



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Irmantas Arūnas Čiužas

**Mikrogravitacijos poveikis skirtingą telomerų ilgį turinčių
mielių žūčiai bei atsparumui priešgrybeliniams junginiams**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Prof. Eglė Lastauskienė

Darbas atliktas

GMC Biomokslų instituto Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijoje

Turinys

Įvadas	3
1. Literatūros apžvalga	5
1.1. Kosmoso sąlygų poveikis astronautams.....	5
1.1.1. Kosmoso sąlygų poveikis mikroorganizmams	7
1.1.2. Simuliuota mikrogravitacija	8
1.2. Telomerų vaidmuo ląstelėje.....	10
1.2.1. Telomerų ilgio pokyčiai mikrogravitacijoje.....	12
1.3. Mielės – modeliniai organizmai mikrogravitacijos tyrimuose	13
1.3.1. Mikrogravitacijos poveikis <i>S. cerevisiae</i> ląstelėms.....	13
1.4. Priešgrybelinių junginių poveikis mielėms.....	14
1.5. Mielių ląstelių žūties tipai	15
1.6. Mikrogravitacijos poveikis ląstelių žūčiai.....	16
2. Medžiagos ir metodai	18
2.1. Medžiagos.....	18
2.1.1. Reagentai, buferiai ir rinkiniai.....	18
2.1.2. Prietaisai.....	18
2.1.3. Mitybinės terpės ir priedai.....	18
2.2. Metodai.....	19
2.2.1. Tyrimo objektas.....	19
2.2.2. Mikrobiologinis genotipavimas.....	19
2.2.3. Minimalių inhibitorinių koncentracijų nustatymas.....	20
2.2.4. Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas	20
2.2.5. Reaktyvių deguonies formų įvertinimas.....	20
2.2.6. Aktyvių kaspazių nustatymas.....	21
2.2.7. Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymas	21
2.2.8. Statistinė duomenų analizė	21
3. Rezultatai ir jų aptarimas	22
3.1. Priešgrybelinių junginių MIK nustatymas	22
3.2. Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas.....	22
3.3. ROS susidarymo nustatymas	24
3.4. Aktyvių kaspazių identifikavimas	27
3.5. Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymas.....	28
Išvados	31
Autoriaus asmeninis indėlis	32
Rezultatų sklaida	33
Padėka	34
Santrauka	35
Abstract	36
Literatūros sąrašas	37

Išvadas

Astrobiologija – tai plati tarpdisciplininė mokslo sritis, tirianti ne tik gyvybės Visatoje kilmę, ankstyvą evoliuciją, pasiskirstymą, bet ir jos ateitį Žemėje, tirdama deterministines sąlygas ir atsitiktinius įvykius, kurie galbūt lėmė gyvybės atsiradimą. Astrobiologija tiria galimas vietas už Žemės ribų, kurios galėtų palaikyti gyvybę, pavyzdžiui, Marsas, Europa ir egzoplanetos. Atliekami ekstremofilų gyvenančių atšiaurioje Žemės aplinkoje tyrimai, taip pat ieškoma biopėdsakų galinčių įrodyti esančią arba buvusią gyvybę už Žemės ribų. Vienas iš pagrindinių astrobiologijos tikslų yra suprasti besikeičiančius ryšius tarp Žemės ir jos biotos ir tai, kaip gyvybė reaguoja į aplinkos pokyčius visos planetos mastu (Prasad *et al.*, 2021). Astrobiologija taip pat yra susijusi su gyvybės Žemėje kilmės ir ankstyvosios evoliucijos mokslu. Yra siekiama suprasti sąlygas, kurios būtinos gyvybei formuotis, kaip gyvybė atsirado iš negyvosios materijos ir kaip ji išsivystė, tapdama įvairia organizmų įvairove, kurią matome šiandien (Kumar, Steele and Wickramasinghe, 2020).

Mikrogravitacija yra gravitacijos, kuri yra viena iš keturių pagrindinių fizikos jėgų, lemiančių masės pagreitį, sumažėjimas. Visi gyvieji organizmai, įskaitant žmogų, prisitaikė prie Žemės gravitacijos, kuri nekito nuo pat Žemės susikūrimo. Gravitacijos pokytis, bet kuria kryptimi, gali sukelti daugybę pokyčių organizmuose, pradedant metabolizmu ir baigiant konservatyvesnėmis sistemomis. Gravitacijos poveikio gyviesiems organizmams tyrimai yra labai svarbūs ilgalaikėms gyvybės palaikymo sistemoms ir darbui kosminėse stotyse arba Mėnulio ir planetų bazėse, kur gravitacinės jėgos ženkliai skiriasi (Dubinin and Vaulina, 1974).

Pirmoji kelionė į kosmosą buvo vienas didžiausių žmogaus pasiekimų, kuris atvėrė naują technologijų erą. Iki pat šių dienų projektuojami ir kuriami erdvėlaiviai, kurie tikimasi, ateityje bus naudojami tolimoms pilotuojamoms kelionėms į Marsą ar kitas planetas, tačiau per kelis dešimtmečius trukusių tyrimų, buvo pastebėtas neigiamas kosmoso sąlygų poveikis gyviesiems organizmams. Labiausiai kosmoso sąlygų neigiamą poveikį pajunta astronautai, kurie Tarptautinėje kosminėje stotyje neretai praleidžia net ir iki pusės metų. Per tiek laiko suprastėja beveik visos žmogaus organų sistemos. Labiausiai pastebimas pokytis, tai raumeninės ir kaulinės masės sumažėjimas. Taip pat didžiuliu iššūkiu tolimoms kosminėms kelionėms tampa nusilpusi astronautų imuninė sistema. Taip nutinka, nes mikrogravitacijos sąlygos lemia kai kurių imuninių ląstelių aktyvumo sumažėjimą, į organizmą patekę patogenai ne visada iššaukia imuninės sistemos atsaką (Paulsen *et al.*, 2010). Mikroorganizmai pilotuojamose misijose yra neišvengiami, nes jų galima rasti ant kosminių skrydžių įrangos, skafandrų ir jie yra astronautų mikrobiotos dalis. Susirūpinimą kelia patogeniniai mikroorganizmai bei virusai, kurių pasikeitusi fiziologija veda prie sukeliama ligų atsiradimo. Dabar jau yra žinoma, kad kosmoso sąlygos sukelia tam tikrus fiziologinius ir fenotipinius mikroorganizmų pokyčius. Tai apima

augimo kinetikos ir antrinių metabolitų gamybos pokyčius bei sumažėjusį jautrumą priešmikrobiniams junginiams (Perfect, 2017).

Yra žinoma, kad ilgi skrydžiai keičia astronautų telomerų ilgį kosminių misijų metu. Telomerų ilgio kitimas susijęs su senėjimo ir atsako į stresą procesais (Czepielewski *et al.*, 2016; J *et al.*, 2019), tačiau tyrimų, siejančių telomerų ilgio pokyčius mikrogravitacijoje ir atsparumą priešgrybeliniams junginiams bei ląstelių žūčiai trūksta. Todėl šiame tyrime, naudojant mieles, kaip modelinę eukariotinę sistemą, siekiama išsiaiškinti, kaip mikrogravitacija paveikia mielių, turinčių skirtingą telomerų ilgį žūtį ir atsparumą priešgrybeliniams junginiams.

Darbo tikslas – Nustatyti mikrogravitacijos poveikį skirtingą telomerų ilgį turintiems mielių *Saccharomyces cerevisiae* kamienams.

Uždaviniai:

1. Nustatyti minimalias inhibitorines koncentracijas (toliau MIK) priešgrybeliniams junginiams mikrogravitacijos (toliau MG) ir įprastos gravitacijos (toliau G) sąlygomis.
2. Įvertinti mielių gyvybingumą laike po poveikio priešgrybeliniais junginiais MG ir G sąlygomis.
3. Nustatyti mielių atsparumą reaktyvioms deguonies formoms po poveikio priešgrybeliniais junginiais MG ir įprastos G sąlygomis.
4. Įvertinti aktyvias kaspazes turinčių mielių ląstelių skaičiaus pokytį po poveikio priešgrybeliniais junginiais MG ir G sąlygomis.
5. Nustatyti mielių žūties tipo pokyčius MG ir įprastos G sąlygomis.

1. Literatūros apžvalga

Tolimos kosminės misijos tampa realybe. Remiantis NASA (Nacionalinės aeronautikos ir kosmoso administracija) ir EKA (Europos kosmoso agentūra) vadovaujama Artemis programa, astronautai Mėnulyje turėtų nusileisti iki 2026 m. Būsimomis misijomis siekiama išplėsti kosmoso tyrinėjimo ribas, keliaujant toliau nei bet kada anksčiau. NASA ir EKA kartu su keliomis komercinėmis kosmoso kompanijomis jau pradėjo ruošti ilgalaikiams įgulos skrydžiams į kosmosą ir artimiausiu metu planuoja ištirti vidines Saulės sistemos planetas. (van der Meer *et al.*, 2023).

Augant kosminiam turizmui, artimiausiais metais kelionės į kosmosą taps perspektyvia verslo, medicinos ir technologijų niša. Tačiau dabartiniai duomenys apie žmonių sveikatą kosmose išlieka riboti, ypač apie trumpalaikių ir ilgalaikių misijų poveikį. Kosmoso sąlygas galima suskirstyti į egzogeninius veiksnius, tokius kaip kosminė spinduliuotė ir mikrogravitacija, ir endogeninius veiksnius, įskaitant natūralaus žmogaus cirkadinio ritmo ir psichologinės sveikatos sutrikimus, kurie gali atsirasti dėl uždaro, izoliacijos, fizinio neveiklumo ir ribotos socialinės sąveikos. Šios egzogeninės ir endogeninės įtakos vaidina pagrindinį vaidmenį keičiant astronautų imuninės sistemos funkciją (Crucean *et al.*, 2018). Kosminių misijų iššūkiai yra susiję ne tik su techniniais sprendimais, tokiais kaip spinduliuotės apsauga, apsauganti astronautus nuo mirtinų kosminės spinduliuotės lygių, bet ir biologiniais sprendimais. Erdvėlaivių vidus nėra sterilus – mikroorganizmai patenka per įvairią įmontuojamą įrangą ir pačius astronautus. Kosmoso sąlygos veikia astronautų mikrobiotą ir ant paviršių esančius mikroorganizmus, todėl gali atsirasti fiziologinių ir fenotipinių pokyčių, dėl kurių gali padidėti atsparumas antimikrobinėms medžiagoms (Zea *et al.*, 2017).

1.1. Kosmoso sąlygų poveikis astronautams

Per pastaruosius šešiasdešimt metų kosmoso tyrinėjimai padarė didelę pažangą, o astronautai dabar Tarptautinėje kosminėje stotyje (TKS) dažnai praleidžia iki šešių mėnesių. TKS skrieja didesniame nei 400 kilometrų aukštyje, ją veikia atšiauri aplinka, apimanti jonizuojančiąją spinduliuotę, vakuumą, ekstremalius temperatūros svyravimus, mikrogravitaciją ir įvairius kitus pavojingus veiksnius žmonių gyvybei (Thirsk *et al.*, 2009). Tarptautinė kosminė stotis nuo 2000 metų nuolat buvo užimta 3–7 astronautų įgulų, kurios paprastai ten praleisdavo 6 mėnesių trukmės misijoms. Pagrindiniai veiksniai, keičiantys žmogaus organizmo funkcionavimą kosmose, yra mikrogravitacija ir kosminės spinduliuotės poveikis. TKS, skriejanti žema Žemės orbita, yra veikiamą trijų pirminių spinduliuotės šaltinių: galaktikos kosminių spindulių, saulės energijos dalelių ir įstrigusių protonų bei elektronų Van Allen juostose. Šie spinduliuotės šaltiniai sukuria sudėtingą spinduliuotės aplinką tiek TKS viduje, tiek už jos ribų (Benton and Benton, 2001).

Radiacijos lygis žemojoje Žemės orbitoje yra mažas, lyginant su Mėnuliu, Marsu ar giliuoju kosmosu, nes Žemę saugo galingas magnetinis laukas (Zeitlin *et al.*, 2019). Anksčiau minėtos spinduliuotės formos gali pažeisti žmogaus ląsteles, audinius ir organus. Apsisaugoti nuo šių spindulių yra labai sudėtinga, o įprasti fiziniai apsaugos metodai negali veiksmingai apsaugoti astronautų (Guo, Zhou and Hu, 2022). Žemės vidutinė metinė natūrali radiacijos apšvita yra maždaug 2,4 milisiverto (mSv). TKS 6 mėnesių apšvita apibrėžiama nuo 50 mSv iki 100 mSv. doze, o Marso misijos apšvita yra nuo 870 mSv iki 1200 mSv. (Tomsia *et al.*, 2024). Dėl sparčios kosmoso inžinerijos ir technologijų pažangos bei augančio komercinių kosminių skrydžių populiarumo, svarbu nuodugniai ištirti kosminės aplinkos poveikį žmogaus organizmui. Žinios apie atskirų audinių ir organų prisitaikymo prie kosmoso aplinkos, leistų sukurti metodus, užkertančius kelią ilgų misijų kosmose neigiamiems padariniams. Išsami rizikos analizė yra pagrindinis šio proceso elementas. Tai apima didelių pavojų, kylančių skrydžiams į kosmosą, nustatymą remiantis kosminių misijų elementais: paskirties vieta, trukmė, gravitacine ir radiacine aplinka (Romero and Francisco, 2020).

Kita, tačiau ne mažiau pavojinga kosminės spinduliuotės forma yra ultravioletinė (UV) spinduliuotė, natūrali Saulės gaminama energijos dalis. Šio tipo elektromagnetinės spinduliuotės bangos ilgis yra nuo 10 nm iki 400 nm – trumpesnis nei matoma šviesa, bet ilgesnis nei rentgeno spinduliai. Priklausomai nuo poveikio biologinėms sistemoms, UV spinduliuotė skirstoma į tris kategorijas: UV-C (< 280 nm), UV-B (nuo 280 nm iki 315 nm) ir UV-A (nuo 315 nm iki 400 nm). Energingiausią iš jų, UV-C, beveik visiškai sugeria ozono sluoksnis Žemės stratosferoje, o UV-B ir UV-A sugeba prasiskverbti į atmosferą ir pasiekti paviršių (Singh *et al.*, 2017). Nors UV-B sudaro labai nedidelę visos Žemę pasiekiančios saulės energijos dalį – mažiau nei 0,5 %, didelė jo energija padaro žalą ląstelių struktūroms, tokioms kaip DNR, RNR, baltymai ir lipidai, nes šios molekulės lengvai sugeria UV spinduliuotę (Dai, Furness and Upadhyaya, 2004). Tačiau kosmose UV-C spinduliuotė yra daug intensyvesnė ir gausesnė, nes nėra jokios apsaugos. Marse UV-B spinduliuotės lygis yra daug didesnis nei Žemėje, todėl mokslininkai daro prielaidą, kad bet kokia egzistuojanti mikrobinė gyvybė turėtų glūdėti giliai po planetos uolienų pluta, kad būtų išvengta mirtinos radiacijos poveikio (Rontó *et al.*, 2003). Dėl šios priežasties kuriant patikimas gyvybės palaikymo sistemas ilgalaikėms misijoms reikia giliai suprasti, kaip tokia ekstremalios kosminės spinduliuotės aplinka daro įtaką ne tik žmogaus fiziologijai, bet ir kitų gyvųjų organizmų, už Žemės ribų, biologijai.

Parodyta, kad iki 50 % astronautų, grįžtančių iš kosminių misijų, susilpnėja imuninė sistema, todėl netrukus po nusileidimo jie tampa jautresni bakterinėms, grybelinėms ir virusinėms infekcijoms (Mehta *et al.*, 2013). Su oda susijusios būklės, tokios kaip atopinis ir kontaktinis dermatitas, folikulitas ir aknė, taip pat gali pablogėti po misijos (Paulsen *et al.*, 2010; Crucian *et al.*, 2016). Be to, grįžtantiems astronautams padažnėja alerginės reakcijos, sumažėja T ir B limfocitų skaičius, pakinta jų

morfologija ir aktyvacija (Crucian *et al.*, 2008). Pastebėta, kad mažėja makrofagų aktyvumas (Moreno-Villanueva *et al.*, 2018), o interleukinų ir chemokinų išsiskyrimas tampa nereguliarus (Thiel *et al.*, 2017). Be to, NASA mokslininkai nustatė telomerų ilgio, padidėjusį uždegiminių citokinų kiekį ir su imuniniu atsaku susijusių genų raiškos pokyčius (Garrett-Bakelman *et al.*, 2019). Šiuo metu trūksta duomenų apie radiacijos lygį giliajame kosmose bei kitose planetose ir sunku nuspėti, kokią įtaką tai darytų gyviesiems organizmams, nes iki šiol buvo atliktos tik kelios nepilotuojamos tarpplanetinės misijos.

