

**Маскаева Т. А., Лабутина М. В., Чегодаева Н. Д.**

**ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ГИБЕЛЬ КЛЕТОК  
МЕРИСТЕМЫ *ALLIUM FISTULOSUM* L.**

*ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический  
институт имени М. Е. Евсевьева», г. Саранск*

**Maskaeva T. A., Labutina M. V., Chegodaeva N. D.**

**INFLUENCE OF THE FISSILE FORMS OF OXYGEN ON DEATH OF  
CAGES OF THE MERISTEM OF *ALLIUM FISTULOSUM* L.**

*FGBOU VPO "The Mordovian state pedagogical  
institute of a name of M.E.Evsevyev", Saransk*

*В данной работе приведены данные исследования способности активных форм кислорода индуцировать апоптоз или некроз клеток апикальной меристемы *Allium fistulosum* L.*

*Ключевые слова: активные формы кислорода; апоптоз; некроз.*

*These researches of ability of the fissile forms of oxygen to induce an apoptosis or a necrosis of cages of an apical meristem of *Allium fistulosum* L. are given in this work.*

*Keywords: the fissile forms of oxygen; apoptosis; necrosis*

На сегодняшний день загрязнение окружающей среды химическими и физическими факторами, в результате действия которых в живых организмах образуются свободные радикалы, приобрело глобальный характер и поставило человечество на грань экологической катастрофы. Хотя продолжительность жизни этих свободных радикалов исчисляется долями секунды, они успевают интенсивно действовать на генетический аппарат организма и вызывают нежелательные мутации, вследствие чего возникают различные болезни.

Основным рассматриваемым в данной работе фактором, воздействующим на живую систему на клеточном уровне, является активная форма кислорода (АФК) – супероксидный радикал  $O_2^-$ , являющийся непосредственным

предшественником перекиси водорода в реакции восстановления кислорода до воды в процессе дыхания аэробных живых систем.

Цель данной работы состояла в исследовании способности АФК индуцировать апоптоз или некроз растительных клеток.

В качестве тест-объекта взят лук батун (*Allium fistulosum* L). В качестве источника  $O_2^{-*}$  использовали электроэффлювиальный ионизатор воздуха (аэроионизатор «Сетеон», произведенный НПЦ «Альфа-Ритм»). Семена помещали на расстоянии 25 см от кончиков игл и воздействовали в течение 40, 60, 80 мин. Содержание отрицательных аэроионов кислорода, определенное в месте обработки, при 40 мин стимуляции составляло  $1,3 \times 10^6$ , при 60 мин –  $2 \times 10^6$ , при 80 мин –  $2,7 \times 10^6$  в  $1 \text{ см}^3$ . В качестве прооксидантов использовали пероксид водорода («Sigma», США) и сульфат железа («Sigma», США). Контрольные и аэроионизированные семена проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри в растворах, содержащих модифицирующие вещества, в термостате при  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. Клетки, погибающие апоптозом или некрозом, выявляли методами световой микроскопии (микроскоп «Биолам Р-11»), используя гематоксилин («Sigma», США).

В контроле признаки апоптоза в растительных клетках не были обнаружены. Ядра в них ровные, хроматин равномерно распределен внутри ядра по всему объему, что при обработке красителем дает картину гомогенного ровного окрашивания. При действии  $O_2^{-*}$  в течение 40 мин признаки апоптоза также не обнаруживались. При увеличении времени воздействия до 60 мин и более наблюдалось уплотнение ядерного хроматина, прижатого к внутренней ядерной мембране, что является ранним диагностическим признаком апоптоза.

При действии  $H_2O_2$  (2 мМ) доля апоптотирующих клеток возрастала до 13 %, некротически измененные клетки не наблюдались. В этих условиях при действии  $O_2^{-*}$  в течение 40 мин число апоптотирующих клеток уменьшилось на 33 % по сравнению с контролем, некротически измененные клетки не регистрировались. При увеличении времени воздействия до 60 мин доля апоптотирующих клеток возрастала на 117 % по сравнению с контролем,

появились некротически измененные клетки (около 13 %). Увеличение времени воздействия  $O_2^{-*}$  до 80 мин в присутствии  $H_2O_2$  (2 мМ) приводило к возрастанию доли апоптотирующих клеток до 35 %, доля некротически измененных клеток в этих условиях увеличилась до 17 %.

Наиболее яркая картина апоптоза наблюдалась при совместном действии на растительные клетки  $H_2O_2$  (2 мМ) и  $FeSO_4$  (2 мМ). При этом обнаруживались ядра, распадающиеся на 3–5 обломков разных размеров, но в некоторых клетках исчезали ядра, что косвенно свидетельствовало о наличии и некроза как формы гибели клеток.

