

УДК 581.1

## ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ И ИНДУКЦИЯ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КОРНЕ *HELIANTHUS ANNUUS* L. ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ НИКЕЛЯ И НИКЕЛЬ-ГИСТИДИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

В. С. МАЦКЕВИЧ<sup>1)</sup>, А. А. ШИКЕР<sup>1)</sup>, С. Н. ЗВОНАРЕВ<sup>1)</sup>,  
К. С. ЛИЦКЕВИЧ<sup>1)</sup>, О. А. ТУРОВЕЦ<sup>2)</sup>, И. И. СМОЛИЧ<sup>1)</sup>,  
А. И. СОКОЛИК<sup>1)</sup>, В. В. ДЕМИДЧИК<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Полесский институт растениеводства НАН Беларуси, ул. Школьная, 2, 247781,  
пос. Криничный, Мозырский район, Гомельская область, Беларусь

Никель ( $Ni^{2+}$ ) выполняет ряд незаменимых функций у растений, но в высоких концентрациях вызывает токсические эффекты, подавляет их рост и развитие. Проблема загрязнения никелем занимает особое место в экологической физиологии, поскольку отказ от никелевых сплавов и, как следствие, снижение выброса данного металла

### Образец цитирования:

Мацкевич В.С., Шикер А.А., Звонарев С.Н., Лицкевич К.С., Туровец О.А., Смолич И.И., Соколик А.И., Демидчик В.В. Ингибирование ростовых процессов и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля и никель-гистидиновых комплексов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;1:11–19.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-11-19>

### For citation:

Mackievic VS, Shyker AA, Zvanarou SM, Litskevich KS, Turovets OA, Smolich II, Sokolik AI, Demidchik VV. Growth inhibition and induction of programmed cell death in the root of *Helianthus annuus* L. triggered by nickel ions and nickel-histidine complexes. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;1:11–19. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-1-11-19>

### Авторы:

**Вера Сергеевна Мацкевич** – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.  
**Артур Александрович Шикер** – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. С. Мацкевич.  
**Сергей Николаевич Звонарев** – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.  
**Кирилл Сергеевич Лицкевич** – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. С. Мацкевич.  
**Оксана Александровна Туровец** – старший научный сотрудник лаборатории масличных культур.  
**Игорь Иванович Смолич** – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.  
**Анатолий Иосифович Соколик** – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией физиологии и биотехнологии растений, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.  
**Вадим Викторович Демидчик** – доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета.

### Authors:

**Viera S. Mackievic**, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.  
[v.mackievic@gmail.com](mailto:v.mackievic@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-5116-0157>  
**Artur A. Shyker**, student at the faculty of biology.  
[shikerartur04@gmail.com](mailto:shikerartur04@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-2251-0779>  
**Siarhej M. Zvanarou**, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.  
[zvonarevsergey.bio@gmail.com](mailto:zvonarevsergey.bio@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-5403-0235>  
**Kiryl S. Litskevich**, student at the faculty of biology.  
[litskevich.k.s@gmail.com](mailto:litskevich.k.s@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0001-7598-7805>  
**Oksana A. Turovets**, senior researcher at the laboratory of oil-seeds.  
[mzpolft@mail.gomel.by](mailto:mzpolft@mail.gomel.by)  
<https://orcid.org/0000-0001-8995-7519>  
**Ihar I. Smolich**, PhD (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.  
[smolich@bsu.by](mailto:smolich@bsu.by)  
<https://orcid.org/0000-0001-7828-606X>  
**Anatoly I. Sokolik**, PhD (biology); head of the laboratory of plant physiology and biotechnology, associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.  
[sokolik@bsu.by](mailto:sokolik@bsu.by)  
<https://orcid.org/0000-0002-1513-9465>  
**Vadim V. Demidchik**, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology.  
[dzemidchik@bsu.by](mailto:dzemidchik@bsu.by)  
<https://orcid.org/0000-0003-3765-8386>