1.1.1. Kosmoso sąlygų poveikis mikroorganizmams

Mikroorganizmai gyveno Žemėje milijardus metų ir, evoliuciškai prisitaikę, išvystė gebėjimą išgyventi ekstremaliausioje planetos aplinkoje. Pavyzdžiui, hipertermofilinė bakterija *Geogemma barossii* gali atlaikyti iki 130 °C temperatūrą (Kashefi and Lovley, 2003), o *Deinococcus geothermalis* gali augti net –25 °C temperatūroje (Frösler ir kt., 2017). Įrodyta, kad kai kurie mikroorganizmai taip pat gali ištvirti atšiaurias kosmoso sąlygas tiek TKS viduje, tiek už jos ribų. Vienas iš labiausiai ištirtų pavyzdžių yra *Deinococcus radiodurans*, bakterija, turinti genų rinkinį, leidžianti jai efektyviai vykdyti DNR reparacijos procesus. Tai leidžia toleruoti iki 200 kartų didesnę radiacijos dozę nei įprastai yra Žemės paviršiuje. Ilgalaikio poveikio eksperimento metu buvo įrodyta, kad *D. radiodurans* geba išgyventi trejus metus TKS išorėje, išlaikydamas savo gyvybingumą (Kawaguchi *et al.*, 2020).

Kosminės spinduliuotės ir mikrogravitacijos poveikis sukelia didelį oksidacinį ir osmosinį stresą mikroorganizmų ląstelėse, sukeldamas molekulinį reakcijų kaskadą, kuri lemia pokyčius genų raiškos lygmenyje. Šie pokyčiai gali sutrikdyti pagrindinius medžiagų apykaitos procesus, susijusius su angliavandeniais, baltymais ir lipidais (Zhang, Fang and Liu, 2015). Tai susiję su substrato koncentracijos mažėjimu, ląstelės daugiau savo ribotų išteklių skiria genomo transkripcijai, reikalingai išplėsti alternatyvių anglies šaltinių paieškai, net jei jie nepasiekiami. Manoma, kad bakterijos tai daro siekdamos padidinti savo gebėjimą greitai pakeisti anglies katabolizmo kelius, atsiradus naujam substratui (Liu *et al.*, 2005). Taip pat buvo pastebėti reikšmingi mikroorganizmų ląstelių apvalkalo struktūrinio vientisumo ir funkcionalumo pokyčiai kosmoso sąlygomis. Tai apima plazminės membranos lipidų dvisluoksnio pertvarkymus, membranos takumo ir pralaidumo pokyčius, taip pat su membrana susietų fermentų aktyvumo modifikacijas, kurios yra būtinos palaikant ląstelių homeostazę (Horneck and Rabbow, 2007). Ryškus adaptyvus atsakas į tokį stresą apima membraninių pūslelių susidarymą. Šis greitas procesas pagerina mikroorganizmų prisitaikymą, nes palengvina pažeistų ar netinkamai susilanksčiusių baltymų pašalinimą ir reguliuoja baltymų kaupimąsi ląstelės apvalkale, didinant ląstelių stabilumą nepalankioje aplinkoje (Zea *et al.*, 2016). Mielėse proteominiai tyrimai mikrogravitacijos sąlygomis atskleidė padidėjusį ubikvitino kiekį, o tai rodo padidėjusį proteasomų skilimo sistemos, taip pat žinomos kaip degradosoma, aktyvumą. Tai rodo, kad ląstelės, veikiamos

mikrogravitacijos, yra labiau linkusios turėti pažeistus arba netinkamai sulankstytus baltymus (Van Mulders *et al.*, 2011).

Bakterijos ir mielės, auginamos kosminių misijų sąlygomis, pasižymi unikaliais fiziologiniais prisitaikymais, įskaitant pakitusią ląstelių morfologiją, augimo dinamiką ir pastebimą atsparumo antimikrobinėms medžiagoms padidėjimą. Parodyta, kad potencialiai patogeniškų mikroorganizmų virulentiškumas ir patogeniškumas gali keistis, todėl kyla susirūpinimas dėl infekcijų rizikos ilgalaikių kosminių misijų metu. Pastebėta, kad mielės patiria morfogenetines transformacijas, reaguodamos į aplinkos stresorius, kurie yra glaudžiai susiję su padidėjusiu oportunistiniu virulentiškumu (Altenburg, Nielsen-Preiss and Hyman, 2008). Be to, bioplėvelės susidarymas turi didelę reikšmę mikroorganizmų išgyvenimui nepalankiomis sąlygomis ir yra pagrindinis veiksnys tiek mikroorganizmų bendruomenės struktūroje, tiek infekcinių ligų vystymuisi. Po skrydžio į kosmosą, bakterijos dažnai turi padidėjusį gebėjimą formuoti bioplėveles (Ge *et al.*, 2016), o tai žymiai padidina jų atsparumą. Palyginti su žemėje esančiomis kontrolėmis, kosminių skrydžių paveiktos bakterijos labiau prisitaiko prie didesnės antibiotikų koncentracijos, padidindamos genų, susijusių su atsaku į stresą, reguliavimą, taip pat suaktyvindamos mechanizmus, susijusius su oksidaciniu stresu ir badu (Aunins *et al.*, 2018).

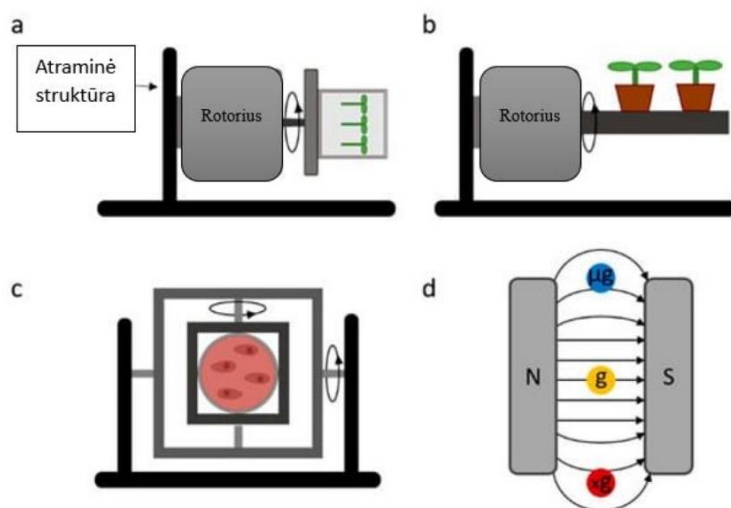
Mikroorganizmai yra neišvengiama kosminių misijų dalis, patenkantys į erdvėlaivius, prisitvirtinę prie kosminių technologijų, tokių kaip skafandrai, organinės medžiagos ir patys astronautai kaip natūralios mikrobiotos dalis. Nepaprastas jų gebėjimas išgyventi ir prisitaikyti prie ekstremalių kosmoso sąlygų kelia susirūpinimą dėl mikrobiologinės rizikos vertinimo po ilgų misijų. Mikroorganizmai įrodė gebėjimą greitai prisitaikyti prie nepalankios aplinkos ir išsivystyti į formas, kurios yra atsparesnės antimikrobiniam gydymui ir žmogaus imuninei apsaugai. Šis evoliucinis potencialas kelia galimą biologinio saugumo riziką ne tik skrendant į kosmosą, bet ir grįžus į Žemę, kur tokie mikroorganizmai gali kelti grėsmę žmonių sveikatai.

1.1.2. Simuliuota mikrogravitacija

Gravitacija buvo vienintelis pastovus aplinkos veiksnys Žemėje evoliucijos laikotarpiu. Tačiau ar gravitacija paveikė rūšių evoliuciją ir ar jos poveikis vis dar tęsiasi, nėra žinoma, nes tam reikia dažnų ir ilgalaikių eksperimentų Žemėje ir pakitusios gravitacijos aplinkoje, todėl mikrogravitacijos tyrimai yra būtini norint atskleisti gravitacijos poveikį evoliucijai ir biologiniams procesams. Sukurtos įvairios platformos, skirtos imituoti pakitusias gravitacijos sąlygas, kurios yra panašios į realias mikrogravitacijos sąlygas. Jos klasifikuojamos į 3 sistemas: orbitos mikrogravitacijos įrenginiai, neorbitiniai mikrogravitacijos įrenginiai, antžeminiai mikrogravitacijos simulatoriai. Kai kurios iš jų yra greitai reaguojančios mikrogravitacijos platformos, kurių poveikis mėginiams yra greitas. Šios platformos paprastai naudojamos trumpalaikiams eksperimentams. Priešingai, lėto veikimo mikrog-

ravitacinės sistemos, kurių poveikis mėginiams pasireiškia ne iš karto, geriau tinka ilgalaikiams tyrimams. Orbitiniai mikrogravitacijos prietaisai apima kosmose veikiančias laboratorijas ir autonomines mikrogravitacijos laboratorijų platformas. Neorbitinės sistemos apima kritimo bokštus, parabolinius skrydžius ir zonduojančias raketas. Tuo tarpu antžeminius mikrogravitacijos simulatorius sudaro klinostatai, atsitiktinio pozicionavimo įrenginiai, rotaciniai indai ir magnetinės levitacijos įtaisai (Ferranti, Del Bianco and Pacelli, 2021).

Vienas iš paprasčiausių ir labiausiai prieinamų įrankių manipuluoti gravitacija Žemėje yra klinostatas. Priklausomai nuo sukimosi ašies skaičiaus ir sukimosi greičio, klinostatai gali būti suskirstyti į skirtingus tipus ir naudojami įvairiose mokslinių tyrimų srityse (1.1 pav. a, b, c). Vienos ašies klinostatuose vertikali biologinio mėginio ašis sutampa su prietaiso sukimosi ašimi. Priešingai, dviejų dimensijų klinostatuose mėginys pasukamas plokštumoje, statmenoje sukimosi ašiai. Nors klinostatai veiksmingai nustato gravitacinio vektoriaus kryptį, jie neatkartoja tikrųjų mikrogravitacijos sąlygų. Be to, svorio perskirstymas sukimosi metu gali sukelti mechaninį įtempį ir lenkimo jėgas (Dedolph and Dipert, 1971). Todėl eksperimentiniai rezultatai, gauti naudojant klinostatus, turėtų būti interpretuojami atsižvelgiant į šiuos apribojimus.



1.1 pav. Žemės mikrogravitacijos simulatoriai. (a) vienos dimensijos, (b) dviejų dimensijų; c) trijų dimensijų klinostatai ir d) diamagnetinės levitacijos sistema. Magnetiniame lauke bandinys gali patirti nuo nulio (μg) iki dvigubai didesnės gravitacijos jėgą (xg), priklausomai nuo jo padėties magnetinio lauko gradientė. Pagal (Ferranti, Del Bianco and Pacelli, 2021)

Rotaciniai indai (RWV), taip pat žinomi kaip rotacinės ląstelių kultivavimo sistemos (RCCS), buvo sukurti NASA ir pritaikyti ląstelių kultūroms. RWV yra horizontaliai pasuktas kultūros indas su silicio membrana, kuri yra pralaidi deguoniui. Šie rotaciniai bioreaktoriai sukuria mažos turbulencijos ir šlyties ląstelių kultūros aplinką, kurioje gausu deguonies (Schwarz, Goodwin and Wolf, 1992). Įprastai RWV yra nuo 5 iki 20 centimetrų skersmens ir sukasi maždaug 10–20 apsisukimų per minutę greičiu aplink horizontalią ašį. Sukimosi greitis kruopščiai sukalibruojamas, kad būtų atsveriamas suspensijos ląstelių nusėdimo greitis. Tai užtikrina, kad ląstelės išliks neutraliai plūduriuojančios terpėje ir švelniai suksis aplink savo ašį, o ne nusės indo dugne (Cogoli, 1992). Sukurdamas beveik

nesvarią aplinką, RWV imituoja pagrindinius mikrogravitacijos aspektus ir yra plačiai naudojami tyrimuose, kuriuose tiriama ląstelių morfologija, diferenciacija ir signalo perdavimas. Be to, dėl savo paprastumo, įperkamumo ir patikimumo RWV dažniausiai naudojami tiek antžeminėse laboratorijose, tiek kosmose atliekamuose eksperimentuose, o tai suteikia galimybę lyginti gautus rezultatus.

Kitas antžeminis mikrogravitacijos modeliavimo metodas yra diamagnetinės levitacijos naudojimas (1.1 pav. d). Šis metodas kompensuoja gravitacijos poveikį molekulinio lygmeniu, subalansuodamas biologinių audinių ar vandens pagrindu veikiančių sistemų svorį su atstumiančia jėga, kurią sukuria stiprus magnetinis laukas. Iš esmės diamagnetinės medžiagos, įskaitant vandenį ir daugumą biologinių audinių, atstumia magnetiniai laukai, o pakankamai stipriame gradiento lauke šis atstūmimas gali atremti gravitacinę jėgą ir sukelti levitaciją. Nors elektromagnetai dažniausiai naudojami generuoti reikiamus magnetinius laukus dėl didelio stiprumo ir valdomumo, jie dažnai išskiria daug šilumos veikimo metu. Dėl šios šiluminės galios reikia naudoti aušinimo sistemas, kurios gali sukelti antrinį poveikį biologiniams mėginiams. Kita vertus, nuolatiniai magnetai yra patogesni ir nereikalauja išorinio maitinimo ar aušinimo, tačiau jų fiksuotas magnetinio lauko stiprumas ir ribotas dydis labai apriboja mėginių, kurie gali būti naudojami eksperimentams, tipus ir tūrį. Nepaisant šių techninių iššūkių, diamagnetinė levitacija yra puiki priemonė ne tik imituojant mikrogravitaciją ląstelių kultūrose, bet ir tiriant jos poveikį daugialąsčiams organizmams. Buvo atlikti sėkmingi augalų, varliagyvių ir bestuburių tyrimai, kurių metu buvo tiriamas gravitacinis poveikis vystymuisi, morfogenezei ir genų raiškai (Herranz *et al.*, 2012).

1.2. Telomerų vaidmuo ląstelėje

Biologiniame kontekste senėjimas dažnai apibūdinamas kaip laipsniškas fiziologinių procesų pasikeitimas, dėl kurio susilpnėja esminės biologinės funkcijos ir sumažėja organizmo gebėjimas prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Šis laipsniškas fiziologinių sistemų pokytis yra pagrindinis veiksnys, skatinantis lėtinių ligų vystymąsi, padidėjusį mirtingumą ir reikšmingą su sveikatos priežiūra susijusių išlaidų padidėjimą. Organizmams senstant, kaupiasi ląstelių ir molekulinio pažeidimų kumuliacinis poveikis, kenkiantis homeostazei ir didinantis pažeidžiamumą išoriniams stresoriams ir ligoms (Li *et al.*, 2023). Senėjimo procesą dažniausiai lydi audinių kamieninių ląstelių išsekvojimas ir lėtinio audinių uždegimo padidėjimas. Šie reiškiniai atspindi platesnius ląstelių ir audinių lygio pokyčius, iš kurių daugelis yra susiję su nenormaliais molekuliniais pokyčiais. Tarp jų yra genomo nestabilumas, telomerų sutrumpėjimas ir epigenetinės modifikacijos, kurios prisideda prie mitochondrijų disfunkcijos ir ląstelių senėjimo. Mokslininkai tirdami įvairius su senėjimu susijusius molekulinis mechanizmus suprato, kad šie mechanizmai atsiranda kartu ir yra tarpusavyje susiję. Telomerų disfunkcija tapo pagrindine daugelio molekulinio kelių, susijusių su senėjimu ir su amžiumi susijusiomis ligomis, varomąja jėga (López-Otín *et al.*, 2013).

Vienas iš pagrindinių senėjimo bruožų yra laipsniškas telomerų trumpėjimas. Telomeros yra specializuotos DNR-baltymų struktūros, esančios linijinių chromosomų galuose. Jos sudarytos iš trumpų, tandeminių DNR pasikartojančių sekų ir daugiakomponentinio baltymų komplekso, žinomo kaip šelterinas (angl. *shelterin*). Šelterino kompleksas atlieka svarbų vaidmenį palaikant genomo stabilumą, nes apsaugo chromosomų galus nuo klaidingo atpažinimo kaip DNR pažeida. Konkrečiai, šelterinas neleidžia suaktyvinti DNR pažeidimo atsako kelių ir slopina dvigubos grandinės trūkių taisymo mechanizmus, taip užkertant kelią netinkamam chromosomų susiliejimui (Lange, 2018). Dėl linijinės DNR galų replikacijos problemos (angl. *End replication problem*), DNR replikacijos mechanizmų nesugebėjimo užbaigti linijinių chromosomų galų sintezės, telomeros trumpėja po kiekvieno ląstelės pasidalijimo. Be šio su replikacija susijusio trumpėjimo, oksidacinis stresas dar labiau pagreitina telomerų trumpėjimą, paveikdamas tiek besidalijančias, tiek nesidalijančias ląsteles, sukeldamas DNR pažeidimus telomerinėse srityse, kurios yra ypač jautrios oksidaciniams pažeidimams. Norėdamos užkirsti kelią šiam procesui, ląstelės naudoja telomerezę – specializuotą ribonukleoproteino fermentą, kuris geba ilginti telomeras, pridėdant telomerinius pasikartojimus prie chromosomų galų. Didžiausias telomerezės aktyvumas yra lytinėse, kamieninėse ir vėžinėse ląstelėse, o daugumoje somatinių ląstelių ji apskritai nėra detektuojama arba randamas labai mažas jos kiekis. Telomerų kritinis sutrumpėjimas, struktūros pažeidimai arba šelterino komplekso išstūmimas iš telomerų, sukelia DNR pažeidimo atsaką ir ląstelių proliferacijos praradimą, dėl kurių atsiranda senėjimas arba įvyksta apoptozė (Lyu, Sang and Chai, 2021).