Очевидно, что высокий уровень гибели клеток связан с образованием в реакции Фентона гидроксильного радикала. Вследствие этого, а также в результате протекания сопутствующих процессов, в качестве которых выступают дополнительный приток ионов  $Ca^{2+}$ , катализируемый  $H_2O_2$ , и активация  $Ca$ -зависимых эндонуклеаз [2], увеличивается число апоптотирующих клеток. Совместное действие  $H_2O_2$  (2 мМ) и  $FeSO_4$  (2 мМ) резко усиливало фрагментацию и исчезновение ядер, доля апоптотирующих клеток возрастала до 32 %, а некротически измененных – до 19 % по сравнению с контролем. При действии  $O_2^{-*}$  в течение 40 мин в этих условиях доля апоптотирующих клеток уменьшалась на 22 %, а некротических клеток – на 10 % по сравнению с контролем. При увеличении времени воздействия до 60 мин и более число клеток, гибнущих путем апоптоза и некроза, повышалось. Наиболее ярко это выражено при стимуляции в течение 80 мин. В этих условиях доля апоптотирующих клеток возрастала на 54 %, а некротических – на 86 %.

С помощью салициловой кислоты было показано участие  $H_2O_2$  в гибели клеток апикальной меристемы *A. fistulosum*. Салициловая кислота является ингибитором каталазы, увеличивает активность супероксиддисмутазы и тем самым способствует повышению уровня  $H_2O_2$  в клетках. В эксперименте во всех вариантах опыта салициловая кислота (5 мМ) способствовала повышению

доли апоптотирующих и некротических клеток в проростках *A. fistulosum* по сравнению с контролем.

Наибольший рост этих показателей наблюдался при воздействии  $O_2^{-*}$  в течение 80 мин совместно с салициловой кислотой (5 мМ),  $H_2O_2$  (2 мМ) и  $FeSO_4$  (2 мМ). В этих условиях доля апоптотирующих клеток возрастала до 61 %, а некротических было около 32 %.

Известно, что салициловая кислота играет существенную роль в регуляции гиперчувствительного ответа клеток. Так, например, показано, что спонтанная гибель клеток у трансгенных растений арабидопсиса подавляется в результате экспрессии гена бактериальной салицилатгидроксилазы, которая превращает салициловую кислоту в катехол [1]. Салициловая кислота необходима для индукции патоген-зависимой гибели клеток у разных мутантов растений арабидопсиса [3].

Полученные нами данные подтверждают сведения о том, что существует зависимый от салициловой кислоты апоптоз [1]. При определенных условиях, связанных с избыточным накоплением в клетках растений пероксида водорода, салициловая кислота способствует возрастанию количества клеток, гибнущих путем некроза.

Роль АФК в инициации и развитии апоптоза в растительных клетках может заключаться в окислительной модификации молекулы ДНК, приводящей к структурным изменениям и активации генов клеточной смерти. Как видно из приведенных данных, механизм действия индукторов апоптоза в значительной мере определяется временем воздействия АФК. Очевидно, что в случае щадящей кислородной стимуляции адаптационно-компенсаторные возможности организма оказываются достаточными для выработки адекватных реакций, позволяющих поддерживать достаточный уровень жизнедеятельности и гомеостаз в целом. Элиминация клеток, имеющих нарушения в ДНК, вызванные действием определенных АФК, путем апоптоза позволяет организму выработать определенную стратегию поведения для повышения приспособленности к окружающей среде. Преобладание некротического пути

гибели клеток *A. fistulosum* при стимуляции активными формами кислорода является прямым отражением развивающегося патологического процесса.

Литература:

1. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // Успехи биологической химии. – 2001. – т. 41. – С. 3–38.
2. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программированная клеточная смерть // Биохимия. – 2000. – т. 65, вып. 8. – С. 1029–1046.
3. Jabc T. Initiation of Runaway Cell Death in an *Arabidopsis* Mutant by Extracellular Superoxide // Science. – 1996. – Vol. 273. – P. 1853–1856.

Literature:

1. Vanyushin B. F. Apoptosis at plants // Successes of biological chemistry. – 2001. – T. 41. – Page 3–38.
2. Samuilov V.D., Oleskin A.V. Lagunova E.M. The programmed cell-like death // Biochemistry. – 2000. – T. 65, № 8. – Page 1029–1046.
3. Jabc T. Initiation of Runaway Cell Death in an *Arabidopsis* Mutant by Extracellular Superoxide // Science. –1996. – Vol. 273. – P. 1853–1856.