-Torrejón MA, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH. (2010).** Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell.* 7(1):78-89. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.016. PMID: 20621052.
210. **Mirzaei H, Regnier F. (2006).** Creation of allotypic active sites during oxidative stress. *J. Proteome Res.* 5, 2159 – 2168.
211. **Mitchell P. (1961).** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 191:144-8. doi: 10.1038/191144a0. PMID: 13771349.
212. **Miyazaki K. (2005).** A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9(6):415-25. doi: 10.1007/s00792-005-0458-z. PMID: 15999224.

213. **Mott R, Harrison A, Pearal F. (2002).** Quantifying the similarities within fold space. *J Mol biol.* doi: 10.1016/S0022-2836(02)00992-0.
214. **Moye-Rowley WS. (2003).** Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 381–389.
215. **Mullan A, Marsh A, (2019).** Advantages of using *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism. Oxford instruments.
216. **Muller LA, Lucas JE, Georgianna DR, McCusker JH. (2011).** Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis. *Mol Ecol* 20(19):4085-97.
217. **Munoz AJ, Wanichthanarak K, Meza E, Petranovic D. (2012).** Systems biology of yeast cell death. *FEMS yeast res* 12 (2):249-65.
218. **Muzzey D, Gomez-Urbe CA, Mettetal JT, van Oudenaarden A. (2009).** A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell*.138:160–171. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.047.
219. **Nair R, Shaffique T. (2002).** Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. *Appl biochem biotechnol* 102-103: 315-326.
220. **Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weisshart K. (2002).** Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 72:41 - 94.
221. **Natarajan K, Dave S, Bajaj HC, Tayade RJ. (2020).** Enhanced photocatalytic degradation of nitrobenzene using MWCNT/ β -ZnMoO₄ composites under UV light emitting diodes (LEDs). *Materialstoday Chemistry.* 17:100331.
222. **Nielsen J. (2009).** Systems biology of lipid metabolism: from yeast to human. *FEBS Lett.* 583(24):3905-13. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.054. PMID: 19854183.
223. **Nikolova M, Savova I, Marinov M. (2000-2002).** An Optimised Method For Investigation Of The Yeast Viability By Means Of Fluorescent Microscopy. *Journal Of Culture Collections.* 3:66-71.
224. **Niu L, Wu Z, Yang L, Wang Y, Xiang Q, Bai Y. (2021).** Antimicrobial Effect of UVC Light-Emitting Diodes against *Saccharomyces cerevisiae* and Their Application in Orange Juice Decontamination. *J Food Prot.* 84(1):139-146. doi: 10.4315/JFP-20-200. PMID: 32916700.
225. **Norkrans B. (1966).** Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature *Arch Microbiol*, 54 374 92.

226. **North M, Vulpe CD. (2010).** Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. *Int.J.mol.sci.* 11:4796–4813.
227. **Nyborg WL. (1982).** Ultrasonic microstreaming and related phenomena. *Br J Cancer Suppl.* 5:156-60. PMID: 6950752.
228. **Ochi K, Nishizawa T, Inaoka T, Yamada A, Hashimoto K, Hosaka T, Okamoto S, Ozeki Y. (2012).** Heterologous expression of a plant RelA-SpoT homologue results in increased stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulation of the bacterial alarmone ppGpp. *Microbiology (Reading)*, 158(Pt 8), 2213–2224.
229. **OIV. (2015).** RESOLUTION OIV-OENO 445-2015. Available from: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/resolutions-oiv/oenology-resolutions>.
230. **Oku K, Watanabe H, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tsujisaka Y, Komori M, Inoue Y, Sakurai M. (2003).** NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose, *J. Am. Chem. Soc.* 125:12739–12748.
231. **Oliver SG. (2002).** Functional genomics: lessons from yeast. *Phil trans R soc lond B* 357:17-23.
232. **Owsianowski E, Walter D, Fahrenkrog B. (2008).** Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1783:1303 - 1310.
233. **Özçelik B. (2007).** Fungi/bactericidal and static effects of ultraviolet light in 254 and 354 nm wavelengths. *Research Journal of Microbiology*, 2(1):42–49. doi: 10.3923/jm.2007.42-49.
234. **Pahlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L. (2001).** The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 276(5):3555-63.
235. **Palková Z, Wilkinson D, Váchová L. (2014).** Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Research.* 14(1):96–108.
236. **Palsson OS. (2006).** Standardized hypnosis treatment for irritable bowel syndrome: the North Carolina protocol. *Int J Clin Exp Hypn.* 54(1):51-64. doi: 10.1080/00207140500322933. PMID: 16316883.
237. **Peña A, Cinco G, García A. (1969).** Effect of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 148, 673, 82.

