

УДК 581.1

ЗАМЕДЛЕНИЕ ПРОЦЕССА ГИБЕЛИ КЛЕТОК В СЕГМЕНТАХ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ, ИНКУБИРУЕМЫХ НА РАСТВОРЕ САХАРОЗЫ

Ю.В. КАРПЕЦ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, Н.В. ШВИДЕНКО

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
62483 Харьков, п/о «Коммунист-1»*

Оценивали показатель гибели клеток (по окрашиванию эвансом голубым), генерацию супероксидных анион-радикалов и содержание продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида в колеоптилях пшеницы, отделяемых от интактных проростков разного возраста. У колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков, в течение последующей их 11-суточной инкубации на 2 %-м растворе сахарозы интенсивность генерации супероксидных анион-радикалов и степень окрашивания тканей эвансом голубым существенно не изменялись, содержание малонового диальдегида незначительно увеличивалось. У колеоптилей, отделенных от интактных проростков на 7-, 10- и 14-е сутки, отмечались флуктуации интенсивности генерации супероксидных анион-радикалов, более высокое содержание малонового диальдегида и повышение степени окрашивания эвансом голубым. Сделан вывод, что при отделении колеоптилей от интактных проростков и инкубации на растворе сахарозы в них замедляется интенсивность процессов гибели клеток.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., колеоптили, гибель клеток, супероксидный анион-радикал, пероксидное окисление липидов.

Колеоптили злаков считаются удобной моделью для изучения запрограммированной гибели растительных клеток. В колеоптилях проростков пшеницы на 5–6-е сутки с момента проращивания при температуре 26 °С установлен эффект межнуклеосомной фрагментации ДНК и наличие ультраструктурных признаков апоптоза: появление клеток с повышенной электронной плотностью цитоплазмы и органелл, структурная реорганизация и фрагментация цитоплазмы, возникновение в ней особых везикул, содержащих интактные органеллы [2].

В интактных колеоптилях пшеницы обнаружена цикличность генерации супероксидных анион-радикалов ($O_2^{\bullet-}$), совпадающая с циклами репликации ДНК [11]. Ныне можно считать практически доказанной связь между интенсивностью образования активных форм кислорода (АФК) и процессами гибели клеток, происходящими путем как апоптоза, так и некроза [18]. Предполагается участие АФК в активации каспазоподобных протеаз на ранних стадиях процесса апоптоза [14].

На примере колеоптилей пшеницы показано, что ускорение генерации супероксидных анион-радикалов внешними воздействиями активизирует процесс апоптоза [3], в то время как антиоксиданты продлевают жизнь колеоптилей и предотвращают апоптотическую межнуклеосомную фрагментацию ядерной ДНК и другие признаки апоптоза [1].

Если колеоптили в составе интактных проростков злаков рассматриваются как модель для изучения апоптоза у растений, то изолированные колеоптили злаков (чаще пшеницы) широко используются как модельный объект для исследования влияния экзогенных физиологически активных веществ и клеточных механизмов устойчивости к действию стрессоров [8]. Для обоснования корректности использования такой модели важна оценка параметров жизнеспособности сегментов колеоптилей, которые обычно инкубируют в среде, содержащей сахарозу [6, 8]. Нами было показано, что через 7–8 сут с момента проращивания семян пшеницы сорта Элегия при температуре 20 °С в колеоптилях интактных проростков наблюдалась фрагментация ДНК, при этом в отрезках, отделенных от проростков на 4-е сутки и инкубированных еще 3–4 сут на 2 %-м растворе сахарозы, ДНК оставалась целостной [4]. Можно полагать, что в таких условиях в сегментах колеоптилей процессы гибели клеток замедляются.

Целью настоящей работы было сопоставление гибели клеток, генерации супероксидных анион-радикалов и пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в колеоптилях пшеницы, отделенных от проростков в разное время от начала проращивания семян.

Методика

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия проращивали в темноте при температуре 20 ± 1 °С. На 4-, 7-, 10- и 14-е сутки с момента замачивания семян от проростков отделяли базальные части колеоптилей длиной 7 мм и инкубировали отрезки в чашках Петри в 2 %-м растворе сахарозы [6] при температуре 20 ± 1 °С в течение различного времени.

Для оценки относительного показателя гибели клеток колеоптили окрашивали красителем эвансом голубым [13, 16], который окрашивает только клетки с поврежденными мембранами. Отрезки колеоптилей помещали на 2 ч в 0,5 %-й водный раствор эванса голубого, после чего не менее 10 мин отмывали их проточной дистиллированной водой и определяли площадь окрашивания отрезков. В каждом варианте оценивали по 25–30 отрезков в трехкратной повторности.