Telomerezė yra būtina telomerų ilginimui ir funkcijos palaikymui. Šią funkciją ji atlieka pridėdama tandemines pasikartojančias DNR sekas prie chromosomų galų ir taip kompensuodama laipsnišką telomerinės DNR praradimą, atsirandantį su kiekvienu DNR replikacijos etapu (Artandi and DePinho, 2010). Viso žmogaus vystymosi metu telomerezės aktyvumas yra griežtai reguliuojamas. Daugumoje somatinių ląstelių telomerezės raiška yra slopinama, todėl laikui bėgant telomeros trumpėja. Manoma, kad šios represijos veikia kaip naviką slopinantis mechanizmas, ribodamas somatinių ląstelių proliferacinį potencialą. Tačiau reguliuojamas telomerezės aktyvumas išlieka suaugusiųjų kamieninių ląstelių populiacijose, ypač tose, kurios dalyvauja audiniuose, kuriems reikalingas didelis regeneracinis poreikis. Pavyzdžiui, imuninės sistemos, epidermio ir žarnyno epitelio kamieninės ląstelės turi išmatuojamą telomerezės aktyvumą, kuris yra būtinas norint išlaikyti jų gebėjimą atsinaujinti ir palaikyti audinių homeostazę per visą organizmo gyvenimą (Forsyth, Wright and Shay, 2002). Vienas iš plačiausiai ištirtų veiksnių telomerų trumpėjimo ir senėjimo kontekste yra stresas, lydinčias asmenis visą gyvenimą. Tai gali būti psichologinis ar fizinis stresas patiriamas momentaliai ar chroniškai. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad telomerų ilgis yra paveldima savybė, o telomerų trumpėjimas yra įprasta senėjimo proceso dalis (Honig *et al.*, 2015). Telomerų ilgiui įtaką daro ir įvairūs kiti veiksniai, įskaitant lytį. Tyrimai rodo, kad moterų telomeros paprastai yra ilgesnės nei vyrų. Manoma,

kad šį skirtumą įtakoja hormoniniai, genetiniai ir gyvenimo būdo veiksniai, įskaitant galimą apsauginį estrogeno poveikį, kuris gali sustiprinti telomerazės aktyvumą (Gardner *et al.*, 2014). Gyvenimo būdo veiksniai, tokie kaip dieta, rūkymas, psichologinis ir lėtinis stresas bei ligos, turi įtakos telomerų ilgiui (Valdes *et al.*, 2005; Blackburn and Epel, 2012). Pastebėta, kad ne tik trumpos telomerės, bet ir pernelyg ilgos yra siejamos su padidėjusia tam tikrų ligų rizika, todėl telomerų ilgis turi būti griežtai reguliuojamas, kad būtų išlaikyta homeostazė. Ilgos telomerės gali prisidėti prie padidėjusios ląstelių proliferacijos, o tai gali būti naudinga audinių regeneracijai, tačiau tam tikromis sąlygomis taip pat gali paskatinti onkogeninius procesus (Protsenko *et al.*, 2020). Per pastaruosius du dešimtmečius vis gausėjanti mokslinė literatūra sieja ryšį tarp streso ir telomerazės aktyvumo. Nors daugelis tyrimų rodo sąsajas tarp psichologinio streso ir sumažėjusio telomerazės aktyvumo, taip pat telomerų trumpėjimo, vis dar nėra išsamaus ir vieningo modelio, kuris pilnai paaiškintų, kaip fiziologinės streso reakcijos virsta molekuliniiais telomerų pokyčiais (Lin and Epel, 2022).

Skirtingai nuo žmogaus ląstelių, mielių ląstelės puikiai toleruoja telomerų ilgio svyravimus. Jos gali išlaikyti telomerą, kurios yra iki penkių kartų ilgesnės, neparodydamos jokių reikšmingų augimo ar ląstelių funkcijos pokyčių. Tai rodo, kad mielių telomerų ilgis nėra glaudžiai susijęs su ląstelių proliferacija ar chronologine gyvenimo trukme. Be to, tyrimai parodė, kad mielių ląstelės, turinčios neįprastai ilgas telomeras, sensta panašiu greičiu kaip ir mielės turinčios standartinio ilgio telomeras. Be to, atrodo, kad telomerų ilgis neturi reikšmingo poveikio replikacinio ar genotoksinio streso sąlygomis, tačiau kritiškai trumpas telomerų ilgis yra siejamas su sumažėjusiu gyvybingumu (Harari, Zadok-Laviel and Kupiec, 2017).

1.2.1. Telomerų ilgio pokyčiai mikrogravitacijoje

Astronautai dirba išskirtinai ekstremalioje aplinkoje, kur juos veikia daugybė stresorių, įskaitant kosminę spinduliuotę, mikrogravitaciją, psichologinę izoliaciją ir mitybos bei mikrobiotos pokyčius (Afshinnekoo *et al.*, 2020). Įrodyta, kad toks fizinių ir psichologinių stresinių veiksnių derinys, net atliekant misijas žemoje Žemės orbitoje TKS, daro neigiamą poveikį daugeliui fiziologinių sistemų. Tarp dažniausiai stebimų poveikių yra susilpnėjęs imuninis atsakas, padidėjęs uždegiminis aktyvumas ir padidėjęs jautrumas infekcijoms. Pastaruoju metu dėmesys buvo nukreiptas į astronautų telomerų ilgio dinamikos tyrimus. Telomerės dabar tiriamos kaip astronautų sveikatos biožymuo kosminių misijų metu ir po jų. Telomerų ilgio dinamika ir DNR pažaidų atsakai buvo įvertinti vienuolikos astronautų grupėje prieš įvairios trukmės misijas, jų metu ir po jų – nuo kelių mėnesių iki pilnų metų TKS. Nors astronautai paprastai yra puikios fizinės sveikatos, mokslininkai išsiaiškino, kad jų telomerės buvo trumpesnės, o telomerazės aktyvumas mažesnis, nei pagal amžių ir lytį atitinkančių asmenų Žemėje prieš ir po skrydžio į kosmosą. Buvo pastebėta, kad nepaisant misijos trukmės, kosmose esantys astronautai turėjo ilgesnes telomeras, o sugrįžus į Žemę, jų ilgis greit sutrumpėjo ir po misijos

astronautai turėjo trumpesnes telomeras nei prieš skrydį į kosmosą. Atrodo, kad vienas iš pagrindinių veiksnių yra oksidacinis stresas, kurį patyrė visi įgulos nariai ir buvo nustatyta, kad jis koreliuoja su telomerų ilgio svyravimais. Be to, astronautai parodė reikšmingą chromosomų inversijų dažnio padidėjimą, dar labiau pabrėždami genomo nestabilumą, susijusį su ilgesniu kosmoso aplinkos poveikiu (Luxton, McKenna, Lewis, *et al.*, 2020). Manoma, kad oksidacinis stresas, kurį sukelia kosmoso sąlygos, vaidina svarbų vaidmenį pažeidžiant arba kritiškai sutrumpinant telomeras, galiausiai sukeldamas ląstelių senėjimą arba apoptozę. Oksidacinis stresas, kurį pirmiausia sukelia padidėjęs kosminės spinduliuotės poveikis, sukuria reaktyvias deguonies formas (ROS), kurios gali sukelti dvigubos grandinės DNR trūkius ir telomerų trumpėjimą, ypač somatinėse ląstelėse. Somatinėse ląstelėse įsijungia trumpalaikis alternatyvus ir nuo telomerazės nepriklausomas telomerų ilginimo mechanizmas. Šis mechanizmas palengvina ląstelės išgyvenamumą. Šis alternatyvus kelias priklauso nuo homologinių rekombinacijos procesų, kai telomerinė DNR prailginama naudojant kitas telomerines sekas kaip šablonus. Nors šis mechanizmas nėra toks efektyvus ar reguliuojamas kaip telomerazės sukeltas ilginimas, jis gali suteikti laikiną išgyvenamumo pranašumą ląstelėms, stabilizuodamas kritiškai trumpas telomeras užkertant kelią tiesioginei ląstelių žūčiai (Luxton, McKenna, Taylor, *et al.*, 2020).

1.3. Mielės – modeliniai organizmai mikrogravitacijos tyrimuose

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra plačiai naudojamas modelinis organizmas tiriant įvairius eukariotinių ląstelių procesus ir sistemas ir yra puikus modelinis organizmas senėjimo tyrimuose (Kaeberlein, Burtner and Kennedy, 2007). Mielių modelinės sistemos taip pat gali suteikti informacijos apie eukariotų prisitaikymą prie kosmoso sąlygų. Pagrindinės savybės, dėl kurių mielės naudojamos kosmoso tyrimuose yra šios:

1. Jos išlieka visiškai gyvybingos kosminių misijų metu (Walther *et al.*, 1996).
2. Mikrogravitacijos aplinkoje, pakinta jų metabolizmas ir fenotipas (Walther *et al.*, 1996).
3. Mielių auginimo sąlygos suderinamos su žmogaus gyvenimo sąlygomis (Walther *et al.*, 1996).
4. Mielės gali būti auginamos kaip laisvai plaukiojantys organizmai skystose mitybinėse terpėse arba kaip kolonijos ant agarų (Hammond and Birdsall, 2022).
5. Jos kelia minimalų pavojų žmonėms ir gali būti auginamos laikantis minimalių saugumo reikalavimų (Hammond and Birdsall, 2022).
6. Mielės lengvai prisitaiko prie temperatūrų skirtumų, toleruoja šaldymą, džiovinimą, yra lengvai kultivuojamos (Nislow *et al.*, 2015).

1.3.1. Mikrogravitacijos poveikis *S. cerevisiae* ląstelėms

S. cerevisiae dėl savo gerai apibūdintos genetinės sistemos, lengvo auginimo ir plataus pritaikymo yra idealus modelinis organizmas tiriant kosminių skrydžių ir simuliuotos mikrogravitacijos

poveikį eukariotinėms ląstelėms. Atlikti simuliuotos mikrogravitacijos tyrimai, leido išsiaiškinti, kad *S. cerevisiae* lyginant su kontrole, mikrogravitacijos sąlygose sutrumpėja latentinė fazė ir poliškumas. Tai rodo atsitiktinis mielių pumpuravimas, palyginti su įprastu, bipoliniu kontrolinių mielių pumpuravimu. Nenormalų pumpuravimą dažnai lydėjo padidėjęs ląstelių polinkis formuoti agregatus, kai kuriose grupėse buvo penkios ar daugiau ląstelių. Nepaisant šių morfologinių pokyčių, mielių ląstelės neturėjo reikšmingų augimo greičio, ląstelių dydžio, formos ar gyvybingumo skirtumų, lyginant su kontrolinėmis grupėmis. Taip pat buvo nustatyti reikšmingi genų raiškos pokyčiai, susiję su poliškumu, bipoliniu pumpuravimu ir motininių-dukterinių ląstelių atskyrimu (Purevdorj-Gage, Sheehan and Hyman, 2006). Šie rezultatai rodo, kad mikrogravitacija gali keisti pagrindinius mielių ląstelių ciklo ir morfogenezės aspektus transkripcijos lygmeniu, o tai gali atspindėti, kaip gravitacinė jėga daro įtaką tarpląsteliniams signaliniams keliams eukariotinėse ląstelėse. Mielų telomerų tyrimai kosmoso ar simuliuotos mikrogravitacijos sąlygomis dar mažai tiriami, todėl kol kas mikrogravitacijos poveikis telomerų ilgiui nėra žinomas.

1.4. Priešgrybelinių junginių poveikis mielėms

Per pastaruosius kelis dešimtmečius patogeninės mielės tapo vis didėjančia pasauline grėsme žmonių sveikatai. Šie ligas sukeliantys mieliagrybiai paprastai klasifikuojami kaip oportunistiniai patogenai, o tai reiškia, kad jie pirmiausia sukelia infekcijas asmenims, kurių imuninė sistema yra pažeista arba susilpnėjusi. Toks pažeidžiamumas gali atsirasti dėl ligų, įskaitant ŽIV/AIDS, vėžį taip pat dėl organų transplantacijos ar kitų imunosupresijos formų. Oportunistinės mielių rūšys, ypač priklausiančios *Candida*, *Cryptococcus* ir *Malassezia* gentims, yra atsakingos už platų infekcijų spektrą, nuo lengvų iki pavojingų gyvybei. Viena spektro gale jie sukelia paviršines infekcijas, pažeidžiančias odą, gleivines ir nagus. Tokio tipo infekcijos yra labai paplitusios, paveikiančios maždaug 1,7 milijardo žmonių visame pasaulyje ir dažnai pasikartojančios arba lėtinės. Kita vertus, patogeninių mieliagrybių sukeltos invazinės grybelinės infekcijos yra sunkesnės ir susijusios su dideliu sergamumu ir mirtingumu. Šios infekcijos gali pažeisti vidaus organus, patekti į kraują ir sukelti sisteminės ligas. Remiantis pasauliniais sveikatos skaičiavimais, invazinės grybelinės infekcijos kasmet sukelia maždaug 3,8 milijono mirčių (Bongomin *et al.*, 2017; Denning, 2024). Kadangi eukariotinės grybelinės ląstelės turi glaudžius evoliucinius ryšius su savo šeimininkais žmonėmis, priešgrybelinių vaistų kūrimas yra unikalus iššūkis farmacijos pramonei. Priešgrybeliniai vaistai turi būti selektyviai nukreipti į grybelines ląsteles, tuo pačiu sumažinant žalą žmogaus ląstelių funkcijoms. Šie vaistai paprastai skirstomi į fungistatinus – slopinančius mielių ląstelių augimą – arba fungicidinius – sukeliančius ląstelių mirtį. Ši klasifikacija yra labai svarbi norint suprasti vaistų veikimo mechanizmus ir nustatyti tinkamas gydymo strategijas bei numatomus rezultatus. Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamos keturios pagrindinės priešgrybelinių vaistų klasės: polienai, azolai, pirimidino analogai

ir echinokandinai. Kiekviena klasė nukreipta į skirtingus mielių struktūrinius komponentus, pavyzdžiui, ląstelių membraną ar sienelę (Perfect, 2017).

Nistatinas yra polieno makrolidinis priešgrybelinis vaistas, kuris fungicidinį poveikį daro specifine sąveika su ergosteroliu. Jo veikimo mechanizmas pirmiausia susijęs su prisijungimu prie ergosterolio molekulių mielių membranoje ir susidaro transmembranines poras. Šios poros sutrikdo selektyvų membranos pralaidumą, leisdamos nekontroliuojamai ištekti kalio ir magnio jonams, taip pat mažoms organinėms molekulėms. Šis joninės ir metabolinės homeostazės sutrikdymas galiausiai lemia ląstelių mirtį. Nistatino veikimo specifiškumas kyla dėl jo stipraus afiniškumo ergosteroliui, bet ne žinduolių ląstelėse, kur cholesterolis atlieka panašų struktūrinį vaidmenį. Tačiau esant didelėms koncentracijoms nistatinas taip pat gali sąveikauti su cholesteroliu ir sukelti citotoksinį poveikį, o tai yra viena iš priežasčių, kodėl jis nėra tinkamas sisteminiam vartojimui (Chen, Chou and Feingold, 1978; Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2023).

Klotrimazolas yra azolo klasės priešgrybelinis junginys, kuris visų pirma veikia slopindamas ergosterolio biosintezę. Šio junginio taikinyje yra fermentas lanosterolio 14 α -demetilazė (CYP51). Fungistatinis poveikis pasireiškia sutrikdant membranos struktūrą ir pralaidumą, o tai pažeidžia mielių vientisumą ir funkciją ir galiausiai sukelia jos mirtį. Klotrimazolas ne tik slopina membranos sintezę, bet ir sukelia oksidacinį stresą. Veikiant vaistui, ląstelės turi padidėjusių reaktyvių deguonies formų (ROS), įskaitant superoksido anijonus ir vandenilio peroksidą, lygius. Klotrimazolo priešgrybelinis veiksmingumas yra dviejopo mechanizmo rezultatas: ergosterolio biosintezės slopinimas ir oksidacinio streso sukėlimas, kurie kartu stabdo ląstelių augimą ir dauginimąsi bei sukelia apoptozę (Trivedi *et al.*, 2005; Kavakçıoğlu and Tarhan, 2018; Yardımcı and Tarhan, 2024).