в биосферу на современном этапе не представляются возможными. Одним из природных механизмов приспособления к чрезмерному содержанию никеля в среде является усиленный синтез свободного гистидина, формирующего хелаты с  $\text{Ni}^{2+}$ . В настоящей работе проведен детальный анализ воздействия никеля и никель-гистидиновых комплексов на рост и развитие корней подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) белорусской селекции (гибрид Орион). Установлено, что  $\text{Ni}^{2+}$ , начиная с концентрации 0,3 ммоль/л, вызывает статистически достоверное ингибирование роста корней этого важного сельскохозяйственного вида, а при концентрации 3 ммоль/л и выше полностью подавляет его. Гистидин, введенный совместно с  $\text{Ni}^{2+}$ , уменьшал негативное влияние данного металла, сдвигая приблизительно на порядок действующие концентрации никеля, вызывающие один и тот же токсический эффект. Обработка  $\text{Ni}^{2+}$  приводила к увеличению доли клеток с симптомами запрограммированной клеточной гибели, при этом добавление гистидина снижало развитие указанных симптомов. Таким образом, в настоящей работе впервые установлены закономерности дозозависимости токсического воздействия никеля и никель-гистидиновых комплексов на рост корня подсолнечника и развитие симптомов запрограммированной клеточной гибели в ризодерме.

**Ключевые слова:** подсолнечник; корень; рост; запрограммированная клеточная гибель; тяжелые металлы; никель; гистидин.

## GROWTH INHIBITION AND INDUCTION OF PROGRAMMED CELL DEATH IN THE ROOT OF *HELIANTHUS ANNUUS* L. TRIGGERED BY NICKEL IONS AND NICKEL-HISTIDINE COMPLEXES

V. S. MACKIEVIC<sup>a</sup>, A. A. SHYKER<sup>a</sup>, S. M. ZVANAROU<sup>a</sup>,  
K. S. LITSKEVICH<sup>a</sup>, O. A. TUROVETS<sup>b</sup>,  
I. I. SMOLICH<sup>a</sup>, A. I. SOKOLIK<sup>a</sup>, V. V. DEMIDCHIK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

<sup>b</sup>Palesky Institute of Plant Growing, National Academy of Sciences of Belarus,  
2 Škołnaja Street, Kryničny 247781, Mazyr District, Homiel Region, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) performs a number of vital functions in plants, but at high concentrations it causes toxic effects and inhibits their growth and development. The problem of nickel contamination has a special place in environmental physiology, since the refuse to use nickel alloys and therefore the reduction of  $\text{Ni}^{2+}$  release into the biosphere are practically impossible today. In nature one of the mechanisms of adaptation to the excessive nickel content in the medium is increased synthesis of histidine, which forms chelates with  $\text{Ni}^{2+}$ . In the present work, for the first time, a detailed analysis of the effects of nickel and nickel-histidine complexes on the growth and development of sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) of Belarusian selection (variety Orion) was carried out. It was established that  $\text{Ni}^{2+}$ , starting from its level in the medium of 0.3 mmol/L, caused a significant growth inhibition of this agricultural plant. At a nickel concentration in the medium above 3 mmol/L, the growth of sunflower stopped completely. Histidine, introduced together with  $\text{Ni}^{2+}$ , caused a decrease in the toxicity of this metal for the root system, in some cases shifting by single-order nickel concentrations, causing the same effect. Nickel treatment caused a significant increase in the percentage of cells with programmed cell death symptoms, while histidine inhibited the development of these symptoms. Thus, the concentration dependences of nickel and nickel-histidine complexes effects on root growth and the processes of programmed cell death in the sunflower root were first demonstrated.

**Keywords:** sunflower; root; growth; programmed cell death; heavy metals; nickel; histidine.

### Введение

Загрязнение почв тяжелыми металлами – одна из важнейших экологических проблем современности. Повышенные уровни тяжелых металлов вызывают угнетение роста и нарушают развитие растений, а их накопление в растительных тканях представляет серьезную угрозу здоровью человека и животных [1]. Практически для всех позвоночных животных ионы никеля ( $\text{Ni}^{2+}$ ) являются крайне опасным токсикантом и канцерогеном: уже начиная с концентрации 1–5 мкмоль/л возникают патофизиологические реакции [2]. Для растительного организма  $\text{Ni}^{2+}$ , вероятно, менее токсичен [3]. У большинства видов растений токсические эффекты наблюдаются при концентрации  $\text{Ni}^{2+}$  в среде свыше

10–50 мкмоль/л [4]. Избыток  $Ni^{2+}$  в почве вызывает торможение или полную остановку роста корневой системы, хлороз и некроз листьев, отмирание репродуктивных органов и нарушение дифференцировки клеток и тканей, что часто связывают с подавлением активности некоторых ферментативных систем и деструкцией фотосинтетического аппарата [5].

