

Резюме

Досліджено процеси індукції калусогенезу ярої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Рання 93. Показано, що ефективність процесу та тип калусної тканини обумовлені обраним експлантатом. Встановлено, що морфогенний потенціал проявляють калуси зі зрілих зародків та листових експлантатів. Показано, що в ліпідах калусних тканин основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадеканова, *cis*-октадеценева.

Исследованы процессы индукции калусогенеза ярой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Ранняя 93. Показано, что эффективность процесса и тип калусной ткани обусловлены выбранным эксплантатом. Установлено, что морфогенетическим потенциалом обладают каллусы из зрелых зародышей и листовых эксплантатов. Показано, что в липидах каллусных тканей главными жирными кислотами были гексадекановая, 9,12-октадекадиеновая, *cis*-октадеценевая.

The processes of callusogenesis induction of spring wheat *Triticum aestivum* L., cultivar Rannja 93 were investigated. It was shown that callusogenesis and the type of callus tissue were caused by the type of explants. It was established that the callus from mature germs and leaf explants had morphogenetic potential. It is shown, that in callus tissue lipids the main fat acids were hexadecanoic, 9,12-octadecadienoic, *cis*-octadecenoic.

КОЧУБЕЙ Т.О., ШВЕНЬ О.О, АНДРІЄНКО В.І., КАРПОВА І.С, ЛУКАШ Л.Л.
*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150, E-mail: lukash@imbg.org.ua*

ІНДУКЦІЯ АПОПТИЧНИХ ЗМІН У КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ССАВЦІВ СУМАРНИМ ПРЕПАРАТОМ ФГА ТА ЙОГО ІЗОФОРМАМИ

Відомо, що вуглевод-білкові взаємодії лежать у основі багатьох біологічних процесів і саме тому лектини широко використовуються для вирішення цілого ряду фармакологічних, біотехнологічних, гістологічних та інших питань біології. Широке застосування лектинів на практиці спонукає і розвиток наукових досліджень у цій галузі. Актуальними стають роботи з вивчення впливу цієї групи білків на мутаційний процес та репарацію, проліферацію та апоптоз [1–2].

Показано, що деякі лектини здатні виступати не лише у якості мітогенів, а й мають цитотоксичну активність. Раніше нами було показано здатність лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати апоптичні зміни [3]. І хоча для деяких лектинів описані лектинасоційовані ензиматичні активності [4], завдяки яким вони здатні безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині, більшість з них все ж таки реалізує свою активність опосередковано, через взаємодію з вуглеводними детермінантами на поверхні клітинної мембрани. Тож вуглеводна специфічність лектину, його молекулярна будова

є вирішальними для реалізації мітогенної чи цитотоксичної активності цієї групи білків.

Метою даної роботи було провести порівняльні дослідження впливу лектину квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), сумарного препарату та його окремих ізоформ, на частоту апоптичних клітин у культурі клітин ссавців. Виявити залежність їхньої цитотоксичної активності від молекулярної будови сумарного препарату лектину ФГА та його окремих ізоформ.

Матеріали та методи

У своїх дослідженнях як модельні тест-системи використовували культуру клітин раку гортані людини Нер-2 та спонтаннотрансформовану культуру клітин китайського хом'ячка *Bllid-ii-FAF28Cl237-8GlutsIII*. Клітини культивували в стандартному ростовому середовищі Ігла (MEM, Sigma, USA) з 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, USA) та антибіотиками.

Кількісне визначення життєздатності клітин та апоптозного індексу проводилось за допомогою фарбників акридинового помаранчового та етидидуму броміду, котрі готували згідно методики [5]. Клітини обробляли досліджуваним лектином у концентрації 100 мкг/мл протягом 4 годин. При дослідженні апоптозу як позитивний контроль використовували MNNG у концентрації 5 мкг/мл, обробка тривала 1 годину. Препарати аналізували, одразу після обробки білком, під мікроскопом зі збільшенням 90х, з комбінацією фільтрів, що підходять для збудження флуоресценції. Аналізували три типи клітин: живі клітини — з нормальним ядром, що мали яскраво-зелений хроматин з організованою структурою, клітини на ранній стадії апоптозу — яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований, клітини на пізній стадії апоптозу — яскраво-помаранчевий хроматин (рис. 1). За кількісними даними вираховували апоптозний індекс [5].