238. **Peña A, Cinco G, Gómez-Puyou A. (1972).** Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Biochem Biophys. 153, 413, 25.
239. **Perlstein EO, Ruderfer DM, Roberts DC, Schreiber SL, Kruglya L. (2007).** Genetic basis of individual difference sin the response to small molecule drugs in yeast. Nat.genet. 39: 496–502.
240. **Perrone GG, Tan SX, Dawes IW. (2008).** Reactive oxygen species and yeast apoptosis. Biochim Biophys Acta. 1783(7):1354-68. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.023. PMID: 18298957.
241. **Petelenz-Kurdziel E, Eriksson E, Smedh M, Beck C, Hohmann S, Goksor M. (2011).** Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Integr. Biol. (Camb.) 3:1120–1126. doi: 10.1039/c1ib00027f.
242. **Petranovic D, Nielsen J. (2008).** Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? Trends biotechnol. 26(11): 584 - 90.
243. **Phillips DH, Arlt VM. (2009).** Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. In: *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, Volume 1, A. Luch (Ed.), Experientia Supplementum (EXS) 99:87–110. doi:10.1007/978-3-7643-8336-7_4.
244. **Phipps CVG, Davies PJ, Hopley D. (1985).** The morphology of *Halimeda* banks behind the Great Barrier Reef east of Cooktown, Qld. Proc 5th Int Coral Reef Symp. 5:27–30.
245. **Pietzsch HJ, Gupta A, Reisgys M, Drews A, Seifert S, Syhre R, Spies H, Alberto R, Abram U, Schubiger PA, Johannsen B. (2000).** Chemical and biological characterization of technetium(I) and Rhenium(I) tricarbonyl complexes with dithioether ligands serving as linkers for coupling the Tc(CO)(3) and Re(CO)(3) moieties to biologically active molecules. Bioconjug Chem. 11(3):414-24. doi: 10.1021/bc990162o. PMID: 10821659.
246. **Pinon R. (1978).** Folded chromosomes in non-cycling yeast cells: evidence for a characteristic G0 form. Chromosoma. 67:263-274.
247. **Pitsillides AA, Blake SM, Glynn LE, Frost GT, Bitensky L, Chayen J. (1991).** The effect of menadione epoxide on the experimental immune arthritis in the rabbit. Int J Exp Pathol. 72(3):301-9. PMID: 1843258.
248. **Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. (2003).** Inactivation of microbes using ultrasound: a review. Int J Food Microbiol. 87(3):207-16. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00075-8. PMID: 14527793.