В последние годы сформировалось мнение, согласно которому токсичность избытка  $Ni^{2+}$  для растений обусловлена его высокоспецифичным связыванием с рядом групп лигандов в белках и полисахаридах, а также индукцией окислительного стресса вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) [6]. Тем не менее, несмотря на многочисленные факты обнаружения продуктов окислительных повреждений в клетках растений в присутствии высоких уровней  $Ni^{2+}$ , природа редокс-зависимых токсических реакций  $Ni^{2+}$  остается непонятной. Известно, что в «биологических условиях», таких как среда цитоплазмы или пространство апопласта, ионная форма  $Ni^{2+}$  не обладает редокс-активностью, т. е.  $Ni^{2+}$  напрямую не может катализировать реакции Хабера – Вейса, синтезирующие гидроксильный радикал [7]. По одному из предложенных в литературе вариантов объяснения АФК-генерирующей способности никеля катализатором синтеза АФК, вероятно, выступают не сами ионы никеля, а их редокс-активные комплексы, способные к переносу электронов на молекулу  $H_2O_2$  и генерации гидроксил-радикала [8]. Немаловажно отметить, что растения в ответ на никелевый стресс синтезируют протеиногенную аминокислоту гистидин (Гис), которая может формировать редокс-активные хелатные комплексы данного металла ( $Ni - \text{Гис}$  и  $Ni - \text{Гис}_2$ ) [9]. Общеизвестно, что синтез Гис, приводящий к устранению избытка свободной формы никеля, является важной эволюционной стратегией выживания на фоне повышенных уровней  $Ni^{2+}$  в среде [10]. Однако, по ряду оценок, никель-гистидиновые комплексы могут обладать большей токсичностью, отличаясь от свободных ионов никеля высокой способностью катализировать генерацию АФК [9; 11–13]. Соответственно, возникает вопрос о токсичности никель-гистидиновых комплексов для важнейших видов растений, а также о роли генерации АФК при никелевом стрессе. Согласно гипотезе, развиваемой авторами настоящей работы, редокс-активность никель-гистидиновых комплексов может использоваться для индукции редокс-зависимых реакций клеточной сигнализации, которые выступают в роли триггеров процессов адаптации и индуцированной устойчивости к повышенным уровням никеля в среде. В связи с этим значительный интерес представляет анализ влияния никеля и никель-гистидиновых комплексов на рост и развитие растений в стандартизированных условиях, а также на жизнеспособность клеток корня, являющегося первичной мишенью токсического воздействия данного металла. В представленной работе было рассмотрено растение *Helianthus annuus* L. – наиболее важная масличная культура в мире, для которой пока не изучено влияние никеля и редокс-активных комплексов данного металла. Помимо жизнеспособности клеток корня оценивалось развитие морфологических симптомов запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ), представляющей собой «центральную» реакцию корневой системы на избыток практически любых тяжелых металлов в среде.

### Материалы и методы исследования

В работе использовались растения *Helianthus annuus* L. (гибрид Орион), семена которых были предоставлены Полесским институтом растениеводства. Ранее нами показано, что гибрид Орион отличается устойчивостью к воздействию некоторых абиотических стрессоров, таких как NaCl [14]. Проростки подсолнечника культивировались рулонным методом. Перед посадкой семена 20 мин обрабатывались раствором детергента (20 % *Domestos*), после чего промывались в проточной воде и выкладывались на влажную фильтровальную бумагу (15 × 15 см) на расстоянии 1 см от верхнего края, накрывались вторым листом бумаги и скручивались в рулон. Далее рулоны помещались в стаканы с питательным раствором, содержащим 10 % стандартного набора солей Мурасиге и Скуга [15] производства компании *Duchefa* (Нидерланды). В данную среду вводились тестируемые растворы  $Ni^{2+}$  ( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ) и  $Ni^{2+} - \text{Гис}$ , pH устанавливался на уровне 6,0. Комплексы  $Ni^{2+} - \text{Гис}$  генерировались путем добавления растворов  $Ni^{2+}$  и Гис в соотношении 1 : 2 [16]. Стаканы с рулонами помещались в стерильную ростовую камеру с контролируемыми условиями освещения (16 ч (свет)/8 ч (темнота)) и температурным режимом (22 °C), где инкубировались в течение 7 сут. Ежедневно осуществлялся мониторинг прироста корней, фотографии делались SLR-камерой Nikon D5500 (Япония). На 7-е сутки регистрировалась длина основного корня. Расчеты морфологических параметров производились при помощи приложения *ImageJ*.

