

- ции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета: В 3 ч. – БГУ, 2015. Ч.1. С. 278–284.
14. Синчук О.В., Рогинский А.С., Данилёнок В.В., Гончаров Д.А., Трещева А.Б. Количественная оценка поврежденности инвазивными минирующими насекомыми листовых пластинок декоративных древесных растений : учеб. материалы. Минск: БГУ, 2016.
  15. Синчук О.В., Колбас А.П., Волосяк С.Н. Практические занятия по биометрии: метод. указания для студентов научн.-пед. специальностей: в 2 ч. Брест. гос. ун-т им. А.С. Пушкина. Брест: БрГУ, 2015. Ч. 1.
  16. Мاستицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. Черно-белое издание. Москва: ДМК пресс, 2015.

## **УСТАНОВЛЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИАМИНОВ НА РАЗВИТИЕ ПРОЦЕССОВ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

**А. А. Чичко, В. С. Мацкевич, В. В. Самохина**

Протекторная роль полиаминов в растениях в настоящее время не вызывает сомнения. Основная роль в формировании стресс-толерантности у растений принадлежит преимущественно высокомолекулярным представителям полиаминов – путресцину (Пут), спермидину (Спд) и спермину (Спм). Полиамины являются полифункциональными веществами и принимают участие во многих физиологических процессах. На сегодняшний день документально подтверждена роль полиаминов в таких жизненно важных для растительного организма процессах, как клеточное деление, корнеобразование, эмбриогенез, опыление, инициация цветения, образование завязей, созревание плодов, запрограммированная клеточная гибель (ЗКГ), метаболизм активных форм кислорода (АФК) [1]. С одной стороны, полиамины проявляют активность шаперонов, т.е. веществ, поддерживающих структурную нативность и функциональную активность биополимеров, главным образом, ДНК и РНК. В то же время известна их функция по снижению последствий окислительного стресса [2]. До конца не ясен механизм, лежащий в основе антиоксидантных эффектов полиаминов, но некоторые литературные данные указывают на ослабление признаков окислительного стресса при сверхэкспрессии ферментов биосинтеза полиаминов. В этой связи представлялось актуальным протестировать воздействие экзогенных полиаминов на развитие симптомов ЗКГ и генерацию АФК в клетках корня высших растений.

В экспериментах использовались корни 5–7-дневных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа WS-0 (Wassilewskija). Стерильная культура арабидопсиса выращивалась вертикально на чашках Петри (100 % среды Мурашиге и Скуга, 0,25 % фитогеля, 1 % сахарозы, рН 6,0)

с использованием стандартных протоколов. В работе использовались сертифицированные полиамины: Пут, Спд, Спм (Sigma; США), а также антиоксиданты: 0,3 % диметилсульфоксид (ДМСО), 1 ммоль/л тиомочевина и антиоксидантные ферменты: 600 ед/мл супероксиддисмутаза (СОД), 1000 ед/мл каталаза. Использовался инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse TS100F и приложения среды NIS Elements Imaging Software (Nikon, США). Морфологические тесты проводились в 10–15 выборках по 50 клеток для каждого варианта отдельно для атрихобластов и корневых волосков. Тест на генерацию АФК (супероксида) осуществлялся с помощью флуоресцентного зонда дигидроэтидиума ( $10^{-6}$  моль/л; Sigma, США) [2].

При экспонировании проростков арабидопсиса в буферном растворе доля клеток ризодермы с симптомами ЗКГ не превышала 10 %. Количество корневых волосков с симптомами ЗКГ начинала увеличиваться при введении 30 мкмоль/л Спм, 100 мкмоль/л Спд и Пут. Аналогичная тенденция была отмечена для атрихобластов. Для фармакологических тестов была выбрана обработка полиаминами в концентрации 0,3 ммоль/л, которая достоверно увеличивала долю клеток с симптомами ЗКГ в 5–8 раз.

Добавление в тест-растворы антиоксидантных агентов подавляло развитие ЗКГ, вызываемое 0,3 ммоль/л Пут, но не изменяло характера влияния Спм. Эффект Спд на ЗКГ был наиболее чувствителен к СОД и ДМСО. Доля клеток с симптомами Спд-индуцируемой ЗКГ снижалась в 2–3 раза.