Генерацию супероксидных анион-радикалов интактными отрезками колеоптилей и их поступление во внешний раствор определяли по восстановлению нитротетразолия синего [11]. По 15 колеоптилей помещали в пробирки с 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6), содержащего 0,05 % нитротетразолия синего, 10 мкМ ЭДТА, 0,1 % тритона X-100. Пробы инкубировали на шейкере (120 об/мин) в течение 1 ч, после чего находили оптическую плотность инкубационного раствора при длине волны 530 нм. Для проверки специфичности генерации $O_2^{\cdot-}$ в специальных опытах в пробы добавляли супероксиддисмутазу (СОД, 50 ед/мл). СОД ингибировала генерацию супероксидных анион-радикалов не менее чем на 90 %. В связи с этим считали, что количество восстановленного нитротетразолия синего определяется содержанием $O_2^{\cdot-}$ [11].

Количество продуктов ПОЛ, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (в основном малоновый диальдегид — МДА), оценивали по методике, предложенной Мерзляком и соавт. [9], используя для анализа гомогенат, приготовленный на 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 7,6).

Эксперименты воспроизводили независимо не менее трех раз в 3–4-кратной биологической повторности. На рисунке приведены средние результаты и их стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах установлено, что в первые 1—5 ч после отделения колеоптилей от проростков генерация ими супероксидных анион-радикалов превышала значения, наблюдаемые через 1 сут после инкубации отрезков на растворе сахарозы, на 15—20 %. Такой эффект может быть связан с раневым стрессом, что зарегистрировано и на других растительных объектах [10]. В связи с этим во избежание нестабильности исследуемых показателей из-за раневого стресса первые определения проводили через 1 сут после отделения сегментов колеоптилей от интактных проростков.

После отделения колеоптилей от 4-суточных проростков пшеницы в течение всего периода наблюдений (5—15 сут) генерация $O_2^{\bullet-}$ достоверно не изменялась, лишь на 11—15-е сутки проявлялась тенденция к незначительному увеличению этого показателя (рисунок, *a*; кривая 1).

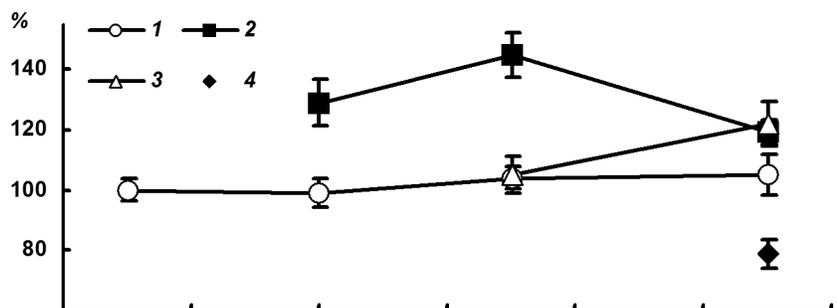
В сегментах колеоптилей, отделенных от 7-суточных проростков, на 8-е сутки эксперимента генерация супероксидных анион-радикалов была заметно (почти на 30 %) выше соответствующего показателя колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков. В процессе последующей инкубации отрезков колеоптилей этого варианта на растворе сахарозы в них отмечалось дополнительное повышение генерации $O_2^{\bullet-}$ (на 11-е сутки эксперимента), которое сменялось ее снижением на 15-е сутки наблюдений (см. рисунок, *a*; кривая 2).

В отрезках колеоптилей, отделенных от проростков на 10-е сутки после начала проращивания семян, показатель генерации супероксидных анион-радикалов мало отличался от величин, характерных для колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков и затем инкубированных на растворе сахарозы (см. рисунок, *a*; кривые 1, 3).

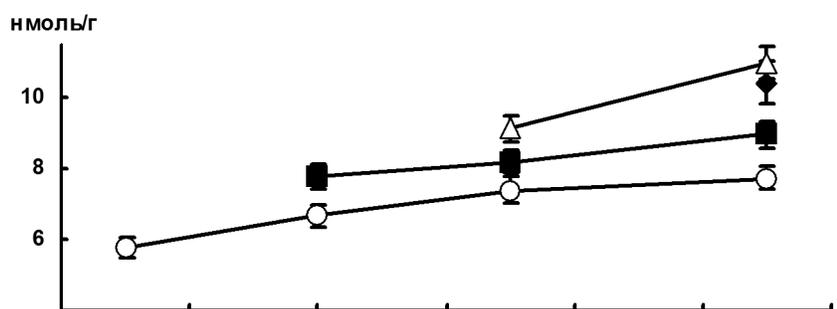
В колеоптилях, которые находились в составе интактных проростков в течение 14 сут, на 15-е сутки эксперимента наблюдалось достоверное снижение интенсивности генерации $O_2^{\bullet-}$ по сравнению с показателями, характерными для колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков (см. рисунок, *a*; точка 4).