249. **Plesset J, Ludwig JR, Cox BS, McLaughlin CS. (1987).** Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 169, 779 - 784.
250. **Poljak A., Dawes IW., Ingelse BA., Duncan MW., Smythe GA., Grant CM., (2003).** Oxidative damage to proteins in yeast cells exposed to adaptive levels of H₂O₂. Redox Rep. 8(6):371-7. doi: 10.1179/135100003225003401. PMID: 14980070.
251. **Posas F, Saito H. (1997).** Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. Science. 276:1702–1705. doi:10.1126/science.276.5319.1702.
252. **Povey MJW, Mason TJ. (1998).** Eds., Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic and Professional, London, 105-126.
253. **Povirk LF, Bennett RAO, Wang P, Swerdlow PS, Austin MJF. (1994).** Single base-pair deletions induced by bleomycin at potential double-strand cleavage sites in the *aprt* gene of stationary phase Chinese hamster ovary D422 cells. Journal of Molecular Biology. 243(2): 216–226. doi:10.1006/jmbi.1994.1649.
254. **Pramila TS, Miles D, GuhaThakurta D, Jemiole LL, Breeden. (2002).** Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle. Genes Dev. 16:3034–3045.
255. **Rabow LE, Stubbe J, Kozarich JW. (1990).** Identification and quantitation of the lesion accompanying base release in bleomycin-mediated DNA degradation. Journal of the American Chemical Society. 112(8): 3196–3203. doi:10.1021/ja00164a049.
256. **Rainsford KD. (2003).** Discovery, mechanisms of action and safety of ibuprofen. Int J Clin Pract Suppl. (135):3-8.
257. **Rao P, Knaus EE. (2008).** Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. J Pharm Pharm Sci. 11(2):81s-110s. doi: 10.18433/j3t886. PMID: 19203472.
258. **Recknagel RO, Glende EA. (1973).** Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. CRC Crit. Rev. Tox. 2:263-297.
259. **Reed G, Nagodawithana TW. (1991).** Yeast technology. Van Nostrand Reinhold, New York, N.Y.
260. **Reimers M, Carey VJ. (2006).** Bioconductor: an open source framework for bioinformatics and computational biology. Methods Enzymol. 411:119-34. doi: 10.1016/S0076-6879(06)11008-3. PMID: 16939789.

261. **Ribeiro GF, Côte-Real M, Johansson B. (2006).** Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell.* 17(10):4584-91. doi: 10.1091/mbc.e06-05-0475.
262. **Richards ABS, Krakowka LB, Dexter H, Schmid APM, Wolterbeek DH, Waalkens-Berendsen A, Shigoyukif M, Kurimoto. (2002).** Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies, *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 871–898.
263. **Rockenfeller P, Madeo F. (2008).** Apoptotic death of ageing yeast. *Exp Gerontol.* 43(10):876-81. doi: 10.1016/j.exger.2008.08.044.
264. **Rodrigues-Pousada CA, Nevitt T, Menezes R, Azevedo D, Pereira J, Amaral C. (2004).** Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett.* 567(1):80-5. doi: 10.1016/j.febslet.2004.03.119.
265. **Rodriguez CE, Shinyashiki M, Froines J, Yu RC, Fukuto JM. (2004).** An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology.* 201:185–196.
266. **Roemer T, Madden K, Chang J, Snyder M. (1996).** Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev.* 10(7):777-93. PMID: 8846915.
267. **Rolland F, Moore B, Sheen J. (2002).** Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell.* 14(1), 185–205.
268. **Rome LH, Lands WE. (1975).** Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4863–4865.
269. **Rooney JA. (1988).** Other Nonlinear Acoustic Phenomena. In *Ultrasound Its Chemical, Physical, and Biological Effects*; Suslick, K. S., Ed.; VCH: New York, 65–96.
270. **ROTHSTEIN A, DEMIS C. (1953).** The relationship of the cell surface to metabolism; the stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch Biochem Biophys.* 44(1):18-29. doi: 10.1016/0003-9861(53)90005-8.
271. **Ruiz-Herrera J. (1992).** Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Rat6n.
272. **Rusconi R, Guasto JS, Stocker R, (2014).** Bacterial transport suppressed by fluid shear. *Springer Nature.* 10:212-217. DOI: 10.1038/nphys2883.