Морфологические симптомы ЗКГ выявлялись в корневых волосках 7-дневных проростков подсолнечника с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100F. Проростки подсолнечника помещались в  $Ni^{2+}$ -содержащие растворы на 3 и 24 ч. Для каждой серии экспериментов подсчет относительного количества клеток с симптомами ЗКГ производился в 15 независимых группах (по 100 корневых волосков каждая). Фотографирование при проведении морфологических тестов осуществлялось при 40-кратном увеличении.

Жизнеспособность клеток корня определялась с использованием красителя Evans blue (*AppliChem*, Германия). Обработанные стрессорами растения подсолнечника помещались в водный раствор 0,025 % Evans blue и выдерживались 30 мин, после чего корни тщательно промывались в течение 10 мин в растворе, содержащем по 0,1 ммоль/л KCl и CaCl<sub>2</sub> (рН 6,0; 2 ммоль/л Mes и 1 ммоль/л Tris), и анализировались при помощи инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100F ( $\lambda_{ex} = 470$  нм,  $\lambda_{em} = 680$  нм). Интенсивность флуоресценции определялась в приложении *NIS Elements Imaging Software* отдельно для зрелой зоны и зоны кончика корня.

## Результаты и их обсуждение

Введение в среду выращивания Ni<sup>2+</sup>, начиная с уровня 0,1 ммоль/л, индуцировало снижение скорости роста основного корня *Helianthus annuus* L. (рис. 1). Полумаксимальный ингибирующий эффект (снижение скорости роста в 2 раза) регистрировался на фоне 0,4 ммоль/л Ni<sup>2+</sup>, а концентрация 10 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> была летальной. При введении в питательную среду 1 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> семена прорастали, однако в дальнейшем рост корней останавливался. Обнаруженный концентрационный диапазон токсических эффектов никеля указывает на то, что подсолнечник является относительно устойчивым к данному металлу видом по сравнению со многими сельскохозяйственными растениями. Например, для корней лука (*Allium cepa* L.) полумаксимальный эффект был отмечен при 0,25 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> (против 0,4 ммоль/л для подсолнечника) [17]. Кукуруза (*Zea mays* L.) намного более чувствительна к никелю: полумаксимальное ингибирование роста корня, а также снижение жизнеспособности клеток наблюдались при обработке 2 мкмоль/л Ni<sup>2+</sup> [18].

Введение в среду выращивания Ni<sup>2+</sup> совместно с Гис в соотношении 1 : 2 значительно снижало токсический эффект данного металла. Например, на фоне летальной концентрации Ni<sup>2+</sup> (10 ммоль/л) добавление Гис восстанавливало прорастание семян (см. рис. 1, з, и). Сублетальные уровни Ni<sup>2+</sup> (1 и 3 ммоль/л) в присутствии Гис вызывали в 3 раза меньший ингибирующий эффект (см. рис. 1, з – ж).

При кратковременной обработке проростков подсолнечника никельсодержащими растворами в клетках корня развивалась ЗКГ (рис. 2). В результате воздействия 0,3–10,0 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> в течение 3–24 ч в корневых волосках подсолнечника доминировали типичные морфологические симптомы ЗКГ: отслоение цитоплазматической мембраны от клеточной стенки, образование темных телец на месте ядра, конденсация протопласта, видимые нарушения целостности мембран (см. рис. 2, а – в). В контрольных образцах, выдержанных в безникелевой среде, данных симптомов практически не наблюдалось (см. рис. 2), а доля клеток с ЗКГ не превышала 8 %. При 3-часовой экспозиции симптомы ЗКГ отмечались лишь при высоких уровнях Ni<sup>2+</sup>: при 3 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> – у 15 % клеток, при 10 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> – у 25 %. Обработка 3 и 10 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> на протяжении 24 ч индуцировала гибель 35 % трихобластов (корневых волосков). Концентрация 0,3–1,0 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> не оказывала негативного эффекта при 3-часовом воздействии, однако индуцировала развитие морфологических симптомов ЗКГ при 24-часовой экспозиции. Добавление Гис подавляло токсические эффекты Ni<sup>2+</sup>: доля клеток с симптомами ЗКГ «возвращалась» к уровню контрольных необработанных никелем групп растений. Таким образом, в случае Ni<sup>2+</sup>-индуцированной ЗКГ Гис оказывал сильное протекторное воздействие, предотвращая отмирание клеток корня как на начальных этапах (3 ч), так и при увеличении времени экспозиции (24 ч).