1.5. Mielių ląstelių žūties tipai

Gyvūninių ląstelių mirtis pasireiškia makroskopiniais morfologiniais pokyčiais. Dažniausiai skirstomos į tris skirtingas grupes: I tipo ląstelių mirtis arba apoptozė, pasireiškianti citoplazmos susitraukimu, chromatino kondensacija, branduolio fragmentacija mitochondrijų fragmentacija, fosfatidilserino padėties pasikeitimu į išorinę plazminės membranos pusę ir plazminės membranos susitraukimu į mažas pūsleles dar žinomas kaip apoptotiniai kūneliai, kurias gali pasisavinti gretimos ląstelės, turinčios fagocitinį aktyvumą. II tipo ląstelių mirtis arba autofagija, pasireiškianti citoplazmine vakuolizacija ir besibaigianti fagocitų degradacija lizosomose. III tipo ląstelių mirtis arba nekrozė, neturinti išskirtinių I ar II tipo ląstelių mirties požymių ir pasibaigianti mirusių ląstelių suardimu, nesant aktyvaizdaus fagocitų ir lizosomų įsitraukimo (Schweichel and Merker, 1973; Galluzzi *et al.*, 2007).

Tyrimai, skirti aptikti ir kiekybiškai įvertinti mirstančių mielių ląstelių požymius apima kas-pazės / proteazės aktyvumą, dažymą aneksinu V, siekiant nustatyti fosfatidilserino eksternalizaciją ir

DNR fragmentacijos tyrimus. Nors tokių žinduolių ląstelių mirties tyrimų naudojimas mielėse yra šiek tiek prieštaringas dėl ląstelių biologijos skirtumų ir klaidingo interpretavimo galimybės, jie išlieka vertingi apibūdinant mielių apoptozės tipo reguliuojamą ląstelių žūtį (Chaves *et al.*, 2025).

Nekrozė apibūdinama kaip gana atsitiktinė, nekontroliuojama ląstelių mirties forma. Nekrotinė ląstelių mirtis morfologiškai apibūdinama ląstelių tūrio padidėjimu, organelių patinimu ir plazminės membranos plyšimu. Sutrikdoma energijos gamyba, vyksta atsitiktinis DNR skaidymas, kuris sukelia veiksmų, susijusių su imuninio atsako stimuliavimu arba aktyviu žaizdų taisymu, išsiskyrimą (Zong and Thompson, 2006). Mielių nekrozė, kažkada laikyta nereguliuojama ir atsitiktine ląstelių žūties forma, dabar pripažįstama, kad ji apima ir atsitiktinius, ir reguliuojamus procesus. Atsitiktinė nekrozė paprastai atsiranda dėl ekstremalių stresinių veiksmų, tokių kaip didelė vandenilio peroksido arba acto rūgšties koncentracija, dėl kurios greitai plyšta plazmos membrana ir įvyksta nekontroliuojama ląstelių lizė. Priešingai, reguliuojama nekrozė apima genetiškai kontroliuojamus kelius ir gali būti sukurta vidutinio sunkumo streso sąlygų. Pagrindiniai mielių nekrozę įtakojantys veiksniai yra mitochondrijų disfunkcija, senėjimas ir rūgštinis pH. Mitochondrijų pažeidimas didina reaktyvių deguonies formų gamybą, o tai prisideda prie nekrozinų ląstelių žūties (Ludovico *et al.*, 2001; Alexandrov *et al.*, 2021).

Autofagija yra griežtai reguliuojamas, katabolinis procesas, stebimas įvairiuose eukariotuose, nuo mielių iki sudėtingesnių organizmų palaikantis ląstelių homeostazę, reaguojant į aplinkos pokyčius ir maistinių medžiagų prieinamumą. Šio proceso metu ląstelės skaido ir perdirba baltymus ir organeles, kad išlaikytų tarpląstelinę homeostazę. Paprastai autofagija atlieka apsauginį vaidmenį ląstelėse, o šių mechanizmų sutrikimas arba per didelis autofaginis aktyvumas sukelia ląstelių mirtį. Nors normaliomis sąlygomis autofagija pasireiškia baziniu lygiu, maistinių medžiagų bado sąlygomis ji žymiai padidėja (Metur *et al.*, 2023). Autofagija svarbi skaidant ir perdirbant senus baltymus, didelius baltymų kompleksus ir organeles. Šis procesas apima tris pagrindinius autofagijos tipus: mikroautofagiją, makroautofagiją ir šaperonų sukeltą autofagiją. Autofagija skirstoma į skirtingus etapus: fagoforo indukciją ir branduolio susidarymą, vėlesnį fagoforo išsiplėtimą ir brendimą iki visiškai uždaros, dvigubos membranos autofagosomos, autofagosomos susiliejimą su vakuole ir galiausiai skilimo produktus (Metur and Klionsky, 2024).

1.6. Mikrogravitacijos poveikis ląstelių žūčiai

Simuliuotos mikrogravitacijos ir jonizuojančiosios spinduliuotės sinergistinis poveikis žmogaus bronchų epitelio ląstelėms tyrimas parodė, kad šie du su kosmosu susiję stresoriai sumažino ląstelių gyvybingumą ir proliferaciją, tuo pačiu paskatindami apoptozę ir DNR dvigubų grandinių trūkumus. Padidėjusi *RAC2* geno raiška, padidino NADPH oksidazės aktyvumą, tai lėmė padidėjusį

reaktyvių deguonies formų lygį. Tai parodo, kad mikrogravitacijos ir spinduliuotės poveikis kosminėje aplinkoje gali sustiprinti ląstelių pažeidimus (Tan *et al.*, 2020). Tyrimai rodo, kad mikrogravitacija gali sustiprinti ir slopinti apoptozę, priklausomai nuo ląstelės tipo, poveikio trukmės ir specifinių stresorių. Pavyzdžiui, limfocitai ir su imunitetu susijusios ląstelės dažnai pasižymi padidėjusia apoptoze. Priešingai, kai kurios vėžinės ląstelės ir kamieninės ląstelės rodo sumažėjusį apoptotinį aktyvumą, priežastys dar nėra pilnai išaiškintos, tačiau numanoma priežastis mechanotransdukcijos signalinio kelio, citoskeleto remodeliavimo ir mitochondrijų disfunkcijos mikrogravitacijos aplinkoje pokyčiai. Mikrogravitacija veikia pagrindinius apoptotinius reguliatorius, tokius kaip kaspazės, Bcl-2 šeimos baltymai ir mitochondrijų membranos potencialas. Turi poveikį signalams, susijusiems su oksidaciniu stresu ir DNR pažeidimu (Prasad *et al.*, 2020).

Mielės, augintos tikroje mikrogravitacijoje TKS buvo palygintos su mielėmis, kurios buvo augintos simuliuotoje mikrogravitacijoje. Tyrimas parodė, kad tiek tikros, tiek simuliuotos mikrogravitacijos sąlygos padidino ląstelių redokso atsaką ir paskatino apoptozės indukciją, taip pat skirtingos sąlygos lėmė unikalius genų raiškos profilius, susijusius su šlyties stresu ir amoniako signaliniu keliu (Hammond *et al.*, 2018a).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai, buferiai ir rinkiniai

Reagentai:

Šiame darbe naudotos medžiagos: nistatino dihidratas (Carl Roth), klotrimazolas (Alfa Aesar), acto rūgštis (Merck), D(+)-gliukozės monohidratas (Carl Roth), peptonas (Carl Roth), mielių ekstraktas (Carl Roth), mielių azotinė bazė be aminorūgščių (Carl Roth), agaras (Carl Roth), L-leucinas (Serva), uracilas (Carl Roth), adeninas (Merck), L-histidinas (Merck), L-triptofanas (Carl Roth), D-sorbitolis (Carl Roth), DMSO (Carl Roth), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), Natrio chloridas (Merck), zymoliazė (Carl Roth).

Buferiai:

- 1X PBS, pH 7,4: 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 2,68 g/L Na_2HPO_4 , 0,24 g/L KH_2PO_4 . Gauta tirpalo pH reikšmė pridedama iki pH 7,4 naudojant 1 M HCl.
- 1 M sorbitolio tirpalas: 182,2 g/L sorbitolio ištirpinama distiliuotame vandenyje.
- Sferoplastų skyrimo buferis: 1,2 M sorbitolis, 0,5 mM MgCl_2 , 35 mM K_2HPO_4 , pH 6,8)

Rinkiniai:

- ROS susidarymo analizei naudotas „DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay“ rinkinys (ab113851, abcam).
- Aktyvių kaspazių nustatymui naudotas „Generic Caspase Activity Assay – Fluorometric Green“ rinkinys (ab112130, abcam).
- Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymui naudotas „ROTITEST®Annexin V“ rinkinys (Art. No. 7735.1, Carl Roth).

2.1.2. Prietaisai

Darbe naudoti prietaisai ir pasirinkti parametrai: rotacinė ląstelių kultivavimo sistema (RLKS), 21,5 aps/min., 30 °C (Synthecon), termopurtyklė, 130 rpm, 30 °C (CERTOMAT U), termostatas, 30 °C (Binder), šaldytuvas, 4 °C (Snaigė), biofotometras, OD 600 nm (Eppendorf), stalinė centrifuga (Eppendorf), laminarinis boksas, II saugumo klasė (ScanLAF), fluorescencinis mikroskopas (Olympus IX83).

2.1.3. Mitybinės terpės ir priedai

Terpių sudėtis nurodoma 2.1 lentelėje, pateikiamas reikalingas medžiagų kiekis, kuris yra ištirpinamas 1 L dejonizuoto vandens. Mikrobiologinio genotipavimo eksperimentams SC terpėje naudojami priedai – 100 mM leucinas (20 mL/L), 20 mM uracilas (10 mL/L), 10 mM adeninas (15 mL/L),

100 mM histidinas (3 mL/L), 40 mM triptofanas (10 mL/L), pridedami po autoklavavimo prieš išpilstant į Petri lėkšteles. Agaras dedamas tik gaminant kietas terpes.

2.1 lentelė. Mitybinės terpės ir jų sudėtis.

YPD	SC
D(+)-gliukozės monohidratas, 20 g/L Peptonas, 20 g/L Mielių ekstraktas, 10 g/L Agaras, 20 g/L	D(+)-gliukozės monohidratas, 20 g/L Mielių azotinė bazė be aminorūgščių, 6,7 g/L Agaras, 20 g/L

2.2. Metodai

2.2.1. Tyrimo objektas

Šiame tyrime buvo naudojami trys *S. cerevisiae* kamienai – DLY 641 (laukinio tipo telomeros), DLY 1479 (trumpos telomeros) ir DLY 5396 (ilgos telomeros). Kamienų genotipai nurodomi 2.2 lentelėje.

2.2 Lentelė Tyrime naudoti *S. cerevisiae* kamienų genotipai ir telomerų fenotipai.

Kamienas	Atitinkamas genotipas ir telomerų fenotipas
DLY 641	<i>MATα ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL+ psi+ ssd1-d2 RAD5</i> (laukinio tipo); laukinio tipo telomeros
DLY 1479	<i>MATα mre11::hisG::URA3</i> ; trumpos telomeros
DLY 5396	<i>MATα exo1::LEU2 pif1::NATMX</i> ; ilgos telomeros

Visi kamienai gauti iš Mančesterio Metropoliteno universiteto Dr. Mikhajlo Zubko. Visiems kamienams atliekamas mikrobiologinis genotipavimas.

2.2.2. Mikrobiologinis genotipavimas

Prieš atliekant eksperimentus *S. cerevisiae* kamienams atliekamas mikrobiologinis genotipavimas. Pirmiausia atliekamas mikrobiologinis klonavimas, po kurio atrenkamos pavienės kolonijos, kurios vėliau auginamos termostate ant agarizuotos YPD terpės 2 paras 30 °C temperatūroje. Užaugusios mielės antspaudų metodu perkeliamos ant selektyvių terpių: teigiamos kontrolės SC⁺, turinčios leucino, uracilo, histidino, adenino ir triptofano bei terpių, neturinčių vieno iš minėtų junginių ir SC⁻ terpės neturinčios nė vieno iš minėtų junginių. Tokios lėkštelės auginamos 2 paras 30 °C temperatūroje, vėliau atrenkamos tinkamos kolonijos.

2.2.3. Minimalių inhibitorinių koncentracijų nustatymas

Minimalių inhibitorinių koncentracijų (MIK) nustatymui pasirinktiems priešgrybeliniams junginiams klotrimazolui bei nistatino dihidratui buvo pasirinktas lašelių testas. Tiriamieji kamienai auginami termostate 2 paras 30 °C, pasirinkta viena kolonija perkeliama į 5 mL skystą terpę, auginama 12 val. įprastoje rotacinėje purtyklėje 30 °C, 130 RPM sąlygomis. OT600 = 1 ląstelių suspensijos kiekis perkeliamas į 5 ml tūrio mėgintuvėlį ir į 5 ml tūrio RLKS indą su skysta YPD terpe taip, kad OT600 būtų 0,06, auginama 24 val. 1×10^6 ląstelių suspensijos 3 kartus plaunama YPD terpe, centrifuguojams 3000 aps/min. 3 minutes ir resuspenduojamos joje. Paruoštos ląstelės išpilstomos po 100 μ l į mikroplokštelės šulinėlius ir pridedama po 100 μ l skirtingų koncentracijų klotrimazolo tirpalo (16 μ g/mL, 14 μ g/mL, 12 μ g/mL, 10 μ g/mL, 8 μ g/mL, 6 μ g/mL), bei nistatino tirpalo (1,2 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 0,8 μ g/mL, 0,6 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,2 μ g/mL) kontrolei 100 μ l YPD terpės. Plokštelė inkubuojama 30 °C 24 val. Po inkubacijos iš kiekvieno šulinėlio po 5 μ l perkeliama ant agarizuotos YPD terpės. Agarizuota YPD terpė su tiriamomis suspensijomis auginama 48 val. Vertinamas gebėjimas formuoti kolonijas. MIK laikoma mažiausia junginio koncentracija, kurioje ląstelės nebegeba formuoti kolonijų.

2.2.4. Mielų ląstelių gyvybingumo įvertinimas

Mielų ląstelių gyvybingumas po poveikio priešgrybeliniais junginiais skirtingais laiko momentais įvertinamas atliekant klonogeninį testą. Po 24 val. auginimo 1×10^6 ląstelių plaunamos 3 kartus YPD terpe, centrifuguojant 3000 aps/min 3 min. ir resuspenduojamos joje. Suspensija padalinama į keturis mėgintuvėlius po 200 μ L. Kiekvienam mėgintuvėliui pridedama 200 μ L priešgrybelinio junginio, atskiesto iki atitinkamos koncentracijos, kad galutiniame tūryje junginių koncentracija būtų MIK, 2 kartus sumažinta MIK (MIK/2) ir 4 kartus sumažinta MIK (MIK/4). Kontroliniam mėginiui vietoje junginio pridedama 200 μ L YPD terpės. Mėginiai inkubuojami 30 °C temperatūroje 1, 2 ir 4 valandas. Po inkubacijos iš kiekvieno mėginio 10 μ L ląstelių suspensijos sėjama ant agarizuotos YPD terpės. Lėkštelės inkubuojamos 30 °C termostate 48 val., po inkubacijos suskaičiuojamos užaugusios kolonijos.

2.2.5. Reaktyvių deguonies formų įvertinimas

ROS susidarymo analizei naudojamas „DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit“ rinkinys. Po 2 valandų MIK/2 ir MIK/4 priešgrybelinių junginių poveikio, ląstelės surenkamos ir plaunamos 2 kartus dejonizuotu vandeniu ir PBS buferiu, ląstelės suspenduojamos PBS buferyje. Ląstelės inkubuojamos PBS buferyje skiestu DCFDA tirpalu iki galutinės 10 μ M koncentracijos ir inkubuojamos 45 min. 30 °C temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos ląstelės 2 kartus plaunamos PBS buferiu. 100 μ L ląstelių suspensijos pilama į mikroplokštelės šulinėlius. Fluorescencinė mikroskopija atlie-

kama VU GMC Atviros prieigos centre su fluoresceino izotiocianatui (FITC) būdingu filtru, naudojantis Olympus IX83 fluorescenciniu mikroskopu. Fluoresuojančių ląstelių kiekybiniam įvertinimui naudojama ImageJ programinė įranga.

2.2.6. Aktyvių kaspazių nustatymas

Aktyvios kaspazės mielių ląstelėse nustatomos naudojant „Generic Caspase Activity Assay Kit – Fluorometric Green“ rinkinį. Po 2 valandų MIK/2 ir MIK/4 priešgrybelinių junginių poveikio, ląstelės surenkamos ir plaunamos 3 kartus PBS buferiu ir suspenduojamos jame. Ląstelės inkubuojamos 500 µL PBS buferyje į kurį įpilamas 1 µL 500X TF2-VAD-FMK junginio ir inkubuojama 2 val. 30 °C temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos ląstelės 3 kartus plaunamos PBS buferiu. 100 µL ląstelių suspensijos pilama į mikroplokštelės šulinėlius. Fluorescencinė mikroskopija atliekama VU GMC Atviros prieigos centre su fluoresceino izotiocianatui (FITC) būdingu filtru, naudojantis Olympus IX83 fluorescenciniu mikroskopu. Fluoresuojančių ląstelių kiekybiniam įvertinimui naudojama ImageJ programinė įranga.