273. **Russell JB. (2007).** The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13(1-3):1-11. doi: 10.1159/000103591. PMID: 17693707.
274. **Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, Emam I, Farne A, Hastings E, Ison J, Keays M, Kurbatova N, Malone J, Mani R, Mupo A, Pedro PR, Pilicheva E, et al. (2013).** ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D987-90. doi: 10.1093/nar/gks1174.
275. **Rustici G., Kolesnikov N., Brandizi M., Burdett T., Dylag M, et al. (2013).** ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D987-90. doi: 10.1093/nar/gks1174. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23193272.
276. **Sá-Correia I, dos Santos SC, Teixeira MC, Cabrito TR, Mira NP. (2009).** Drug: H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends microbiol.* 17: 22–31.
277. **Salvadó Z, Arroyo-López FN, Guillamón JM, Salazar G, Querol A, Barrio E. (2011).** Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(7): 2292-2302. DOI: 10.1128/AEM.01861-10
278. **Sanchez Y, Lindquist SL. (1990).** HSP104 required for induced thermotolerance. *Science.* 248(4959):1112-5. doi: 10.1126/science.2188365. PMID: 2188365.
279. **Sapienza K, Bannister W, Balzan R. (2008).** Mitochondrial involvement in aspirin-induced apoptosis in yeast. *Microbiology (Reading)* 154(Pt 9):2740-2747.
280. **Scandalios JG. (2005).** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995–1014.
281. **Schellhorn HE, Stones VL. (1992).** Regulation of katF and katE in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J Bacteriol.* 174(14):4769-76. doi: 10.1128/jb.174.14.4769-4776.1992. PMID: 1385595.
282. **Schenberg-Frascino A., (1972).** Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. II. Recovery from thermolesions. *Mol Gen Genet.* 117(3):239-53. doi: 10.1007/BF00271651.
283. **Schieber M, Chandel NS. (2014).** ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology.* 24(10), R453–R462.
284. **Schneider R, Daum G. (2006).** Analysis of yeast lipids. *Methods Mol Biol.* 313:75-84. doi: 10.1385/1-59259-958-3:075. PMID: 16118426.

285. **Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR. (1986).** Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Nap p Kp), Kp- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319, 689–693.
286. **Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. (2003).** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13(11):2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303.
287. **Sharma KG, Kaur R, Bachhawat AK. (2002).** Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryotic Cell.* 391-400.
288. **Sharon I, Alperovitch A, Rohwer F, Haynes M, Glaser F, Atamna-Ismaeel N, Pinter RY, Partensky F, Koonin EV, Wolf YI, Nelson N, Béjà O. (2009).** Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. *Nature.* 461(7261):258-262. doi: 10.1038/nature08284.
289. **Sharon I, Alperovitch A, Rohwer F, Haynes M, Glaser F, Atamna-Ismaeel N, Pinter RY, Partensky F, Koonin EV, Wolf YI, Nelson N, Béjà O. (2009).** Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. *Nature.* 461(7261):258-262. doi: 10.1038/nature08284.
290. **Sheehan KB, McInerney K, Purevdorj-Gage B, Altenburg SD, Hyman LE. (2007).** Yeast genomic expression patterns in response to low-shear modeled microgravity. *BMC Genomics.* 8:3. doi: 10.1186/1471-2164-8-3. PMID: 17201921.
291. **Shimoda C, Nakamura T. (2004).** *Control of Late Meiosis and Ascospore Formation.* In: R. Egel (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe* (311–327). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-10360-9_20.
292. **Siderius M, Rots E, Mager WH. (1997).** High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology* 143(P10):3241-3250.
293. **Sies H, Cadenas E. (1985).** Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 311(1152), 617–631.
294. **Simchen G, Piñon R, Salts Y. (1972).** Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Premeiotic DNA synthesis, readiness and commitment. *Experimental Cell Research.* 75(1):207-218.
295. **Simmons DL, Botting RM, Hla T. (2004).** Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56: 387–437.