Схожие результаты были получены в тестах жизнеспособности клеток с использованием Evans blue (рис. 3). Добавление сублетальных концентраций Ni<sup>2+</sup> снижало общую жизнеспособность клеток в 1,5–2,0 раза как в зрелой зоне, так и в зоне деления. Обработка проростков подсолнечника летальной концентрацией Ni<sup>2+</sup> (10 ммоль/л) на протяжении 24 ч уменьшала жизнеспособность клеток корня примерно в 3 раза по сравнению с контрольными необработанными группами растений. Введение Гис снижало токсическое действие Ni<sup>2+</sup>, в особенности при обработке 10 ммоль/л Ni<sup>2+</sup>.

Исследования ЗКГ, индуцируемой абиотическими стрессорами в корне высших растений, проведены на многих видах, включая важнейшие однодольные и двудольные растения [19–22]. Предложен ряд механизмов данного явления, в частности ионный механизм (посредством активации гидролитических ферментов в результате изменения уровней важнейших катионов в цитоплазме), механизм транслокации специализированных протеаз (фитоспаз) из клеточной стенки в цитоплазму и вакуолярный механизм (путем разрушения центральной вакуоли специальными ферментами) [19]. Соответственно, на морфологическом уровне ЗКГ у высших растений подразделяется на два основных типа – апоптозоподобный и вакуолярно-литический. Описанный в настоящей работе тип ЗКГ по своим признакам относится к первой группе, так как содержимое клеток корня остается интактным и отсутствуют признаки разрыва вакуоли. Подобный тип ЗКГ доминирует и при воздействии других переходных металлов, например ионов меди, а также при засолении [23]. Важно отметить, что протекторное влияние Гис на ЗКГ, вызываемую тяжелыми металлами, обнаружено в данной работе впервые. Ранее протекторные эффекты были выявлены только для антиоксидантов и блокаторов Ca<sup>2+</sup>- и K<sup>+</sup>-проницаемых катионных каналов [19].

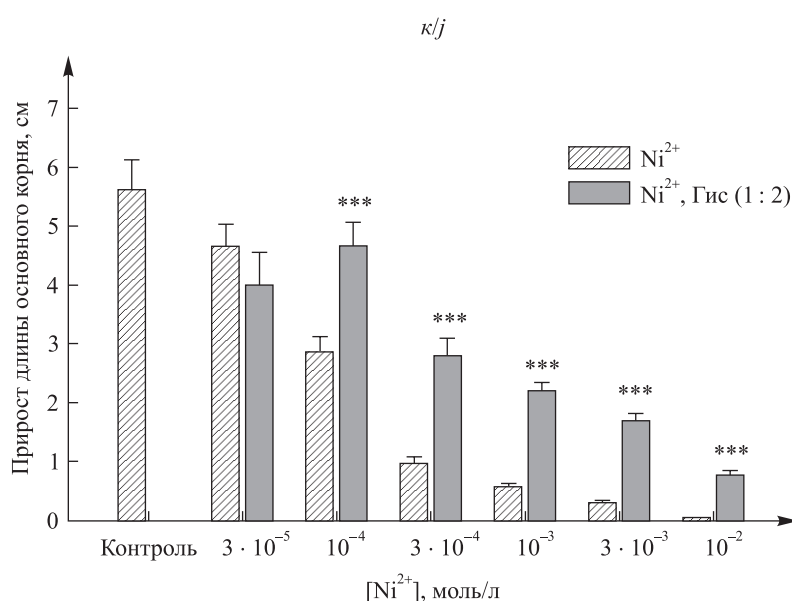
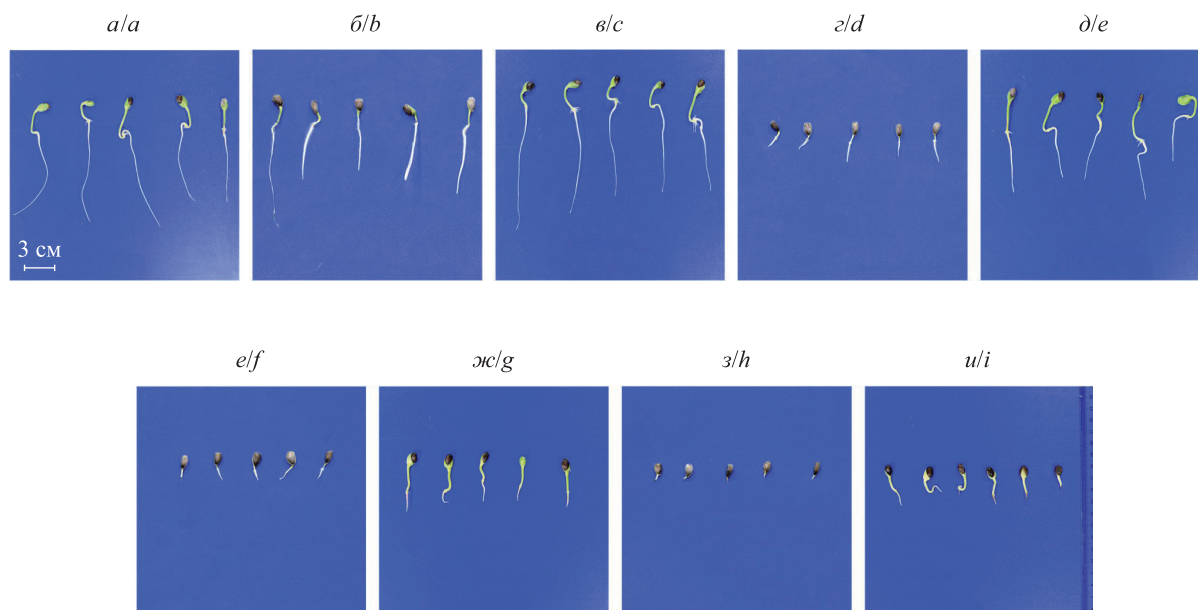