Досліджувані агенти — комерційні препарати лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* — фітогемаглютинін ФГА (“ЛЕКТИНОТЕСТ”, Львів). Ізолектини ФГА-Е еритроцитарна форма та ФГА-Л лейкоцитарна форма за своєю структурою є тетрамерами, що складаються з певних субодиниць. Сумарний препарат ФГА-Р містить суміш різних ізолектинів [6].

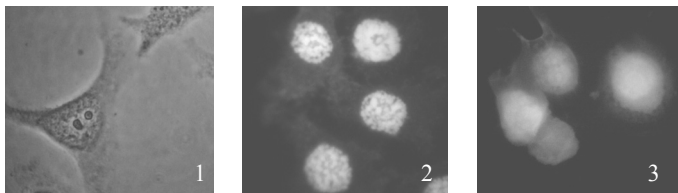


Рис. 1. Індукція апоптозних змін у культурі клітин раку гортані Нер2:

1 — живі клітини (яскраво-зелений хроматин з організованою структурою); 2 — клітини на ранній стадії апоптозу (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); 3 — клітини на пізній стадії апоптозу (яскраво-помаранчевий хроматин). Клітини обробляли лейкоцитарною ізоформою ФГА у концентрації 100 мкг/мл

Результати та обговорення

При дослідженні впливу лектинів на частоту апоптичних змін у культурі клітин китайського хом'ячка нами було показано, що і сумарний препарат ФГА і його окремі ізоформи індукували підвищення частоти апоптичних змін у культурі клітин на рівні з МННГ (рис. 2.). Однак, нами були показані і певні відмінності дії сумарного препарату ФГА та ізоформ, а саме, після обробки ФГА-Р відсоток клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу був приблизно однаковим (49,34% та 47,53% відповідно), тоді як після обробки ізоформами ФГА-Л та ФГА-Е спостерігали переважно клітини на стадії пізнього апоптозу. Причому більш активно у цьому відношенні виявилась ізоформа еритроцитарна — частота клітин на стадії пізнього апоптозу становила 91,61%, тоді як після обробки ізоформою лейкоцитарною — 84,3%. Варто зауважити, що частота клітин на пізній стадії апоптозу після обробки ізоформами ФГА була статистично достовірно вищою, ніж після обробки МННГ. Мабуть, такі відмінності залежать від різних механізмів дії білків та хімічного агенту: відомо, що МННГ — алкілувальний агент і механізм його дії — це індукція аддуктів ДНК, тоді як лектини впливають опосередковано, активуючі ті чи інші сигнально-регуляторні шляхи у клітині.

При дослідженні впливу сумарного препарату ФГА та ізоформ ФГА-Е і ФГА-Л на частоту апоптозних клітин у культурі раку гортані Нер2 нами було показано, що порівняно з попередньою тест-системою, лектини діяли дещо інакше (рис. 3). Так при дії сумарного препарату ФГА у концентрації 100 мкг/мл відсоток живих клітин був майже у втричі вищим, ніж у культурі клітин китайського хом'ячка (14,28% та 3,12% відповідно). Варто зауважити,

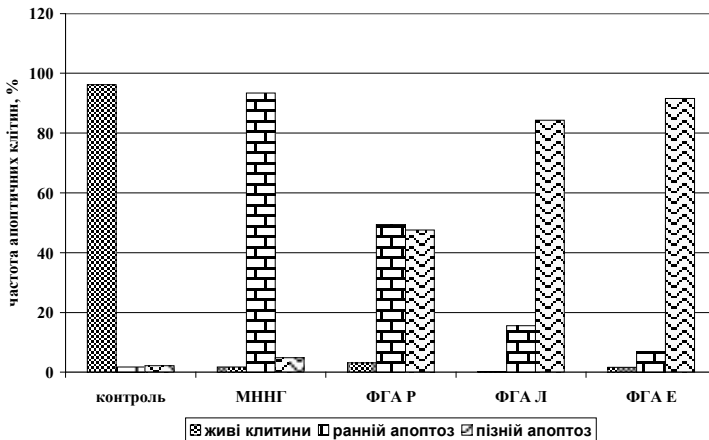


Рис. 2. Частота апоптозних клітин у культурі китайського хом'ячка після обробки сумарним препаратом ФГА та його ізоформами у концентрації 100 мкг/мл: ФГА-Р — сумарний препарат; ФГА-Л — лейкоцитарна ізоформа; ФГА-Е — еритроцитарна ізоформа