2.2.7. Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymas

Fosfatidilserino išsidėstymas išoriniame membranos sluoksnyje nustatomas FITC žymėtu aneksinu V, naudojant „ROTITEST® Annexin V“ rinkinį. Po 2 valandų MIK/2 ir MIK/4 priešgrybelinių junginių poveikio, ląstelės surenkamos ir plaunamos 2 kartus mielių sferoplastų skyrimo buferiu ir suspenduojamos jame. Mielų sienelė dalinai degraduojama naudojant 5 U/mL zymoliazės fermento, inkubuojama 10 min. 30 °C temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos ląstelės plaunamos 2 kartus rinkinyje esančiu 10X buferiu, skiestu 10 kartų 1,2 M sorbitoliu, centrifuguojant 800 aps/min 10 min. ir suspenduojamos jame. 1 µL Aneksino V-FITC konjugato ir PI įpilama į 18 µL ląstelių suspensijos ir inkubuojama 15 min. 30 °C temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos į ląstelių suspensiją įpilama 80 µL rinkinio buferio ir visas tūris perkeliamas į mikroplokštelės šulinėlį. Fluorescencinė mikroskopija atliekama VU GMC Atviros prieigos centre su fluoresceino izotiocianatui (FITC) būdingu filtru, naudojantis Olympus IX83 fluorescenciniu mikroskopu. Fluoresuojančių ląstelių kiekybiniam įvertinimui naudojama ImageJ programinė įranga.

2.2.8. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant „Microsoft Excel“ programinę įrangą. Rezultatų apibendrinimui, duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinė paklaida (SE). Visi kiekybiniai eksperimentai buvo atlikti trijų biologinių pakartojimų pagrindu. Statistiniam reikšmingumui įvertinti buvo naudojamas Stjudento (Student's) t-testas.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Priešgrybelinių junginių MIK nustatymas

Šiame tyrime buvo nustatytos priešgrybelinių junginių: nistatino dihidrato bei klotrimazolo minimalios inhibitorinės koncentracijos. Buvo įvertinta ar skirtingas telomerų ilgis turi įtakos MIK kitimui G ir MG sąlygomis. Rezultatai pateikiami 3.1 lentelėje. MG poveikis DLY 1479 kamienui turinčiam trumpas telomeras lėmė sumažėjusį atsparumą klotrimazolui, o nistatino dihidratui MIK nepakito. MG poveikis DLY 641 kamienui turinčiam normalias telomeras lėmė sumažėjusį atsparumą klotrimazolo ir nistatino dihidrato MIK. MG poveikis ilgas telomeras turinčiam kamienui, priešgrybelinių junginių MIK pokyčių nebuvo pastebėta.

MIK pokytis stebimas ne tik tarp gravitacijoje ir mikrogravitacijoje augintų ląstelių, bet ir tarp atskirų kamienų. Nistatino dihidrato MIK pakito tik normalias telomeras turinčiose mielėse augintose G sąlygomis. Klotrimazolo MIK visuose kamienuose augintuose G sąlygomis nekito, tačiau MG sąlygose lyginant su ilgas telomeras turinčiomis mielėmis, kituose kamienuose MIK sumažėjo.

3.1 lentelė. Tyrimo metu nustatytos skirtingą telomerų ilgį turinčių kamienų MIK reikšmės priešgrybeliniams junginiams.

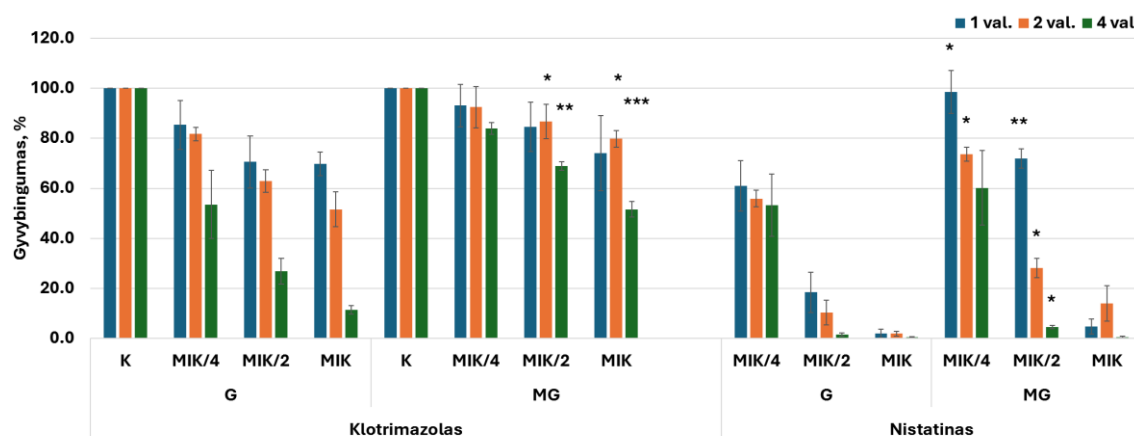
	Priešgrybeliniai junginiai	DLY 641 (normalios telomeros)		DLY 1479 (trumpas telomeros)		DLY 5396 (ilgos telomeros)	
		G	MG	G	MG	G	MG
MIK, μg/mL	Nistatinas	1,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	Klotrimazolas	12,0	10,0	12,0	10,0	12,0	12,0

Kitų autorių duomenimis buvo parodyta, kad nistatino dihidrato ir klotrimazolo MIK ribos yra atitinkamai 1–4 μg/mL ir 0,06–0,25 μg/mL (Richter *et al.*, 2005). Šio tyrimo nustatytas nistatino dihidrato MIK sutampa su prieš tai minėtomis MIK ribomis nepriklausomai nuo auginimo sąlygų ir telomerų ilgio, tačiau klotrimazolo MIK visiškai neatitinka literatūroje esančių MIK reikšmių. Tai gali būti dėl to, kad šiame tyrime buvo naudota kita mitybinė terpė, auginimo temperatūra bei inkubacijos laikas.

3.2. Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas

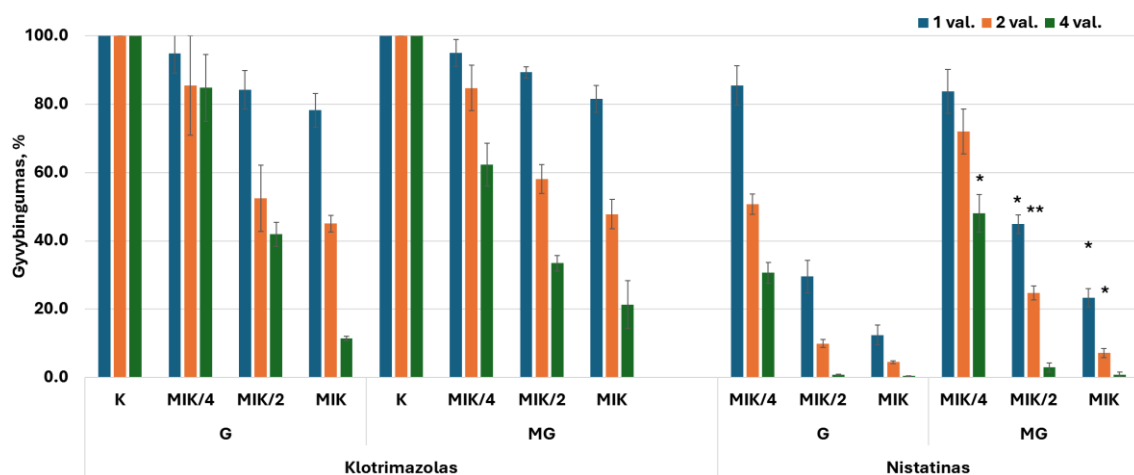
Šiame tyrime buvo įvertinta ar skirtingas telomerų ilgis turi įtakos mielių gyvybingumui po poveikio priešgrybeliniais junginiais skirtingais laiko momentais įprastos gravitacijos (G) ir mikrogravitacijos (MG) sąlygomis, siekiant nustatyti optimalią mielių inkubacijos su priešgrybeliniu junginiu trukmę. Mielių ląstelių gyvybingumas buvo vertinimas po 1, 2 ir 4 val. inkubacijos YPD terpėje su priešgrybelinių junginių MIK/4, MIK/2 bei MIK.

Atlikus tyrimus nustatyta, kad mikrogravitacijos sąlygos reikšmingai padidino DLY 1479 kamieno ląstelių gyvybingumą, kai buvo veikiamos skirtingomis priešgrybelinių junginių – klotrimazolo ir nistatino – koncentracijomis. Po 2 ir 4 valandų poveikio klotrimazolo MIK/2 ir MIK, gyvybingumas padidėjo atitinkamai 1,38; 1,55 karto ir 2,55; 4,53 karto lyginant su G augintomis ląstelėmis. Nistatino poveikio metu, mikrogravitacija taip pat turėjo teigiamą poveikį ląstelių išgyvenamumui – po 1 val. MIK/4 ir MIK/2 gyvybingumas padidėjo atitinkamai 1,61 ir 3,91 karto, po 2 val. – 1,32 ir 2,71 karto, o po 4 val. esant MIK/2 koncentracijai – net 3,00 karto (žr. 3.1 pav.).



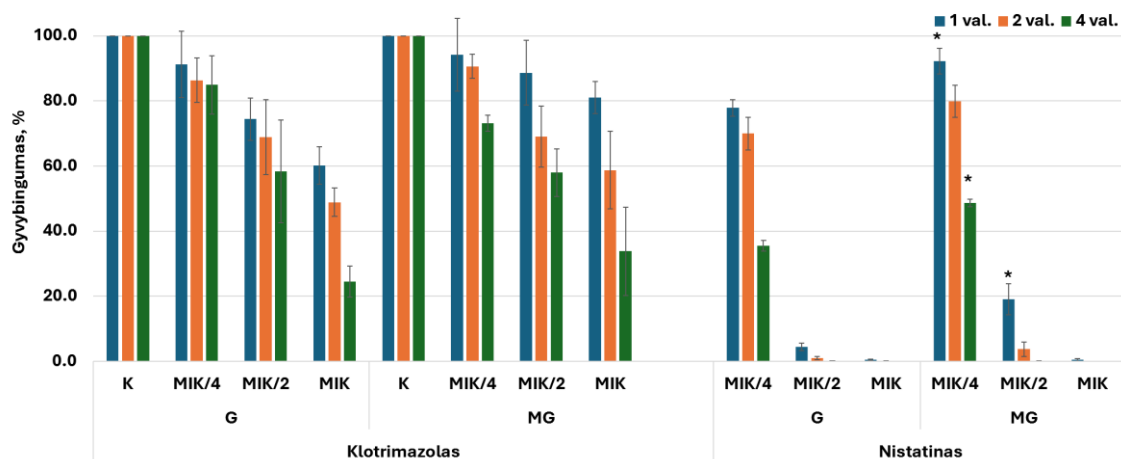
3.1 pav. *S. cerevisiae* DLY 1479 kamieno klonogeninio tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjuudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

Po poveikio nistatino MIK/2 ir MIK MG poveikis lėmė atitinkamai 1,55; 1,86 – po 1 val., 2,48; 1,60 – po 2 val. bei 1,57 karto MIK/4 po 4 val. padidėjusį DLY 641 kamieno gyvybingumą (žr. 3.2 pav.).



3.2 pav. *S. cerevisiae* DLY 641 kamieno klonogeninio tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjuudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

Po poveikio nistatino MIK/4 ir MIK/2 MG poveikis lėmė atitinkamai 1,19 – po 1 val., 4,24 – po 2 val. bei 1,37 karto MIK/4 po 4 val. padidėjusį DLY 5396 kamieno gyvybingumą (žr. 3.3 pav.).

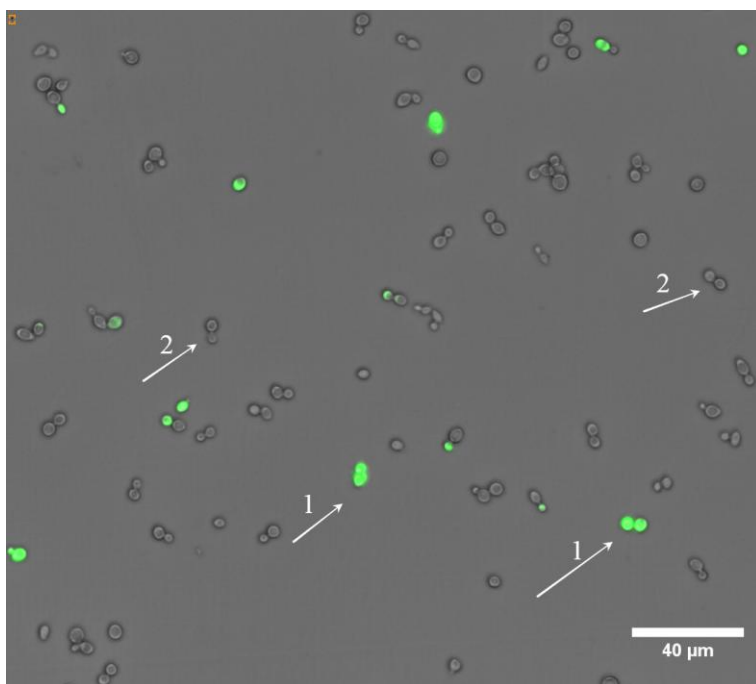


3.3 pav. *S. cerevisiae* DLY 5396 kamieno klonogeninio tyrimo rezultatai. p reikšmė: $\leq 0,05$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida

Didžiausias gyvybingumo pokytis (4,53 karto) nustatytas tarp G ir MG augintų, trumpas telomeras turinčių ląstelių. Yra mokslinių duomenų, kad trumpesnės telomeros lemia ilgesnę *S. cerevisiae* ląstelių chronologinę gyvenimo trukmę. Pailgėjusi mielių gyvenimo trukmė galėjo lemti ir didesnę atsparumą (Austriaco and Guarente, 1997). Remiantis (Nielsen *et al.*, 2021), oportunistinės patogeninės mielės geba padidinti priešgrybelinį atsparumą mikrogravitacijos sąlygose dėl fiziologinių adaptacijų, tokių kaip pakitusi morfologija, padidėjęs augimas ir galimo atsako į stresą kelių aktyvavimo. Tokie ar panašūs pokyčiai galėjo įvykti ir *S. cerevisiae* mielėse. Padidėjęs gyvybingumas MG sąlygose nustatytas ir kituose tirtuose kamienuose, tokią tendenciją galima paaiškinti remiantis (Crabbé *et al.*, 2013) mokslininkų duomenimis. Nustatyta, kad genai, susiję su priešgrybeliniais vaisiais ir atsparumu stresui, buvo skirtingai reguliuojami skrydžio į kosmosą metu, įskaitant ABC pernešėjų indukciją taip pat sumažėjusią ergosterolį koduojančių genų raišką, o genų, susijusių su atsparumu oksidaciniam stresui – sumažėjusią raišką.

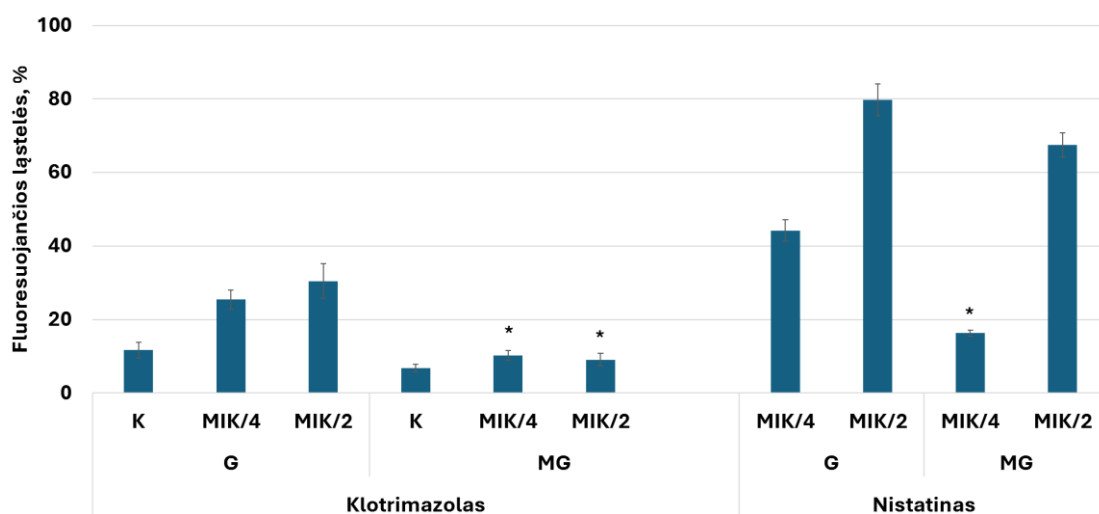
3.3. ROS susidarymo nustatymas

Šiame tyrime buvo įvertinta, ar skirtingas telomerų ilgis turi įtakos mielių oksidaciniam stresui po 2 val. poveikio MIK/4 ir MIK/2 priešgrybeliniais junginiais įprastos gravitacijos (G) ir mikrogravitacijos (MG) sąlygomis. Reaktyvios deguonies formos (ROS) yra chemiškai reaktyvios molekulės, gaminamos ląstelėse, patiriančiose stresą, jų kaupimasis gali signalizuoti apie oksidacinius pažeidimus arba aktyvuoti ląstelių žūties signalinius kelius. DCFDA (2',7'-dichlorofluoresceino diacetatas) yra jautrus fluorochromas, kurio oksidacija viduląstelinuose procesuose leidžia detektuoti ROS kaupimąsi, todėl šis metodas laikomas patikimu oksidacinio streso biožymeniu. Ląstelės, nusidažančios žaliai, rodo padidėjusį ROS lygį dėl DCFDA zondo oksidacijos, o nesidažančios ląstelės parodo mažą arba neaptinkamą ROS aktyvumą (žr. 3.4 pav.). Ši analizė leidžia įvertinti, kaip skirtingo ilgio telomeros gali daryti įtaką ląstelių atsakui į stresą, nepalankiomis sąlygomis, įskaitant mikrogravitacijos sąlygas.