Рис. 1. Воздействие Ni<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>-гистидиновых комплексов на рост корней подсолнечника.

Внешний вид 7-дневных проростков подсолнечника: а – безникелевая среда (контроль); среда с Ni<sup>2+</sup> в концентрации (ммоль/л): б – 0,3; г – 1; е – 3; з – 10;

среда с Ni<sup>2+</sup>-гистидиновыми комплексами в концентрации:

в – 0,3 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> + 0,6 ммоль/л Гис; д – 1 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> + 2 ммоль/л Гис;

ж – 3 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> + 6 ммоль/л Гис; и – 10 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> + 20 ммоль/л Гис.

Средние значения прироста длины основного корня ( $X \pm Sx$ ,  $n = 30$ ), полученные в контроле и при обработке Ni<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>-гистидиновыми комплексами (к).

Достоверность различий рассчитывалась по отношению

к растениям, обработанным Ni<sup>2+</sup>: \*\*\* –  $p < 0,001$

Fig. 1. Ni<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>-histidine complexes effect on the sunflower root growth.

Typical photos of 7-day sunflower seedlings: а – nickel-free medium (the control);

medium with Ni<sup>2+</sup> in concentration (mmol/L): б – 0.3; д – 1; ф – 3; h – 10;

medium with Ni<sup>2+</sup>-histidine complexes in concentration:

с – 0.3 mmol/L Ni<sup>2+</sup> + 0.6 mmol/L histidine; е – 1 mmol/L Ni<sup>2+</sup> + 2 mmol/L histidine;

г – 3 mmol/L Ni<sup>2+</sup> + 6 mmol/L histidine; и – 10 mmol/L Ni<sup>2+</sup> + 20 mmol/L histidine.

Mean length gain of the main root ( $X \pm Sx$ ,  $n = 30$ ) (j). The significance

of differences was calculated with respect to the Ni<sup>2+</sup>-treated plants: \*\*\* –  $p < 0.001$