Повышение генерации $O_2^{\bullet-}$, наблюдавшееся в колеоптилях, отделенных от 7-суточных проростков, может быть связано с начальными этапами старения колеоптилей [11]. Относительно небольшая интенсивность генерации супероксидных анион-радикалов колеоптилями, отделенными от 10-суточных проростков, и снижение этого показателя в колеоптилях, отделенных от 14-суточных проростков, могут быть обусловлены деструкцией мембран в стареющих колеоптилях. Известно, что ферменты, генерирующие супероксидные анион-радикалы, в том числе один из основных — НАДФН-оксидаза, являются мембраносвязанными и чувствительными к изменению состояния биомембран [18].

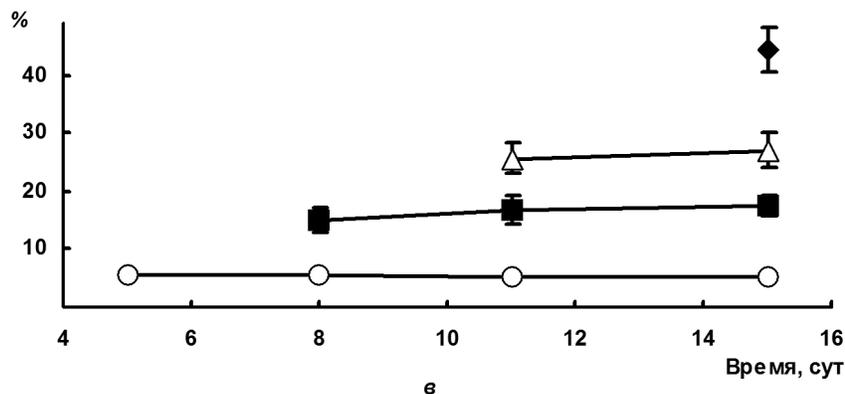
Содержание одного из конечных продуктов ПОЛ — МДА в колеоптилях, отделенных от 4-суточных проростков, в ходе их инкубации на растворе сахарозы постепенно увеличивалось, достоверное повышение наблюдалось на 11-е сутки эксперимента (см. рисунок, *b*; кривая 1). Для колеоптилей, отделенных от 7- и особенно 10-суточных проростков, было характерно значительно более высокое содержание МДА (см. рисунок, *b*; кривые 2, 3). В колеоптилях 14-суточных проростков содержание МДА достоверно не отличалось от соответствующих показателей 10-суточных проростков.



а



б



в

Динамика генерации супероксидных анион-радикалов (а, % величины генерации на 5-е сутки у колеоптилей, отделенных от 4-суточных проростков), содержания малонового диальдегида (б, нмоль/г сырого вещества) и гибели клеток (в, % окрасивания эвансом голубым) в колеоптилях пшеницы:

1—4 — отрезки колеоптилей, отделенные от интактных проростков соответственно на 4-, 7-, 10-, 14-е сутки

Показатель гибели клеток, который определяли по окрашиванию эвансом голубым, у сегментов колеоптилей, отделенных от проростков на 4-е сутки после начала проращивания семян, составлял не более 5—6 % и практически не изменялся в течение всего последующего времени инкубации (до 15 сут) (см. рисунок, в; кривая 1). Следует отметить, что значение показателя гибели клеток 5 % связано в основном с методическими причинами — окрашиванием механически поврежденных торцов колеоптилей. Окрашивание колеоптилей, отделенных от проростков на 7-е сутки проращивания, превышало 15 % и немного увеличи-

валось в течение последующей инкубации колеоптилей на растворе сахарозы (см. рисунок, *в*; кривая 2). Еще большим показателем гибели клеток был у колеоптилей, отделенных от проростков на 10-е и особенно — на 14-е сутки.

Таким образом, можно констатировать значительное замедление гибели клеток в колеоптилях при их отделении от проростков пшеницы и последующей инкубации на 2 %-м растворе сахарозы. При отделении отрезков колеоптилей от 4-суточных проростков гибель клеток в них практически не наблюдалась, при отделении их в более позднем возрасте увеличение показателя гибели клеток в процессе инкубации также замедлялось, хотя уровни гибели клеток были намного выше.