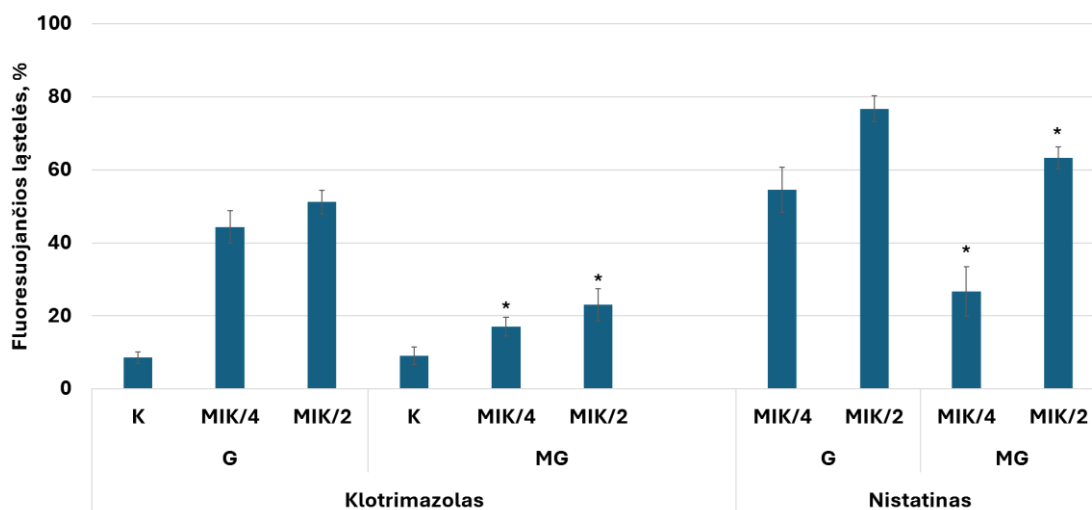
3.4 pav. ROS teigiamų mielių ląstelių identifikavimas. 1. Žaliai nusidažo ROS teigiamos ląstelės. 2. ROS neigiamos ląstelės nesidažo.

MG poveikis lėmė atitinkamai 2,70 bei 3,68 karto sumažėjusį DLY 1479 kamieno ROS teigiamų ląstelių skaičių, po poveikio MIK/4 ir MIK/2 klotrimazolu, o po poveikio MIK/4 nistatinu – 2,91 karto sumažėjusį ROS teigiamų ląstelių skaičių (žr. 3.5 pav.).



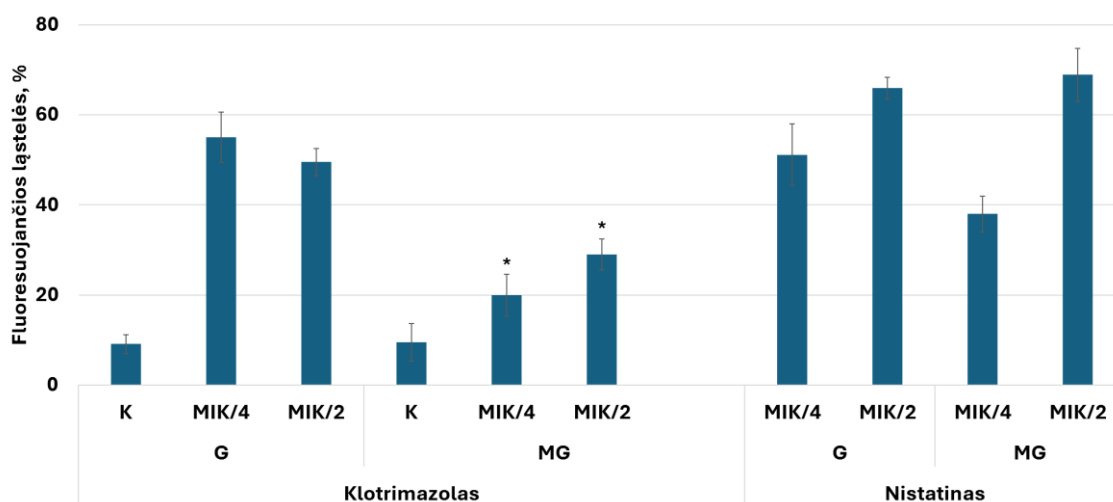
3.5 pav. *S. cerevisiae* DLY 1479 kamieno ROS tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

MG poveikis lėmė atitinkamai 2,60 ir 2,22 karto sumažėjusį DLY 641 kamieno ROS teigiamų ląstelių skaičių, po poveikio MIK/4 ir MIK/2 klotrimazolu, po poveikio MIK/4 ir MIK/2 nistatinu MG poveikis lėmė atitinkamai 2,05; 1,21 karto padidėjusį ROS teigiamų ląstelių skaičių (žr. 3.6 pav.).



3.6 pav. *S. cerevisiae* DLY 641 kamieno ROS tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

MG poveikis lėmė atitinkamai 2,76 ir 1,71 karto sumažėjusį DLY 5396 kamieno ROS teigiamų ląstelių skaičių, po poveikio MIK/4 ir MIK/2 klotrimazolu (žr. 3.7 pav.).



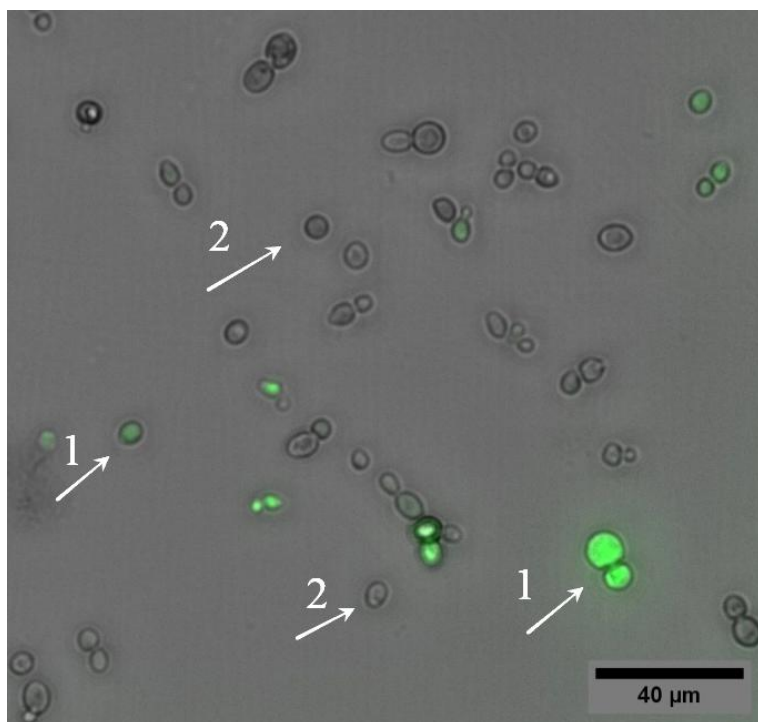
3.7 pav. *S. cerevisiae* DLY 5396 kamieno ROS tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad MG aplinka visuose tirtuose kamieniuose nepriklausomai nuo telomerų ilgio sąlygoja mažesnę ROS teigiamų ląstelių skaičių nei G aplinkoje. Kiti tyrimai atlikti simuliuotos mikrogravitacijos kontekste rodo tendenciją, kad įprastai MG aplinka sąlygoja didesnę *S. cerevisiae* ląstelių oksidacinį stresą. Simuliuota mikrogravitacija kaip nustatė (Hammond, Allen and Birdsall, 2015) sukelia reikšmingus pokyčius mielių redokso balanse – padidėjusį ROS kiekį bei sumažėjusį viduląstelinį glutathiono lygį. Šie pokyčiai yra panašūs į tuos, kuriuos sukelia tam tikri chemoterapiniai junginiai, todėl manoma, kad mikrogravitacija sąlygoja mitochondrijų funkcijos pokyčius bei susijusius signalinius kelius, turinčius įtakos ne tik ląstelių stresui, bet ir atsakui į vaistų poveikį. Nors tyrimo rezultatai skiriasi nuo literatūroje aprašomų, ROS kiekio sumažėjimas tiesiogiai koreliuoja su klonogeninio testo rezultatais – ląstelių gyvybingumas buvo didžiausias ten, kur ROS

lygis buvo mažiausias. (Pyatrikas *et al.*, 2015) tyrime pastebėta stipri koreliacija tarp ROS gamybos padidėjimo ir mitochondrijų membranos potencialo praradimo, kurie abu buvo susiję su ląstelių mirties progresavimu. Ląstelės, kurių ROS lygis buvo didesnis, prarado didesnę membranos potencialą, ir šios ląstelės buvo labiau linkusios progresuoti į apoptozę arba nekrozę. Skirtumai tarp šio ir kitų mokslininkų tyrimų rezultatų taip pat galėjo atsirasti dėl skirtingų mielių kamienų, auginimo sąlygų bei inkubacijos laiko mikrogravitacijos aplinkoje.

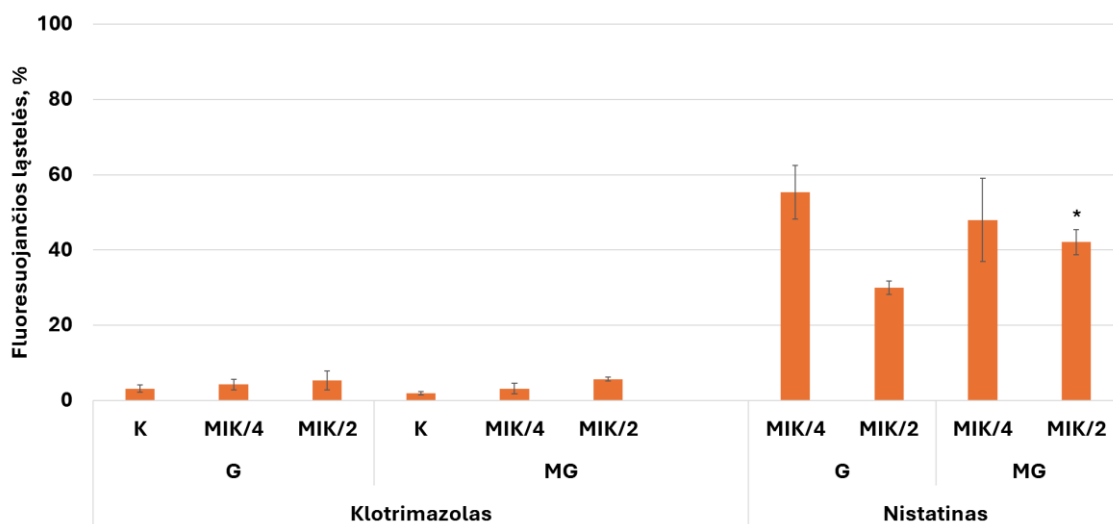
3.4. Aktyvių kaspazių identifikavimas

Šiame tyrime buvo įvertinta, ar skirtingas telomerų ilgis turi įtakos mielių kaspazių aktyvacijai po 2 valandų poveikio MIK/4 ir MIK/2 koncentracijos priešgrybeliniais junginiais, taikant įprastos gravitacijos (G) ir mikrogravitacijos (MG) sąlygas. Kaspazės yra cisteino tipo proteazės, kurios atlieka esminį vaidmenį vykdant programuotą ląstelių mirtį (apoptozę), reaguodamos į viduląstelinius pažeidimus ir streso signalus. Jų aktyvacija lemia struktūrinius ir funkcinius pokyčius ląstelėje, pavyzdžiui, branduolio fragmentaciją, DNR skaidymą bei citoplazminių baltymų skilimą, todėl laikoma vienu svarbiausių apoptozės rodiklių. Žaliai nusidažančios ląstelės turi aktyvias kaspazes, o nesidažančiose ląstelėse kaspazių aktyvumo nenustatyta (žr. 3.8 pav.).



3.8 pav. Aktyvių kaspazių identifikavimas mielių ląstelėse. 1. Žaliai nusidažo aktyvias kaspazes turinčios ląstelės. 2. Ląstelės, neturinčios aktyvių kaspazių, nesidažo.

Nustatyta, kad DLY 1479 kamieno ląstelių poveikis MIK/2 nistatinu mikrogravitacijos aplinkoje sąlygojo 1,40 karto didesnę kaspazių aktyvaciją nei G aplinkoje augintose ląstelėse (žr. 3.9 pav.).



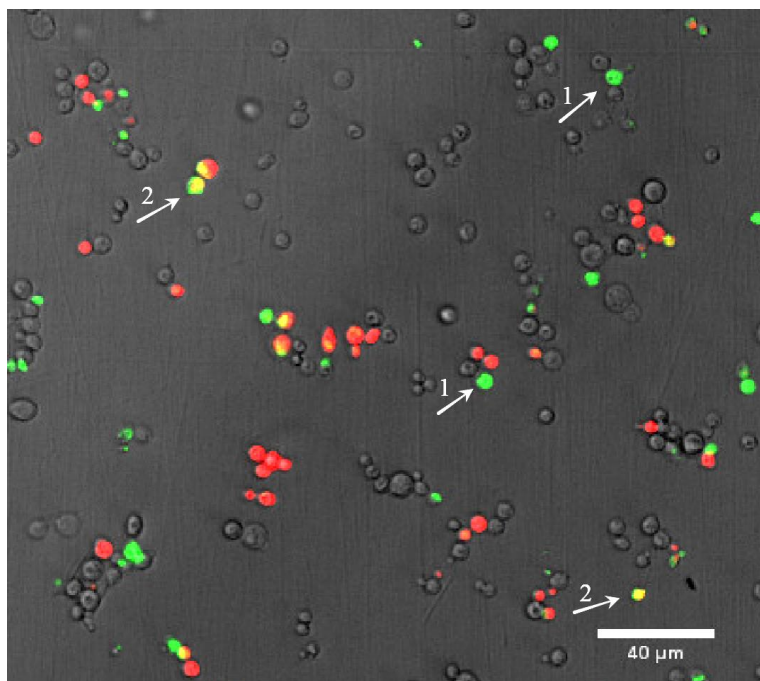
3.9 pav. *S. cerevisiae* DLY 641 kamieno aktyvių kaspazių tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

Statistiškai reikšmingas kaspazių aktyvacijos teigiamas pokytis buvo nustatytas tik normalias telomeras turinčio kamieno ląstelėse. Šis rezultatas koreliuoja su kitų mokslininkų atliktais tyrimais. (Hammond *et al.*, 2018b) nustatė, kad kaspazių aktyvumas *S. cerevisiae* mielėse simuliuotos mikrogravitacijos sąlygomis padidėjo 1,50 karto, o skrydžio į kosmosą sąlygos lėmė dar didesnę, maždaug 2,00 kartus išaugusį kaspazių aktyvumą. Šie duomenys rodo, kad mikrogravitacija veikia kaip stresorius, kuris gali paskatinti ląsteles įsijungti į programuotos mirties procesus, o tai yra svarbu analizuojant ląstelių atsparumą ar pažeidžiamumą nepalankiose aplinkose, tokiose kaip kosmosas. Autoriai pabrėžia kaspazės aktyvumo tyrimą kaip vertingą ląstelių streso mikrogravitacijoje biožymenį. Toks požiūris atveria galimybes taikyti kaspazių aktyvumo vertinimą kaip jautrų metodą tiriant mikroorganizmų atsaką į ekstremalias sąlygas, bei vertinant genetinių veiksnių, tokių kaip telomerų ilgis, įtaką šiam atsakui.