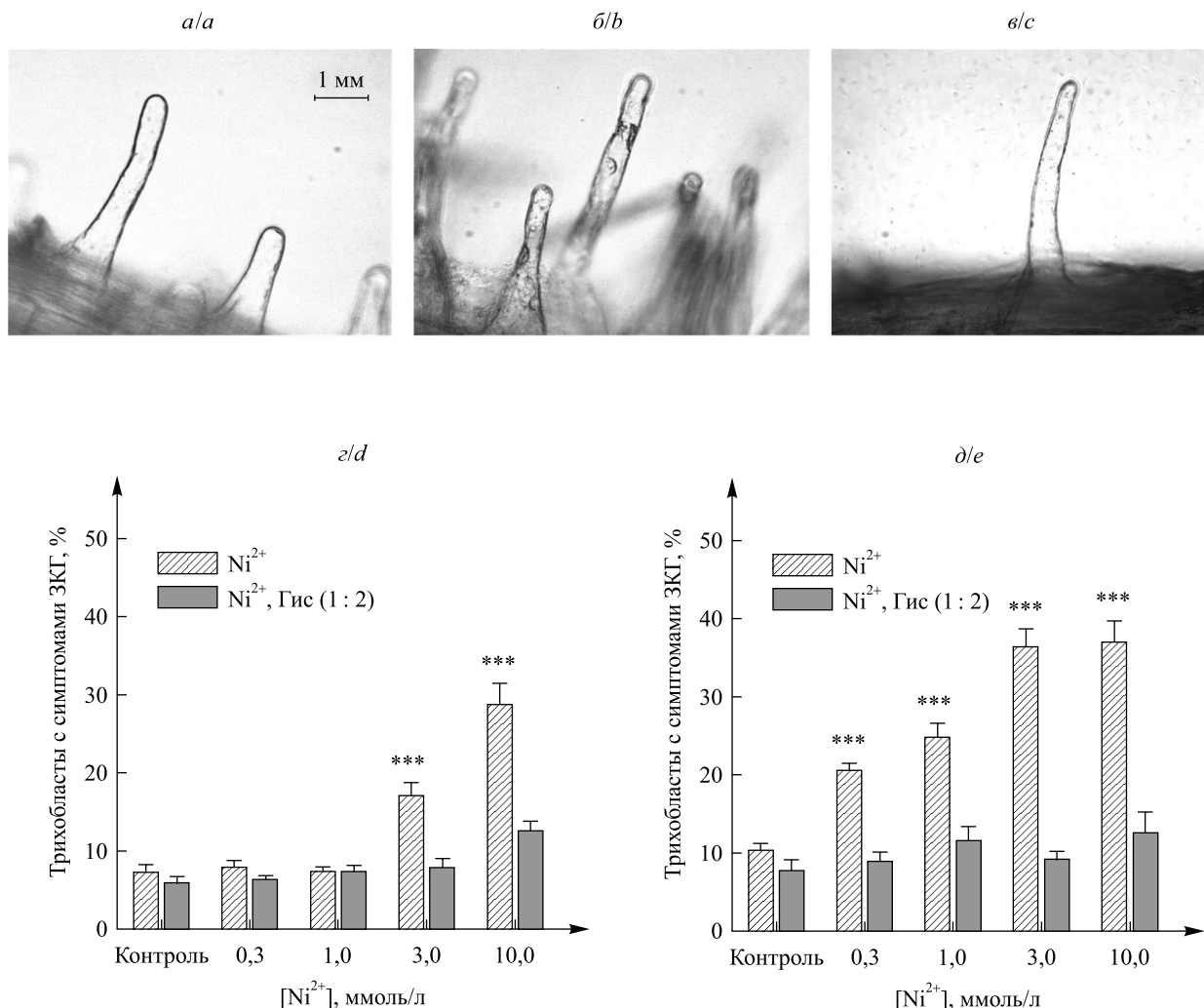


Рис. 2. Влияние Гис на развитие морфологических симптомов ЗКГ в клетках корня подсолнечника при никелевом стрессе. Внешний вид корневых волосков без обработки (а) и после 24-часовой экспозиции на фоне 3 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> (б) и 3 ммоль/л Ni<sup>2+</sup> + 6 ммоль/л Гис (в). Средняя доля корневых волосков с симптомами ЗКГ при инкубировании подсолнечника в Ni<sup>2+</sup>-содержащих растворах в течение 3 ч (з) и 24 ч (д). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: \*\*\* –  $p < 0,001$  ( $n = 15$ )

Fig. 2. The effect of histidine on the development of morphological symptoms of programmed cell death (PCD) in sunflower roots under nickel stress. Typical photos of root hairs without treatment (a) and after 24-hour exposure in solutions containing 3 mmol/L Ni<sup>2+</sup> (b) and 3 mmol/L Ni<sup>2+</sup> + 6 mmol/L histidine (c). The percentage of root hairs with programmed cell death symptoms in sunflower incubated in solutions containing Ni<sup>2+</sup> for 3 h (d) and 24 h (e). The significance of differences was calculated with respect to the control: \*\*\* –  $p < 0.001$  ( $n = 15$ )