Проанализировав полученные результаты, можно констатировать наличие связи между показателями генерации АФК, содержанием продукта ПОЛ и гибелью клеток. Так, нами зарегистрировано повышение генерации $O_2^{\cdot-}$ колеоптилями, отделенными от проростков через 7 сут от начала их проращивания (см. рисунок, *а*). С повышением интенсивности генерации АФК в этот период может быть связано последующее увеличение содержания продукта ПОЛ МДА, возрастающее по мере старения интактных колеоптилей (см. рисунок, *б*). Содержание МДА повышалось и в колеоптилях, отделенных от интактных проростков на 4-е сутки, однако оно было значительно меньшим по сравнению с показателями, характерными для колеоптилей, отделенных от проростков в более позднее время (на 7-, 10- и 14-е сутки). В целом динамика содержания МДА в колеоптилях и их окрашивание эвансом голубым имели сходный характер. Это подтверждает положение об участии АФК и процессов ПОЛ в индуцировании гибели клеток, которая в зависимости от интенсивности генерации АФК и прочих условий может происходить по сценарию как апоптоза, так и некроза [15, 17, 20].

Выявленное нами отсутствие заметных флуктуаций генерации супероксидных анион-радикалов, существенное замедление повышения содержания МДА и стабильно низкие показатели окрашивания эвансом голубым у колеоптилей, отделенных от проростков на 4-е сутки проращивания семян, дает основание утверждать, что изолирование колеоптилей существенно замедляет процессы, сопровождающие их старение и гибель клеток. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными об отсутствии фрагментации ДНК, считающейся признаком апоптоза, у колеоптилей пшеницы, отделенных от 4-суточных проростков, по крайней мере в течение последующих 4 сут [4]. Кроме того, другие исследователи установили, что в клетках колеоптилей пшеницы, отделенных от проростков до наступления пятого цикла синтеза ДНК (приблизительно 135—145 ч развития проростка при проращивании семян при температуре 26 °С), не формировалась так называемая тяжелая митохондриальная ДНК, сопровождающая процесс апоптоза [5]. Можно полагать, что полноценный сигнал, индуцирующий апоптоз колеоптиля, формируется на уровне целого проростка. В то же время нельзя исключить, что замедление гибели клеток в сегментах колеоптилей, отделенных от проростков, в какой-то мере может быть связано с антиоксидантным [12] и мембранопротекторным [19] действием сахарозы.

Таким образом, отрезкам колеоптилей пшеницы, отделенным от 4-суточных проростков, в ходе последующей длительной инкубации на растворе сахарозы свойственны: относительная стабильность генерации АФК и содержания продукта ПОЛ, отсутствие усиления окрашиваемос-

ти эвансом голубым (см. рисунок) и фрагментации ДНК [4], что свидетельствует о существенном замедлении гибели клеток, характерной для стареющих интактных колеоптилей злаков. В связи с этим изолированные колеоптилы пшеницы, инкубируемые на среде, содержащей сахарозу, можно считать вполне адекватной моделью для изучения клеточных механизмов устойчивости и оценки физиологических эффектов различных экзогенных соединений, в том числе модификаторов окислительного метаболизма [4, 6, 7].