3.5. Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymas

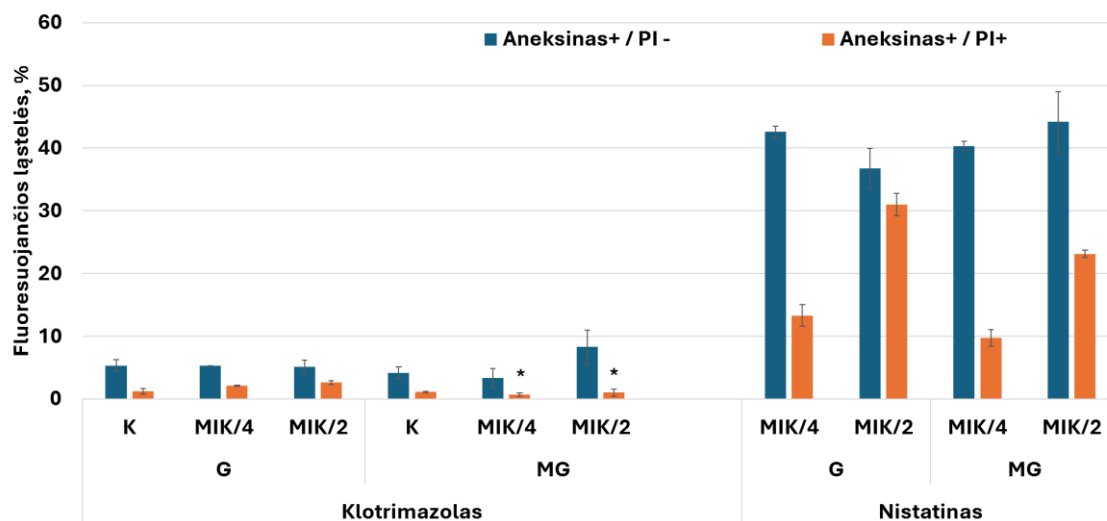
Šiame tyrime buvo įvertinta ar skirtingas telomerų ilgis turi įtakos mielių fosfatidilserino lokalizacijos pokyčiams po 2 val. poveikio MIK/4 ir MIK/2 priešgrybeliniais junginiais įprastos gravitacijos (G) ir mikrogravitacijos (MG) sąlygomis. Fosfatidilserino translokacija iš vidinio į išorinį plazminės membranos sluoksnio yra vienas pirmųjų ir labiausiai charakteringų apoptozės pradžios žymenų. Šiam reiškiniui aptikti buvo panaudotas aneksinas V, kuris selektyviai jungiasi prie fosfatidilserino, kai šis tampa pasiekiamas membranos išorėje. Tuo tarpu propidžio jodidas, prasiskverbia tik į ląsteles, kurių membrana jau pažeista, ir interkaluoja su DNR. Žalia fluorescencija, kai ląstelės dažosi tik aneksinu V, rodo ankstyvas apoptozines ląsteles (Aneksinas⁺ / PI⁻), geltona fluorescencija

rodo nekrozinės ląstelės (Aneksinas⁺ / PI⁺), o nesidažančios ląstelės yra gyvybingos (žr. 3.10 pav.).



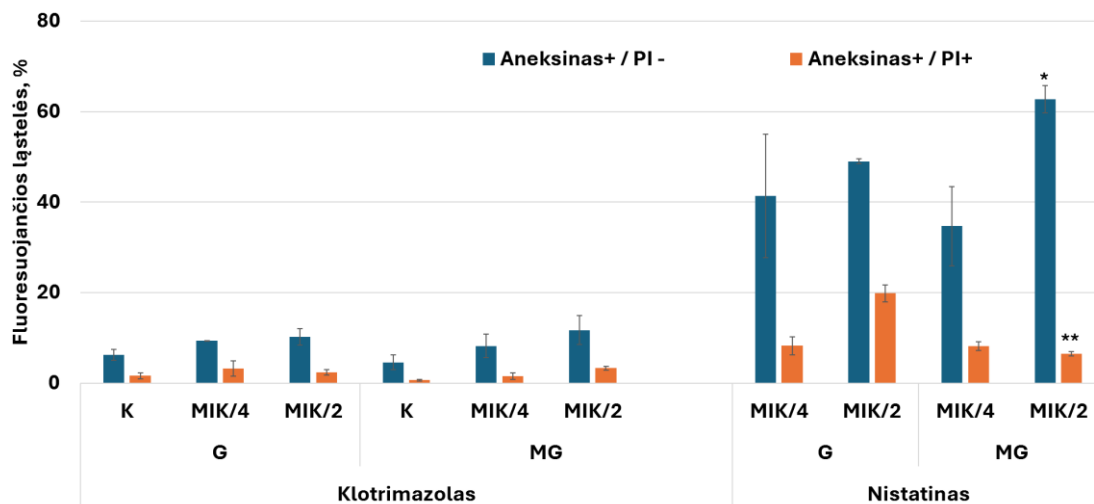
3.10 pav. Dvigubas ląstelių dažymas. Ankstyvosios apoptozės fenotipai (Aneksinas⁺ / PI⁻) (1) identifikuojami pagal fosfatidilserino atsiradimą plazminės membranos išorėje, tokios ląstelės nusidažo aneksinu (žaliai) bet ne propidžio jodidu (raudonai). Ląstelių dažymasis abiem dažais rodo nekrozę (Aneksinas⁺ / PI⁺) (2), pažeista plazminė membrana tampa laidi ir dažai lengvai patenka į ląstelės vidų.

Nustatyta, kad MG poveikis lėmė atitinkamai 2,59 ir 2,25 karto sumažėjusį DLY 1479 kamieno Aneksinas⁺ / PI⁺ fenotipą turinčių ląstelių skaičių, po poveikio MIK/4 ir MIK/2 nistatinu (žr. 3.11 pav.).



3.11 pav. *S. cerevisiae* DLY 1479 kamieno žūties tipo tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

MG poveikis lėmė 1,28 karto padidėjusį Aneksinas⁺ / PI⁻ fenotipą turinčių DLY 641 kamieno ląstelių skaičių ir 1,95 karto padidėjusį Aneksinas⁺ / PI⁺ fenotipą turinčių ląstelių skaičių, po poveikio MIK/2 nistatinu (žr. 3.12 pav.).



3.12 pav. *S. cerevisiae* DLY 641 kamieno žūties tipo tyrimo rezultatai. p reikšmė: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,005$. Statistiniam reikšmingumui nustatyti naudotas stjudento t-testas. Paklaidų juostose pavaizduota standartinė paklaida.

Tiek tikros, tiek simuliuotos mikrogravitacijos poveikis reikšmingai padidina apoptozinių ir nekrozinų ląstelių populiacijas *S. cerevisiae* mielėse, kaip rodo (Hammond *et al.*, 2018b) mokslininkų atliktas aneksino / PI dažymas. Ankstyvųjų apoptozinių ląstelių (Aneksino⁺ / PI⁻) padaugėjo maždaug 2 kartus simuliuotos mikrogravitacijos ir daugiau nei 2,5 karto skrydžio į kosmosą metu, o vėlyvųjų apoptozinių/nekrozinų ląstelių (Aneksino V⁺ / PI⁺) skaičius padidėjo iki 2 kartų. Laiko eigos analizė parodė, kad ankstyva apoptozė atsirado per 24 valandas, o dominuojanti vėlyvoji apoptozinė / nekrozinė populiacija per 48–72 valandas. Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad MG poveikis sumažino Aneksinas⁺ / PI⁺ fenotipą trumpas ir normalias telomeras turinčių ląstelių kiekį bei padidino Aneksinas⁺ / PI⁻.

Tyrimai rodo, kad didelė mielių genomo dalis anksti reaguoja į imituojamą mikrogravitaciją, o pokyčiai išlieka net 25 kartas. Yra nustatyti genai, kurie dalyvauja ląstelių signaliniuose keliuose, leidžiantys ląstelėms aptikti ir reaguoti į simuliuotą mikrogravitaciją (Sheehan *et al.*, 2007). Nors ir mielių telomerų ilgis yra griežtai kontroliuojamas, jų homeostazėje dalyvauja daug genų ir yra stabilus vidutinis dydis, kuris rodo santykinai mažą kintamumą. Nepaisant to, mielių ląstelės yra labai tolerantiškos telomerų ilgio svyravimams (Harari, Zadok-Laviel and Kupiec, 2017). Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad MG sąlygos ir telomerų ilgis daro įtaką ląstelių atsparumui priešgrybeliniams junginiams ir ląstelių žūčiai. Šio tyrimo rezultatai galėjo skirtis nuo kitų autorių darbų dėl skirtingų ląstelių kamienų, pasirinkto metodo, dėl pleotropinio mikrogravitacijos poveikio paliečiančio daugybę skirtingų ląstelės fiziologijos aspektų, todėl būsimi tyrimai turėtų būti skirti molekulinį kelių lemiančių ląstelių pokyčius išaiškinimui simuliuotos mikrogravitacijos sąlygose. Tai gali padėti atrasti sudėtingus mechanizmus, leidžiančius gyvybei egzistuoti ekstremaliose aplinkose.

Išvados

1. Mikrogravitacijos poveikis lėmė atitinkamai 1,66 ir 1,2 karto sumažėjusį DLY 641 kamieno atsparumą klotrimazolui bei nistatinui. DLY 1479 kamieno atsparumas klotrimazolui sumažėjo 1,2 karto.
2. Mikrogravitacijos aplinka lėmė padidėjusį visų kamienų ląstelių gyvybingumą po poveikio klotrimazolu ir nistatinu.
3. Mikrogravitacijos sąlygos lėmė sumažėjusį visų kamienų ROS teigiamų ląstelių skaičių po poveikio klotrimazolu, o paveikus nistatinu – sumažėjusį DLY 1479 bei padidėjusį DLY 641 kamieno ROS teigiamų ląstelių skaičių.
4. DLY 641 kamieno ląstelių poveikis nistatinu mikrogravitacijos aplinkoje sąlygojo kaspazių aktyvaciją.
5. Nistatino poveikis lėmė padidėjusį DLY 641 Aneksinas⁺ / PI⁻ fenotipą bei sumažėjusį DLY 1479 ir DLY 641 Aneksinas⁺ / PI⁺ fenotipą turinčių ląstelių skaičių mikrogravitacijos sąlygose.

Autoriaus asmeninis indėlis

Šiame darbe visi aprašyti eksperimentai atlikti savarankiškai. Tyrimo idėją suformulavo prof. dr. Eglė Lastauskienė, tyrimo eiga bei rezultatų analizė planuota savarankiškai. Prie išvadų formulavimo prisidėjo prof. dr. Eglė Lastauskienė. Prie teksto mokslinio redagavimo, rezultatų ir išvadų įvertinimo prisidėjo prof. dr. Eglė Lastauskienė.

Rezultatų sklaida

Pristatyti stendiniai pranešimai:

1. Effects of Microgravity on Yeast Death Type and Resistance to Reactive Oxygen Species. Čiužas I., Anužienė G., Versockienė J., Lastauskienė E. The COINS 2024, 2024.04.18, Lietuva, Vilnius.
2. FTIR-ATR Analysis for the Opportunistic Yeasts Grown in Simulated Microgravity and Resistance to Physical Agents. Čiužas I., Anužienė G., Versockienė J., Lastauskienė E. OPEN READINGS 2024, 2024.04.26, Lietuva, Vilnius.

Stendinių pranešimų bendraautorius:

1. Discrimination of Pathogenic Yeast and Bacteria by Means of ATR IR Spectroscopy. Anužienė G., Čiužas I., Lastauskienė E., Čėponkus J. OPEN READINGS 2024, 2024.04.24, Lietuva, Vilnius.
2. Discrimination of Pathogenic Bacteria and Yeast by Means of ATR IR Spectroscopy. Anužienė G., Čiužas I., Taraškevičius T., Lastauskienė E., Čėponkus J. 13th International Conference, 2024.06.04, Graikija, Janina.

Finansuoti projektai:

1. Baigiamasis darbas dalinai finansuotas Lietuvos mokslo tarybos lėšomis pagal priemonę Nr. P-ST-23-58 „Studentų praktika semestrų metu“ įgyvendinant projektą „Mikrogravitacijos ir telomerų ilgio poveikis mielių žūties tipui bei atsparumui reaktyvioms deguonies formoms“.

Padėka

Padėka išreiškiama darbo vadovei prof. dr. Eglei Lastauskienei už nuolatinę pagalbą, rūpestį bei motyvaciją. Dėkojame VU GMC EMBL PI Dr. Urtei Neniškytei už suteiktą galimybę naudotis fluorescenciniu mikroskopu ir doktorantei Eiminai Dirvelytei už pagalbą mokantis juo naudotis. Padėka dr. Mikhajlo Zubko už padovanotus darbe naudotus mielių kamienus.

Irmantas Arūnas Čiužas

Magistro baigiamasis darbas

**Mikrogravitacijos poveikis skirtingą telomerų ilgį turinčių mielių žūčiai bei atsparumui
priešgrybeliniams junginiams**

SANTRAUKA

Tolimos kosminės misijos, ateityje taps realybe, tačiau neigiamas kosmoso sąlygų poveikis gyviesiems organizmams yra akivaizdus, bet dar nėra pilnai suprastas. Nėra žinoma kaip ilgalaikėje perspektyvoje tai paveiks astronautų sveikatą. Eukariotinių ląstelių chromosomų galus nuo skilimo apsaugo telomeros, kurios yra paveikiamos, kai ląstelės patiria įvairų aplinkos sukeltą stresą. Tyrimai rodo, kad po trumpalaikių kosminių misijų, astronautai turi trumpesnes telomeras, o trumpesnės telomeros yra susijusios su ląstelių senėjimu ir ilgaamžiškumu. Šiame darbe tiriamas mikrogravitacijos poveikis skirtingą telomerų ilgį turinčių *S. cerevisiae* kamienų žūčiai bei atsparumui priešgrybeliniams junginiams lyginant ląsteles augintas įprastos gravitacijos ir simuliuotos mikrogravitacijos sąlygomis.

Tyrimo buvo įvertinti tokie cheminai veiksniai kaip atsparumas priešgrybeliniams junginiams – klotrimazolui bei nistatino dihidratui. Mikrogravitacija simuliuojama pasitelkiant rotacinę ląstelių kultivavimo sistemą, atsparumas cheminiams junginiams buvo įvertintas nustatant MIK bei įvertinant klonogeninio testo rezultatus, o ląstelių žūties analizė vertinama nustatant ROS formavimąsi, kaspazių aktyvaciją bei fosfatidilserino lokalicaciją.

Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad MG poveikis, priklausomai nuo kamieno ir pasirinkto metodo, gali lemti padidėjusį arba sumažėjusį atsparumą cheminiams junginiams. Vertinant ląstelių testo rezultatus MG poveikis lėmė sumažėjusį DLY 1479 ir DLY 641 kamienų atsparumą nistatinui ir klotrimazolui. Klonogeninio testo rezultatai rodo, kad MG poveikis lėmė padidėjusį atsparumą priešgrybeliniams junginiams. Stebimas ROS formavimosi sumažėjimas MG aplinkoje augintose visų kamienų ląstelėse, taip pat stebima ir kaspazių aktyvaciją DLY 641 kamieno ląstelėse. Nistatino poveikis lėmė padidėjusį DLY 641 Aneksinas⁺ / PI⁻ fenotipą bei sumažėjusį DLY 1479 ir DLY 641 Aneksinas⁺ / PI⁺ fenotipą turinčių ląstelių skaičių mikrogravitacijos sąlygose.

Irmantas Arūnas Čiužas

Master's thesis

Effects of Microgravity on Yeasts with Different Telomere Length Death and Resistance to Antifungal Compounds

ABSTRACT

Long-distance space missions will become a reality in the future, but the negative effects of space conditions on living organisms are obvious but not yet fully understood. It is not known how this will affect astronauts' health in the long term. The ends of eukaryotic cell chromosomes are protected from degradation by telomeres, which are affected when cells are exposed to various environmental stresses. Studies show that after short-term space missions, astronauts have shorter telomeres, and shorter telomeres are associated with cell aging and longevity. This work investigates the effect of microgravity on the death and resistance to antifungal agents of *S. cerevisiae* strains with different telomere lengths by comparing cells grown in normal gravity and simulated microgravity.

The study evaluated chemical factors such as resistance to antifungal compounds - clotrimazole and nystatin. Microgravity was simulated using a rotary cell culture system, resistance to chemical compounds was assessed by determining MIC and evaluating the results of the clonogenic test, and cell death analysis was assessed by determining ROS formation, caspase activation and phosphatidylserine localization.

Based on the results obtained, it can be concluded that the effect of MG, depending on the strain and the chosen method, can lead to increased or decreased resistance to chemical compounds. When evaluating the results of the MIC test, the effect of MG led to a decrease in the resistance of DLY 1479 and DLY 641 strains to nystatin and clotrimazole. The results of the clonogenic test show that the effect of MG led to increased resistance to antifungal compounds. A decrease in ROS formation was observed in cells of all strains grown in the MG environment, and caspase activation was also observed in cells of the DLY 641 strain. The effect of nystatin led to an increase in the DLY 641 Annexin⁺ / PI⁻ phenotype and a decrease in the number of cells with the DLY 1479 and DLY 641 Annexin⁺ / PI⁺ phenotype under microgravity conditions.