296. **Simon JA, Bedalov A. (2004).** Yeast as a model system for anti - cancer drug discovery. *Nat.rev. Cancer.* 4:481–492.
297. **Simpson-Lavy KJ, Martin Kupiec. (2023).** The Snf1/AMPK pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: from glucose sensing to global metabolic regulation. *Current Genetics.* 69: 1–14.
298. **Smith AM, Ammar R, Nislow C, Giaever G. (2010).** A survey of yeast genomic assays for drug and target discovery. *Pharmacol. ther.* 127:156–164.
299. **Smith ED, Tsuchiya M, Fox LA, Dang N, Hu D, Kerr EO. (2008).** Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species. *Genome res.* 18(4): 564-570.
300. **Smith JA, Jarman M, Osborn M. (1999).** Doing interpretative phenomenological analysis. In: Murray, M. and Chamberlain, K., Eds., *Qualitative Health Psychology: Theories and Methods*, Sage, London, 218-241.
301. **Solecki M, Agnieszka T, Kacprowicz A. (2021).** The effect of cell size on the kinetics of yeast disintegration in a bead mill. *Powder Technology* Volume 380, Pages 584-597.
302. **Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E. (2008).** Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 45(5), 667–678.
303. **Srivastava AK, Penna S, Nguyen DV, Tran LS. (2016).** Multifaceted roles of aquaporins as molecular conduits in plant responses to abiotic stresses. *Crit Rev Biotechnol.* 36(3):389-98. doi: 10.3109/07388551.2014.973367. PMID: 25430890.
304. **Stadtman ER. (1992).** Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1355616>
305. **Stark C, Breitkreutz BJ, Chatr-Aryamontri A, Boucher L, Oughtred R, Livstone MS, Nixon J, Van Auken K, Wang X, Shi X, Reguly T, Rust JM, Winter A, Dolinski K, Tyers M. (2011).** The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue):D698-704. doi: 10.1093/nar/gkq1116.
306. **Starritt HC, Duck FA, Humphrey VF. (1989).** An experimental investigation of streaming in pulsed diagnostic ultrasound beams. *Ultrasound Med Biol.* 15(4):363-73. doi: 10.1016/0301-5629(89)90048-3.
307. **Stefanini GG, Holmes DR. (2013).** Drug-eluting coronary-artery stents. *N Engl J Med.* 368(3):254-65. doi: 10.1056/NEJMra1210816.

308. **Stephen DW, Rivers SL, Jamieson DJ. (1995).** The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol microbiol.* 16(3): 415–423.
309. **Sultana R, Butterfield DA. (2010).** Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 19(1), 341–353.
310. **Sun S, Gresham D. (2021).** Cellular quiescence in budding yeast. *Yeast.* 8(1):12-29. doi: 10.1002/yea.3545. PMID: 33350503.
311. **Swen JJ, Huizinga TW, Gelderblom H, De Vries EGE, Assendelft WJJ, Kirchheiner J, Guchelaar HJ. (2007).** Translating pharmacogenomics: challenges on the road to the clinic. *Plosmed.* 4, e209. doi:10.1371/journal.
312. **Tai SL, Daran-Lapujade P, Luttik MA, Walsh MC, Diderich JA, Krijger GC, van Gulik WM, Pronk JT, Daran JM. (2007).** Control of the glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature: a multi-level analysis in anaerobic chemostat cultures. *J Biol Chem.* 282(14):10243-51.
313. **Taylor FR, Parks LW. (1979).** Triacylglycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* in relation to phospholipids synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 575: 204–214.
314. **Taylor GR. (1974).** Space Microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 28:121–137. 2946 10.1146/annurev.mi.28.100174.001005.
315. **Teixeira MC, Fernandes AR, Mira NP, Becker JD, Sa-Correia I. (2006a).** Early transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress imposed by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Yeast Res.* 6,230-248.
316. **Than K. (2011).** Bacteria Grow Under 400,000 Times Earth's Gravity. FOR NATIONAL GEOGRAPHIC NEWS.
317. **Thevelein JM. (1984).** Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev.* 48(1):42-59. doi: 10.1128/mr.48.1.42-59.1984. PMID: 6325857; PMCID: PMC373002.
318. **Todorova T, Miteva D, Chankova S. (2015b).** DNA damaging effect of zeocin and methyl methansulfonate in *Saccharomyces cerevisiae* measured by CFGE. *Comptes Rendus de l'Acad'Emie Bulgare des Sciences.* 68(1): 71–78.
319. **Todorova T, Miteva D, Chankova S. (2019).** DNA susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* to Zeocin depends on the growth phase.