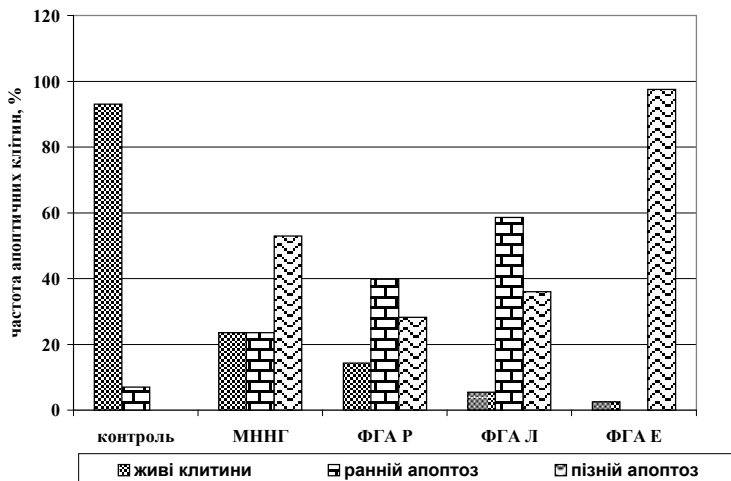


Рис. 3. Частота апоптозних клітин у культурі Нер2 після обробки сумарним препаратом ФГА та його ізоформами у концентрації 100 мкг/мл: ФГА-Р — сумарний препарат; ФГА-Л — лейкоцитарна ізоформа; ФГА Е — еритроцитарна ізоформа

що культура клітин раку гортані людини виявилась менш чутливою ніж клітини китайського хомячка і до дії МННГ (23,55% і 1,75% відповідно).

Порівнюючи між собою дію сумарного препарату ФГА-Р та його ізолектинів, можна сказати, що усі вони статистично достовірно індукували підвищення частоти апоптозних клітин на рівні з МННГ. Однак, більш активним у цьому відношенні виявився ізолектин еритроцитарний — спостерігали 97,5% апоптозних клітин. Найменший відсоток апоптозних клітин був після обробки сумарним препаратом ФГА-Р — 68,5%.

Також, нами були показані відмінності у співвідношення клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу після дії сумарного препарату та його ізолектинів. Після обробки сумарним препаратом лектину на ранній стадії апоптозу спостерігали майже 40% клітин, тоді як у пізньому апоптозі перебувало 28,2% клітин, порівняно з попередньою тест-системою, де співвідношення клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу було приблизно однаковим (рис. 2).

Після обробки клітин лейкоцитарною ізоформою ФГА, також переважали клітини на ранній стадії апоптозу — 58,55%, на відміну від двох попередніх препаратів, після дії ізолектину еритроцитарного усі клітини перебували на пізній стадії апоптозу (97,5%).

Складається таке враження, що здатність досліджених нами препаратів ФГА впливати на частоту апоптозу у культурі клітин залежить не лише від їхньої молекулярної будови, а й від типу клітин, а саме їхнього “глікокоду”.

Висновки

Отже нами було показано, що і сумарний препарат ФГА і його окремі ізоформи у дослідженій нами концентрації статистично достовірно підвищують частоту апоптозних клітин на рівні з МННГ. Показані певні відмінності дії препаратів, а саме окремі субодиниці діють не однаково з сумарним препаратом. Висунуто припущення, що різниця активності сумарного препарату ФГА та його ізолектинів у різних тест-системах залежить як від типу клітин, так і від структури молекули лектину.