Literatūros sąrašas

- Afshinnekoo, E. *et al.* (2020) 'Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration', *Cell*, 183(5), pp. 1162–1184. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.050>.
- Alexandrov, A.I. *et al.* (2021) 'Systematic identification of yeast mutants with increased rates of cell death reveals rapid stochastic necrosis associated with cell division'. bioRxiv, p. 2021.10.20.465133. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465133>.
- Altenburg, S.D., Nielsen-Preiss, S.M. and Hyman, L.E. (2008) 'Increased Filamentous Growth of *Candida Albicans* in Simulated Microgravity', *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 6(1), pp. 42–50. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60019-4](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60019-4).
- Artandi, S.E. and DePinho, R.A. (2010) 'Telomeres and telomerase in cancer', *Carcinogenesis*, 31(1), pp. 9–18. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268>.
- Aunins, T.R. *et al.* (2018) 'Spaceflight Modifies *Escherichia coli* Gene Expression in Response to Antibiotic Exposure and Reveals Role of Oxidative Stress Response', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 310. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00310>.
- Austriaco, N.R. and Guarente, L.P. (1997) 'Changes of telomere length cause reciprocal changes in the lifespan of mother cells in *Saccharomyces cerevisiae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), pp. 9768–9772. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9768>.
- Benton, E.R. and Benton, E.V. (2001) 'Space radiation dosimetry in low-Earth orbit and beyond', *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 184(1), pp. 255–294. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(01\)00748-0](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(01)00748-0).
- Blackburn, E.H. and Epel, E.S. (2012) 'Too toxic to ignore', *Nature*, 490(7419), pp. 169–171. Available at: <https://doi.org/10.1038/490169a>.
- Bongomin, F. *et al.* (2017) 'Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision', *Journal of Fungi*, 3(4), p. 57. Available at: <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- Carrillo-Muñoz, A.J. *et al.* (1999) 'In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), pp. 397–401. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/44.3.397>.
- Chaves, S.R. *et al.* (2025) 'Current and novel approaches in yeast cell death research', *Cell Death & Differentiation*, 32(2), pp. 207–218. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41418-024-01298-2>.
- Chen, W.C., Chou, D.-L. and Feingold, D.S. (1978) 'Dissociation Between Ion Permeability and the Lethal Action of Polyene Antibiotics on *Candida albicans*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(6), pp. 914–917. Available at: <https://doi.org/10.1128/aac.13.6.914>.
- Cogoli, M. (1992) 'The fast rotating clinostat: a history of its use in gravitational biology and a comparison of ground-based and flight experiment results', *ASGSB bulletin*, 5(2), pp. 59–67.
- Crabbé, A. *et al.* (2013) 'Spaceflight enhances cell aggregation and random budding in *Candida albicans*', *PloS One*, 8(12), p. e80677. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080677>.

- Crucian, B. *et al.* (2016) 'Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight', *International Journal of General Medicine*, 9, pp. 383–391. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJGM.S114188>.
- Crucian, B.E. *et al.* (2008) 'Immune System Dysregulation Following Short- vs Long-Duration Spaceflight', *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 79(9), pp. 835–843. Available at: <https://doi.org/10.3357/ASEM.2276.2008>.
- Crucian, B.E. *et al.* (2018) 'Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1437. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01437>.
- Czepielewski, L.S. *et al.* (2016) 'Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging', *Schizophrenia Research*, 174(1–3), pp. 39–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.04.004>.
- Dai, Q., Furness, N.H. and Upadhyaya, M.K. (2004) 'UV-absorbing compounds and susceptibility of weedy species to UV-B radiation', *Weed Biology and Management*, 4(2), pp. 95–102. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2004.00125.x>.
- Dedolph, R.R. and Dipert, M.H. (1971) 'The Physical Basis of Gravity Stimulus Nullification by Clinostat Rotation 1', *Plant Physiology*, 47(6), pp. 756–764. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.47.6.756>.
- Denning, D.W. (2024) 'Global incidence and mortality of severe fungal disease', *The Lancet. Infectious Diseases*, 24(7), pp. e428–e438. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8).
- Dubinina, N.P. and Vaulina, E.N. (1974) 'Gravity, weightlessness and the genetic structures of organisms', *Life Sciences and Space Research*, 12, pp. 93–101. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-021783-3.50016-7>.
- Ferranti, F., Del Bianco, M. and Pacelli, C. (2021) 'Advantages and Limitations of Current Microgravity Platforms for Space Biology Research', *Applied Sciences*, 11(1), p. 68. Available at: <https://doi.org/10.3390/app11010068>.
- Forsyth, N.R., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) 'Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again', *Differentiation*, 69(4), pp. 188–197. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.690412.x>.
- Galluzzi, L. *et al.* (2007) 'Cell death modalities: classification and pathophysiological implications', *Cell Death & Differentiation*, 14(7), pp. 1237–1243. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>.
- Gardner, M. *et al.* (2014) 'Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis', *Experimental Gerontology*, 51, pp. 15–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.12.004>.
- Garrett-Bakelman, F.E. *et al.* (2019) 'The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight', *Science*, 364(6436), p. eaau8650. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aau8650>.
- Ge, X. *et al.* (2016) 'Involvement of NADH Oxidase in Biofilm Formation in *Streptococcus sanguinis*', *PLOS ONE*, 11(3), p. e0151142. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151142>.

- Guo, Z., Zhou, G. and Hu, W. (2022) ‘Carcinogenesis induced by space radiation: A systematic review’, *Neoplasia*, 32, p. 100828. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100828>.
- Hammond, T.G. *et al.* (2018a) ‘Physical Forces Modulate Oxidative Status and Stress Defense Meditated Metabolic Adaptation of Yeast Colonies: Spaceflight and Microgravity Simulations’, *Microgravity Science and Technology*, 30(3), pp. 195–208. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12217-017-9588-z>.
- Hammond, T.G. *et al.* (2018b) ‘Physical Forces Modulate Oxidative Status and Stress Defense Meditated Metabolic Adaptation of Yeast Colonies: Spaceflight and Microgravity Simulations’, *Microgravity Science and Technology*, 30(3), pp. 195–208. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12217-017-9588-z>.
- Hammond, T.G., Allen, P.L. and Birdsall, H.H. (2015) ‘Validation of Assays for Reactive Oxygen Species and Glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* during Microgravity Simulation’, *Gravitational and Space Research*, 3(2), pp. 42–53. Available at: <https://doi.org/10.2478/gsr-2015-0010>.
- Hammond, T.G. and Birdsall, H.H. (2022) ‘Yeast in Space’, in Y.V. Pathak, M. Araújo dos Santos, and L. Zea (eds) *Handbook of Space Pharmaceuticals*. Cham: Springer International Publishing, pp. 717–732. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-05526-4_8.
- Harari, Y., Zadok-Laviel, S. and Kupiec, M. (2017) ‘Long Telomeres Do Not Affect Cellular Fitness in Yeast’, *mBio*, 8(4), p. 10.1128/mbio.01314-17. Available at: <https://doi.org/10.1128/mbio.01314-17>.
- Herranz, R. *et al.* (2012) ‘Microgravity simulation by diamagnetic levitation: effects of a strong gradient magnetic field on the transcriptional profile of *Drosophila melanogaster*’, *BMC Genomics*, 13(1), p. 52. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-52>.
- Honig, L.S. *et al.* (2015) ‘Heritability of telomere length in a study of long-lived families’, *Neurobiology of Aging*, 36(10), pp. 2785–2790. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.017>.
- Horneck, G. and Rabbow, E. (2007) ‘Mutagenesis by outer space parameters other than cosmic rays’, *Advances in Space Research*, 40(4), pp. 445–454. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.asr.2006.12.049>.
- J, W. *et al.* (2019) ‘Is Telomere Length a Biomarker of Adaptive Response in Space? Curious Findings from NASA and Residents of High Background Radiation Areas’, *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 9(3), pp. 381–388. Available at: <https://doi.org/10.31661/jbpe.v9i3Jun.1151>.
- Kaeberlein, M., Burtner, C.R. and Kennedy, B.K. (2007) ‘Recent Developments in Yeast Aging’, *PLOS Genetics*, 3(5), p. e84. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030084>.
- Kashefi, K. and Lovley, D.R. (2003) ‘Extending the upper temperature limit for life’, *Science (New York, N.Y.)*, 301(5635), p. 934. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1086823>.
- Kavakçioğlu, B. and Tarhan, L. (2018) ‘Yeast caspase-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 induced by antifungal and potential antitumor agent clotrimazole’, *Archives of Microbiology*, 200(1), pp. 97–106. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1425-7>.

- Kawaguchi, Y. *et al.* (2020) ‘DNA Damage and Survival Time Course of Deinococcal Cell Pellets During 3 Years of Exposure to Outer Space’, *Frontiers in Microbiology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02050>.
- Kumar, D., Steele, E.J. and Wickramasinghe, N.C. (2020) ‘Preface: The origin of life and astrobiology’, *Advances in Genetics*, 106, pp. xv–xviii. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(20\)30037-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(20)30037-7).
- Lange, T. de (2018) ‘Shelterin-Mediated Telomere Protection’, *Annual Review of Genetics*, 52(Volume 52, 2018), pp. 223–247. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921>.
- Li, S. *et al.* (2023) ‘Links between telomere dysfunction and hallmarks of aging’, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 888, p. 503617. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503617>.
- Lin, J. and Epel, E. (2022) ‘Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms’, *Ageing Research Reviews*, 73, p. 101507. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507>.
- Liu, M. *et al.* (2005) ‘Global Transcriptional Programs Reveal a Carbon Source Foraging Strategy by Escherichia coli* ♦’, *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), pp. 15921–15927. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M414050200>.
- López-Otín, C. *et al.* (2013) ‘The Hallmarks of Aging’, *Cell*, 153(6), pp. 1194–1217. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Ludovico, P. *et al.* (2001) ‘Saccharomyces cerevisiae commits to a programmed cell death process in response to acetic acid’, *Microbiology*, 147(9), pp. 2409–2415. Available at: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-9-2409>.
- Luxton, J.J., McKenna, M.J., Lewis, A., *et al.* (2020) ‘Telomere Length Dynamics and DNA Damage Responses Associated with Long-Duration Spaceflight’, *Cell Reports*, 33(10). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108457>.
- Luxton, J.J., McKenna, M.J., Taylor, L.E., *et al.* (2020) ‘Temporal Telomere and DNA Damage Responses in the Space Radiation Environment’, *Cell Reports*, 33(10). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108435>.
- Lyu, X., Sang, P.B. and Chai, W. (2021) ‘CST in maintaining genome stability: Beyond telomeres’, *DNA Repair*, 102, p. 103104. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103104>.
- van der Meer, D. *et al.* (2023) ‘REALMS: Resilient exploration and lunar mapping system’, *Frontiers in Robotics and AI*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/frobt.2023.1127496>.
- Mehta, S.K. *et al.* (2013) ‘Reactivation of latent viruses is associated with increased plasma cytokines in astronauts’, *Cytokine*, 61(1), pp. 205–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.09.019>.
- Metur, S.P. *et al.* (2023) ‘Regulation of autophagy gene expression and its implications in cancer’, *Journal of Cell Science*, 136(10), p. jcs260631. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.260631>.
- Metur, S.P. and Klionsky, D.J. (2024) ‘Nutrient-dependent signaling pathways that control autophagy in yeast’, *FEBS Letters*, 598(1), pp. 32–47. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14741>.

- Moreno-Villanueva, M. *et al.* (2018) 'Synergistic Effects of Weightlessness, Isoproterenol, and Radiation on DNA Damage Response and Cytokine Production in Immune Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), p. 3689. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19113689>.
- Nielsen, S. *et al.* (2021) 'Growth and Antifungal Resistance of the Pathogenic Yeast, *Candida Albicans*, in the Microgravity Environment of the International Space Station: An Aggregate of Multiple Flight Experiences', *Life*, 11(4), p. 283. Available at: <https://doi.org/10.3390/life11040283>.
- Nislow, C. *et al.* (2015) 'Genes Required for Survival in Microgravity Revealed by Genome-Wide Yeast Deletion Collections Cultured during Spaceflight', *BioMed Research International*, 2015(1), p. 976458. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/976458>.
- Paulsen, K. *et al.* (2010) 'Microgravity-induced alterations in signal transduction in cells of the immune system', *Acta Astronautica*, 67(9), pp. 1116–1125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2010.06.053>.
- Perfect, J.R. (2017) 'The antifungal pipeline: a reality check', *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(9), pp. 603–616. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46>.
- Prasad, B. *et al.* (2020) 'Influence of Microgravity on Apoptosis in Cells, Tissues, and Other Systems In Vivo and In Vitro', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), p. 9373. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21249373>.
- Prasad, B. *et al.* (2021) 'How the space environment influences organisms: an astrobiological perspective and review', *International Journal of Astrobiology*, 20(2), pp. 159–177. Available at: <https://doi.org/10.1017/S1473550421000057>.
- Protsenko, E. *et al.* (2020) 'Are long telomeres better than short? Relative contributions of genetically predicted telomere length to neoplastic and non-neoplastic disease risk and population health burden', *PLOS ONE*, 15(10), p. e0240185. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240185>.
- Purevdorj-Gage, B., Sheehan, K.B. and Hyman, L.E. (2006) 'Effects of Low-Shear Modeled Microgravity on Cell Function, Gene Expression, and Phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), pp. 4569–4575. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.03050-05>.
- Pyatrikas, D.V. *et al.* (2015) 'Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions', *FEMS Microbiology Letters*, 362(12), p. fnv082. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv082>.
- Richter, S.S. *et al.* (2005) 'Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), pp. 2155–2162. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2155-2162.2005>.
- Romero, E. and Francisco, D. (2020) 'The NASA human system risk mitigation process for space exploration', *Acta Astronautica*, 175, pp. 606–615. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.04.046>.
- Rontó, G. *et al.* (2003) 'Solar UV Irradiation Conditions on the Surface of Mars', *Photochemistry and Photobiology*, 77(1), pp. 34–40. Available at: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770034SUICOT2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770034SUICOT2.0.CO2).

- Schwarz, R.P., Goodwin, T.J. and Wolf, D.A. (1992) 'Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity', *Journal of Tissue Culture Methods: Tissue Culture Association Manual of Cell, Tissue, and Organ Culture Procedures*, 14(2), pp. 51–57. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01404744>.
- Schweichel, J.-U. and Merker, H.-J. (1973) 'The morphology of various types of cell death in pre-natal tissues', *Teratology*, 7(3), pp. 253–266. Available at: <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>.
- Sheehan, K.B. *et al.* (2007) 'Yeast genomic expression patterns in response to low-shear modeled microgravity', *BMC genomics*, 8, p. 3. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-3>.
- Singh, R. *et al.* (2017) 'An Introduction to UV-B Research in Plant Science', in *UV-B Radiation*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119143611.ch1>.
- Sousa, F. *et al.* (2023) 'Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 199, p. 114969. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114969>.
- Tan, S. *et al.* (2020) 'Additive effects of simulated microgravity and ionizing radiation in cell death, induction of ROS and expression of RAC2 in human bronchial epithelial cells', *npj Microgravity*, 6(1), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41526-020-00123-7>.
- Thiel, C.S. *et al.* (2017) 'Time course of cellular and molecular regulation in the immune system in altered gravity: Progressive damage or adaptation?', *REACH*, 5, pp. 22–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.reach.2017.03.003>.
- Thirsk, R. *et al.* (2009) 'The space-flight environment: the International Space Station and beyond', *CMAJ*, 180(12), pp. 1216–1220. Available at: <https://doi.org/10.1503/cmaj.081125>.
- Tomsia, M. *et al.* (2024) 'Long-term space missions' effects on the human organism: what we do know and what requires further research', *Frontiers in Physiology*, 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1284644>.
- Trivedi, V. *et al.* (2005) 'Clotrimazole Inhibits Hemoperoxidase of Plasmodium falciparum and Induces Oxidative Stress: PROPOSED ANTIMALARIAL MECHANISM OF CLOTRIMAZOLE *', *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), pp. 41129–41136. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M501563200>.
- Valdes, A.M. *et al.* (2005) 'Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women', *The Lancet*, 366(9486), pp. 662–664. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66630-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66630-5).
- Van Mulders, S.E. *et al.* (2011) 'The Influence of Microgravity on Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae*', *Astrobiology*, 11(1), pp. 45–55. Available at: <https://doi.org/10.1089/ast.2010.0518>.
- Walther, I. *et al.* (1996) 'Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a bioreactor in microgravity', *Journal of Biotechnology*, 47(2), pp. 113–127. Available at: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01375-2](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01375-2).
- Yardımcı, B.K. and Tarhan, L. (2024) 'Oxidative effects of the human antifungal drug clotrimazole on the eucaryotic model organism *Saccharomyces cerevisiae*', *Archives of Microbiology*, 206(7), p. 290. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04031-2>.

Zea, L. *et al.* (2016) ‘A Molecular Genetic Basis Explaining Altered Bacterial Behavior in Space’, *PLOS ONE*, 11(11), p. e0164359. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164359>.

Zea, L. *et al.* (2017) ‘Phenotypic Changes Exhibited by *E. coli* Cultured in Space’, *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01598>.

Zeitlin, C. *et al.* (2019) ‘Measurements of radiation quality factor on Mars with the Mars Science Laboratory Radiation Assessment Detector’, *Life Sciences in Space Research*, 22, pp. 89–97. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.07.010>.

Zhang, X., Fang, X. and Liu, C. (2015) ‘Genomic and Proteomic Analysis of *Escherichia coli* After Spaceflight Reveals Changes Involving Metabolic Pathways’, *Archives of Medical Research*, 46(3), pp. 181–185. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.03.007>.

Zong, W.-X. and Thompson, C.B. (2006) ‘Necrotic death as a cell fate’, *Genes & Development*, 20(1), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1376506>.