320. **Tomova AA, Kujumdzieva AV, Petrova VY. (2019).** Carbon source influences *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell survival strategies: quiescence or sporulation, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33:1, 1464-1470, DOI: 10.1080/13102818.2019.1674188.
321. **Torres CA, Dephoure N, Panneerselvam S, Gygi SP. (2002).** The role of TOR signaling in growth control and ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 13(5), 2039–2050.
322. **Tribouillard D, Bach S, Gug F, Des-ban N, Beringue V, Andrieu T, Dormont D, Galons H, Laude H, Vilette D, Blondel M. (2006).** Using budding yeast to screen for antiprion drugs. *Biotechnol. J.* 1, 58 - 67.
323. **Tsukada M, Yoshinori Ohsumi. (1993).** Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1–2), 169–174.
324. **UK Essays. (2018).** Impacts and Importance of New Product Development Marketing Essay. University of Munich..
<https://www.ukessays.com/essays/marketing/impacts-and-importance-of-new-product-development-marketing-essay.php?vref=1>.
325. **Valadi A, Granath K, Gustafsson L, Adler L. (2004).** Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J Biol Chem*. 279(38):39677–85. doi: 10.1074/jbc.M403310200. PMID: 15210723.
326. **van Leeuwen JS, Orij R, Luttik MAH, Smits GJ, Vermeulen NPE, Vos JC. (2011).** Subunits Rip1p and Cox9p of the respiratory chain contribute to diclofenac-induced mitochondrial dysfunction. *Microbiology*. 157(3):685–694.
327. **van Leeuwen JS, Orij R, Luttik MAH, Smits GJ, Vermeulen NPE, Vos JC. (2011).** Subunits Rip1p and Cox9p of the respiratory chain contribute to diclofenac-induced mitochondrial dysfunction. *Microbiology*. 157(3):685–694.
328. **Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT. (2008).** Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*. 70(19):1672–7. doi: 10.1212/01.wnl.0000311269.57716.63.
329. **Vogel K, Hinnen A. (1990).** The yeast phosphatase system *Mol Microbiol*. 4 2013 7.

330. **Wallbank AM, Ingridlebttag W, Meyer W, Boehm P. (1985).** Inactivation of bacteria and viruses in water: Passage of germicidal ultraviolet light through Teflon. *Lab. Anim.* 19: 273–274.
331. **Wang Y, Shirogane T, Liu D, Harper JW, Elledge SJ. (2003).** Exit from exit: resetting the cell cycle through Amn1 inhibition of G protein signaling. *Cell* 112(5):697–709.
332. **Watson MS. (2006).** Environmental Influences on Microbial Growth. THE VIRTUAL EDGE: Lab 6 Cultivation of Bacteria II. *Cell*: 307-760-2942.
333. **Watson PF, Morris GJ. (1987).** Cold shock injury in animal cells. *Symp Soc Exp Biol.* 41:311–40. PMID: 3332489.
334. **Wei AA. (2021).** The Effect of Temperature on Microorganisms Growth Rate. *The Expedition.* Vol. 10.
335. **Wemmie JA, Steggerda SM, Moye-Rowley WS. (1997).** The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *J. Biol. chem.* 272:7908–7914.
336. **Werner-Washburne ME, Braun GC, Johnston RA, Singer., (1993).** Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57:383–401.
337. **Wilk A. (2007).** Pharmacopeia. *Pharmacopeial Forum: Volume No.* 29(5); 1531.
338. **Williams JP, Hallsworth JE. (2009).** Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? *Environ Microbiol.* 11(12):3292-308. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02079.x.
339. **Winderickx J, Delay C, De Vos A, Klinger H, Pellens K, Vanhelfmont T, Van Leuven F, Zabrocki P. (2008).** Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul;1783(7):1381–95. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.020.
340. **Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ. (2010).** Antioxid Redox Signal. 12:393.
341. **Wong YT, Gruber J, Jenner AM, Tay FEH, Ruan R. (2010).** Chronic resveratrol intake reverses pro-inflammatory cytokine profile and oxidative DNA damage in ageing hybrid mice. *Age (Dordr)*, 33(3):229–246.
342. **Wordon BA, Mortimer B, McMaster LD. (2012).** Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International.* 47(2) :134–139.