Дигидроэтидиум – это флуоресцентный зонд, использующийся для детекции АФК, главным образом супероксида. Для исследования флуоресценции продуктов окисления используются следующие параметры фильтров:  $\lambda_{ex} = 490$  нм;  $\lambda_{em} = 600$  нм (красный);  $\lambda_{ex} = 370$  нм;  $\lambda_{em} = 420$  нм (зеленый) [3]. В случае, когда дигидроэтидиум при взаимодействии с АФК окисляется до 2-гидроксиэтидиума, он флуоресцирует в зеленой области спектра в цитоплазме клетки. Если же он окисляется АФК до этидиума, то внутриклеточно связывается с ДНК и флуоресцирует в красной области спектра, и в данном случае светиться могут различные формы АФК: не только супероксид, но еще и гидроксил, пероксинитрит, перекись [3]. Тест с АФК-чувствительным зондом дигидроэтидиумом показал, что в 0,3 ммоль/л концентрация Спм вызывала увеличение уровня генерации супероксида, Спд не влиял на данный показатель, а Пут приводил к значительному снижению данного уровня (рисунок 1). При этом в обеих областях спектра (красной и зеленой) наблюдалась сходная тенденция.

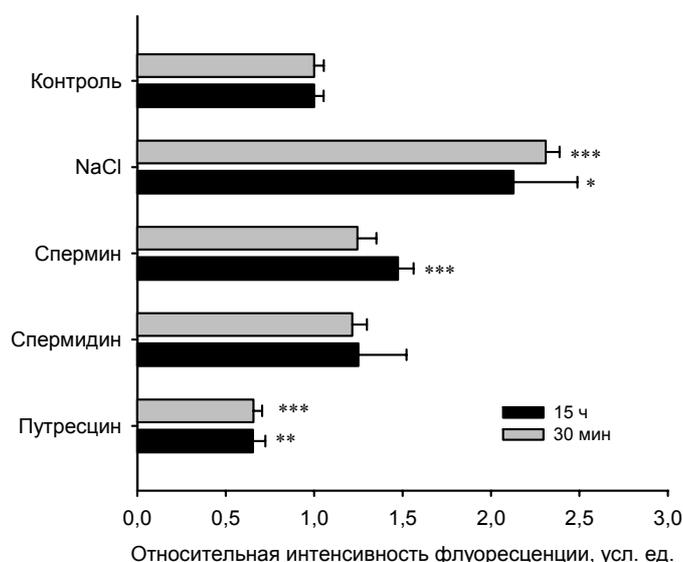


Рис. 1. Средние значения уровня генерации супероксида относительно контроля при обработке 0,3 ммоль/л раствором полиаминов (30 минут и 15 ч).  
 Негативный контроль – буфер,  
 позитивный контроль – 400 ммоль/л NaCl.  
 Достоверность различий (сравн. с контролем):  
 \* -  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,001$ , \*\*\* -  $p < 0,0001$  ( $n = 15-20$ )

В результате анализа полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) обработка полиаминами в концентрации выше 0,1 ммоль/л вызывает увеличение доли клеток с симптомами ЗКГ; 2) индуцируемая полиаминами ЗКГ подавляется антиоксидантами, наиболее сильно, под действием СОД и ДМСО; 3) Спм стимулирует генерацию супероксида в клетках корня арабидопсиса, при этом Спд не влияет на данный процесс, а Пут- вызывает его ингибирование.

### Литература

1. Pottosin I. [et al.] Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling // Front Plant Sci. 2014. Vol. 5. № 154. P. 1 – 16.
2. Demidchik V.V [et al.] Arabidopsis root  $K^+$ -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death // J. Cell Sci. 2010. Vol. 123. № 1. P. 1468 – 1479.
3. Luce G.G. [et al.] Enumeration of cytotoxic cell-target cell conjugates by flow cytometry using internal fluorescent stains// Biotechniques. 1985. Vol. 3. № 1. P. 270 – 271.