Література

1. Лукаш, Л.Л., Карпова И.С., Мирошниченко О.С., Тихонова Т.Н., Лыло В.В., Манько В.Г., Сухорада Е.М., Гольнская Е.Л. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика.— 1997.— 31, №5.— С. 52–60.
2. Карпова И.С., Корецька Н.В. Дослідження модифікуючого впливу лектинів на токсичність і мутагенність іонів Ni(II) в культурі *Bacillus subtilis* // Біополімери і клітина.— 2003.— 19, №3.— С. 224–230.
3. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л. Индукция апоптозу у популяціях клітин ссавців *in vitro* під впливом лектинів // Цитология и генетика.— 2007.— Т.41, №5.— С. 48–53.
4. Willy J. Peumans, Qiang Hao, and Els J. Van Damme. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // The FASEB Journal.— 2001.— 15.— P. 1493–1506
5. McGanon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P., Mahboudi A., Mogil R.J., Nishio-ka W.K., Green D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro* // Methods in cell biology, vol.46, "Cell Death". Ed. Schwartz L.M., Osborne B.A. Acad. Pres Inc, 1995, p. 172–173.
6. Miller I.B., Hsu R., Heinrikson R., Yachnin S. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic protein derived from *Phaseolus vulgaris* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1975.— V.72.— P. 1388–1391.

Резюме

Показано принципово різний вплив на індукцію апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка та раку гортані людини сумарним препаратом ФГА та його ізоформами. У дослідженій нами концентрації усі білки достовірно підвищували частоту апоптозних клітин на рівні з МННГ. Також виявлено певні відмінності активності ізолектинів та ФГА.

Показано принципиально различное влияние на индукцию апоптоза в культуре клеток китайского хомячка и рака гортани человека суммарным препаратом ФГА и его изоформами. В исследованной нами концентрации все белки достоверно повышали частоту апоптоза в клетках на уровне с МННГ. Также выявлены определенные различия активности изолектинов и ФГА Р.

It was shown different effects on the apoptosis induction in the culture of Chinese hamster and human cancer cells by total preparation PHA and its isoforms. In studied concentration all proteins increased the frequency of apoptosis cells comparable with MNNH. Also revealed some differences of isolectins and PHA P activity.

КРИНИЦЫНА А.А., УСПЕНСКАЯ М.С., МУРАШЕВ В.В.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия,
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 12, e-mail: vvtur@hotmail.ru*

**ТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO*
НЕКОТОРЫХ СОРТОВ *PAEONIA SUFFRUTICOSA* ANDREWS.
СЕЛЕКЦИИ БОТСАДА МГУ**

В Россию древовидные пионы попали только в 1863 году, в течение 80 лет их выращивали в горшечной культуре в холодных оранжереях ботанического сада БИН РАН (Санкт-Петербург) и только с 1939 года были предприняты попытки их возделывания в открытом грунте. В ботаническом саду Московского университета на проспекте Мира с 1951 года А.А. Сосновец стала заниматься интродукцией и селекцией древовидных пионов, а с 1981 года эта работа была продолжена М.С. Успенской на основной территории сада на Воробьевых горах.

В мире сегодня зарегистрировано около 500 сортов древовидных пионов, из них 30 выведено в Ботаническом саду МГУ. Основным направлением селекционных работ у нас является привлечение при создании новых сортов диких видов, более устойчивых к холоду, засухе и болезням, вызываемыми фитопатогенными грибами (Успенская, 2007).

Массовому внедрению древовидных пионов в озеленение препятствуют медленное прорастание семян (как правило, семена прорастают на второй или третий год) и очень медленный рост сеянцев в первые годы жизни. Древовидные пионы, в отличие от травянистых, значительно сложнее размножаются вегетативным путем. Известны такие способы, как: 1) деление куста (при умелом делении можно получить максимум 3–4 деленки); 2) прививка на корни травянистых пионов. При размножении прививкой требуется большое количество корней травянистых пионов. В связи с этим необходимо иметь коллекцию травянистых пионов. С одного куста можно в первый год получить 9–10 прививок, которые дают хорошую корневую систему только на третий или четвертый год, после чего могут поступать для реализации; 3) метод микроклонального размножения в стерильных условиях, что значительно облегчает процедуру размножения и позволяет на выходе получать достаточное количество генетически однородного материала. В настоящее время разработаны схемы микроклонального размножения древовидного пиона многих сортов европейского и китайского происхождения (Veruto, Cuirig, 2007). Однако оказалось, что для каждого нового сорта этой культуры необходимо уточнять и подбирать свои оптимальные условия размножения в культуре *in vitro*.

В настоящее время не существует единой классификации методов микроклонального размножения растений. Многие исследователи в зависимости от морфогенетических процессов выделяли от трех до шести методов (Катаева, Бутенко, 1983; Носов, 1991). Выбор метода размножения зависит от доступности того или другого вида растительного материала: семян, почек