1. Бакаева Л.Е., Замятина В.А., Шорнинг Б.Ю. и др. Действие антиоксиданта ионола (ВНТ) на рост и развитие этилированных проростков пшеницы: Контроль за апоптозом, делением клеток, ультраструктурой органелл и дифференцировкой пластид // Биохимия. — 2001. — **66**, вып. 8. — С. 1048—1059.
2. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // Успехи биол. химии. — 2001. — **41**. — С. 3—38.
3. Воробьев А.А., Смирнова Е.Г., Бакаева Л.Е., Яеужинский Л.С. О влиянии «внешнего» супероксид-аниона на процесс апоптоза в колеоптилях проростков пшеницы // Биохимия. — 2005. — **70**, вып. 10. — С. 1328—1337.
4. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. и др. Индуцирование теплоустойчивости колеоптилей пшеницы действием донора оксида азота: связь NO с другими сигнальными мессенджерами // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2010. — Вип. 1 (19). — С. 44—55.
5. Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Шорнинг Б.Ю. и др. Межнуклеосомная фрагментация и синтез ДНК в проростках пшеницы // Физиология растений. — 1999. — **46**, № 1. — С. 48—57.
6. Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В. Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Там же. — 2005. — **52**, № 2. — С. 227—232.
7. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активність супероксиддисмутазі і каталази у колеоптилях пшениці за дії перексиду водню і нагрівання // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — **39**, № 4. — С. 319—325.
8. Мелехов Е.И., Рамазанова Л.Х., Васильева А.В. и др. Методы количественной оценки повреждений и их модификации // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. — 1983. — № 3. — С. 785—788.
9. Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Юферова С.Г., Шевырева В.А. Использование 2-тиобарбитуровой кислоты при исследовании перекисления липидов в тканях растений // Биол. науки. — 1978. — № 9. — С. 86—94.
10. Минабаева Ф.В., Рахматуллина Д.Ф., Гордон Л.Х., Вылегжанина Н.Н. Роль супероксида в формировании неспецифического адаптационного синдрома корневых клеток // Докл. РАН. — 1997. — **355**, № 4. — С. 554—556.
11. Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Яеужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. Необходимость образования супероксида для развития этилированных проростков пшеницы // Биохимия. — 2000. — **65**, вып. 12. — С. 1612—1618.
12. Couee I., Sulmon C., Gouesbet G., Amrani A.E. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. — 2006. — **57**. — P. 449—459.
13. Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**. — P. 13454—13459.
14. Gao C., Zhang L., Wen F., Xing D. Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure // Plant Signal. Behav. — 2008. — **3**. — P. 197—198.
15. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis // Science. — 1998. — **281**. — P. 1309—1323.
16. Kawai M., Uchimiya H. Coleoptile senescence in rice (*Oryza sativa* L.) // Ann. Bot. — 2000. — **86**. — P. 405—414.
17. Pastori G.M., Foyer C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of «redox» and abscisic acid-mediated controls // Plant Physiol. — 2002. — **129**. — P. 460—468.
18. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Ibid. — 2006. — **141**. — P. 336—340.
19. Strauss G., Hauser H. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — **83**. — P. 2422—2426.

20. *Suzuki N., Mittler R.* Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* — 2006. — **126**. — P. 45–51.

Получено 20.08.2010

УПОВІЛЬНЕННЯ ПРОЦЕСУ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН У СЕГМЕНТАХ КОЛЕОПТИЛІВ ПШЕНИЦІ, ІНКУБОВАНИХ НА РОЗЧИНІ САХАРОЗИ

Ю.В. Карпець, Ю.Є. Колупаєв, М.В. Швиденко

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Оцінювали показник загибелі клітин (за забарвленням евансом голубим), генерування супероксидних аніон-радикалів і вміст продукту пероксидного окиснення ліпідів малонового діальдегіду в колеоптилях пшениці, які відокремлювали від інтактних проростків різного віку. У колеоптилів, відокремлених від 4-добових проростків, протягом подальшої їх 11-добової інкубації на 2 %-му розчині сахарози інтенсивність генерування супероксидних аніон-радикалів і ступінь забарвлення тканин евансом голубим істотно не змінювались, вміст малонового діальдегіду збільшувався незначною мірою. В колеоптилів, відокремлених від інтактних проростків на 7-му, 10- і 14-ту добу, відзначали флуктуації інтенсивності генерування супероксидних аніон-радикалів, більший вміст малонового діальдегіду і підвищення ступеня забарвлення евансом голубим. Зроблено висновок, що в разі відокремлення колеоптилів від інтактних проростків та інкубації на розчині сахарози в них уповільнюється інтенсивність процесів загибелі клітин.

RETARDATION OF CELL DEATH PROCESS IN SEGMENTS OF WHEAT COLEOPTILES INCUBATED ON SUCROSE SOLUTION

Yu.V. Karpets, Yu.Ye. Kolupaev, M.V. Shvidenko

V.V. Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University
62483 Kharkiv, p/o «Communist-1»

The cell death index (Evans blue stain), quantities of generation of superoxide anion-radicals ($O_2^{\bullet -}$) and content of lipid peroxidation product malonic dialdehyde (MDA) have been estimated in the wheat coleoptiles detached from different age intact plantlets. In the coleoptiles detached from four-day plantlets during their subsequent 11-day incubation on the 2 % solution of sucrose the intensity of $O_2^{\bullet -}$ generation and degree of Evans blue stain of tissues did not change essentially, the MDA content increased negligibly. At the same time, in the coleoptiles detached from intact plantlets on the 7, 10 or 14 days the fluctuations of intensity of $O_2^{\bullet -}$ generation, increase of content of MDA and degree of Evans blue stain were observed. The conclusion was made that after the detachment of coleoptiles from intact plantlets and incubation in the 2 % sucrose solution the intensity of the processes of cell death is slowed down in them.

Key words: *Triticum aestivum* L., coleoptiles, cell death, superoxide anion-radical, lipid peroxidation.