343. **Xu W, San Lucas A, Wang Z, Liu Y. (2014).** Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*. 15 (7):S4. doi: 10.1186/1471-2105-15-S7-S4. PMID: 25077573.
344. **Xu Z, Liang YS, Lin D, Chen BL. (2016).** Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Curr. Microbiol*. 73:474-482.
345. **Xu ZL, Li E, Shirtliff MJ, Alam S, Yamasaki. (2009).** Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China *J. Clin. Microbiol*. 47:230-234.
346. **Yagiela JA, Down FG, Johnson BS, Mariotti AJ, Neidle EA. (2011).** Pharmacology and therapeutics for dentistry. Mosby Elsevier. ISBN: 978-0-323-05593-2
347. **Yancey PH, (2005).** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* 208:2819-2830.
348. **Yang Q, Zhang R, Tang P, Sun Y, Johnson C, Saredy J, Wu S, Wang J, Lu Y, Saaoud F, Shao Y, Drummer C, Xu K, Yu D, Li R, Ge S, Jiang X, Wang H, Yang X. (2021).** Ultrasound May Suppress Tumor Growth, Inhibit Inflammation, and Establish Tolerogenesis by Remodeling Innatome via Pathways of ROS, Immune Checkpoints, Cytokines, and Trained Immunity/Tolerance. *J Immunol Res*. 2021:6664453. doi: 10.1155/2021/6664453. PMID: 33628851.
349. **Zhang L, Zhao H, Gan M, Jin Y, Gao X, Chen Q, Guan J, Wang Z. (2011).** Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresour Technol*. 102(6):4573–9.
350. **Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A, Lee CC. (2001).** Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*. 105(5):683–94. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00380-4. PMID: 11389837.
351. **Zheng DQ, Wang YT, Zhu YX, Sheng H, Li KJ, Sui Y, Zhang K. (2022).** Uncovering Bleomycin-Induced Genomic Alterations and Underlying Mechanisms in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 88(2):e0170321. doi: 10.1128/AEM.01703-21.
352. **Zheng P, Zhang M, Khan MH, Liu H, Jin Y, Yue J, Gao Y, Teng M, Zhu Z, Niu L. (2019).** Crystallographic Analysis of the Catalytic

- Mechanism of Phosphopantothienoylcysteine Synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. . J Mol Biol- 431(4):764–776.
353. **Zhou Y, Kastiris PL, Dougherty SE, Bouvette J, Hsu AL, Burbaum L, Mosalaganti S, Pfeffer S, Hagen WJH, Förster F, Borgnia MJ, Vogel C, Beck M, Bartsaghi A, Silva GM. (2020).** Structural impact of K63 ubiquitin on yeast translocating ribosomes under oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA. 117(36):22157-22166. doi: 10.1073/pnas.2005301117. PMID: 32855298.
 354. **Marinovska P, Todorova T, Tomova A, Pisareva E, Boyadzhiev K, Dimitrov M, Parvanova P, Dimitrova M, Chankova S, Petrova V. (2022).** *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells as a test system for assessing Zeocin toxicity. Current trends of ecology. BioRisk. 17:105–116.
 355. **Marinovska PG, Todorova TI, Boyadzhiev KP, Pisareva EI, Tomova AA, Parvanova PN, Dimitrova M, Chankova SG, Petrova VY. (2022).** Cellular susceptibility and oxidative stress response to menadione of logarithmic, quiescent, and nonquiescent *Saccharomyces cerevisiae* cell populations. Current trends of ecology. BioRisk. 17:127–138.
 356. **Мариновска П, 2023.** Състояние на покой при дрожди *Saccharomyces cerevisiae* – модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор. Дисертационен труд. COBISS.BG-ID – 62129416.