Таким образом, проведенные опыты показывают, что добавление Гис и формирование его комплексов с никелем приводит к значительному снижению токсичности Ni<sup>2+</sup> как в виде восстановления ростовых процессов, так и путем повышения жизнеспособности поврежденных клеток. Предположительно, протекторный эффект Гис может быть связан с образованием редокс-активных комплексов, способных активировать АФК- и Ca<sup>2+</sup>-зависимые механизмы адаптации к никелю. Однако возможны и другие механизмы, объясняющие обнаруженный эффект. Например, недавно было выявлено снижение Ni<sup>2+</sup>-индуцированного окислительного стресса посредством активации ферментов глутатион-аскорбатного цикла, важным звеном синтеза компонентов которого может выступать экзогенный Гис [24]. В таком случае Гис, вероятно, способствует увеличению пула ключевых антиоксидантов. Будущие исследования эффектов никеля и никель-гистидиновых комплексов на уровне сигнальных реакций клетки и модификаций генетической экспрессии позволят глубже понять природу обнаруженных явлений.

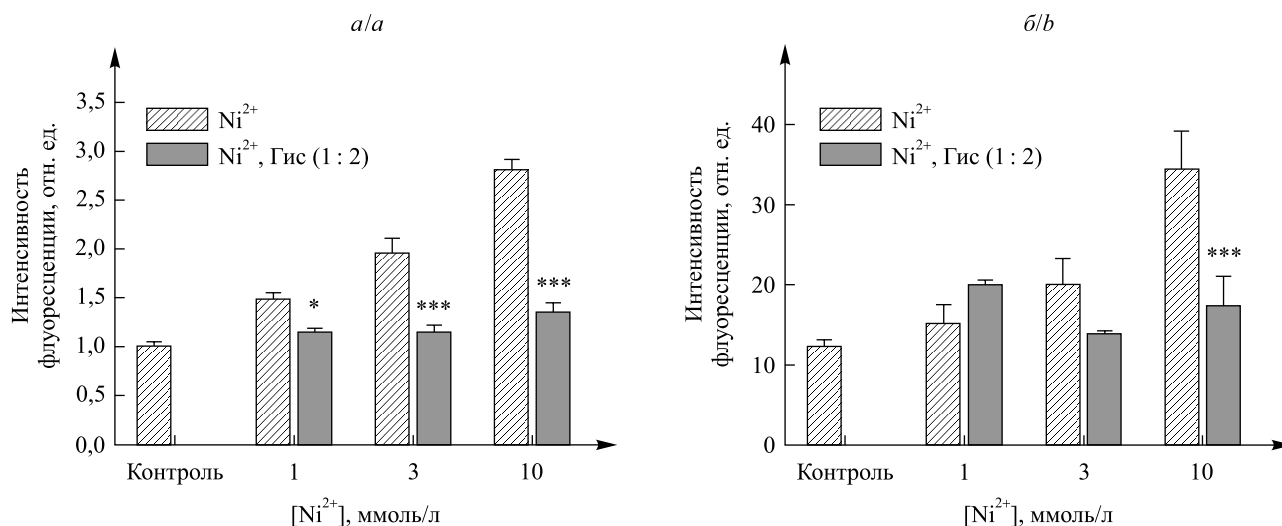


Рис. 3. Изменение жизнеспособности корней *Helianthus annuus* L. после 24-часовой экспозиции растений в Ni<sup>2+</sup>-содержащих растворах (тест с Evans blue): а – интенсивность флуоресценции Evans blue в зрелой зоне корня ( $X \pm Sx$ ,  $n = 40-50$ ); б – интенсивность флуоресценции Evans blue в зоне кончика корня ( $X \pm Sx$ ,  $n = 7-10$ ). Достоверность различий рассчитывалась по отношению к интенсивности флуоресценции в корнях при обработке Ni<sup>2+</sup>: \* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

Fig. 3. Change in the viability of the roots of *Helianthus annuus* L. after 24-hour exposure in Ni<sup>2+</sup>-containing solutions (test with Evans blue): а – the intensity of Evans blue fluorescence in the mature zone of roots ( $X \pm Sx$ ,  $n = 40-50$ ); б – the intensity of Evans blue fluorescence in the root tip area ( $X \pm Sx$ ,  $n = 7-10$ ). The significance of differences was calculated with respect to the fluorescence intensity in the roots treated with Ni<sup>2+</sup>: \* –  $p < 0.05$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$

Данное исследование было выполнено в рамках совместных международных белорусско-индийских (№ Б17ИНДГ-003) и белорусско-китайских (№ Б19КИТГ-006) научных проектов, финансируемых Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь.

### Библиографические ссылки

- Buxton S, Garman E, Heim KE, Lyons-Darden T, Schlekot CE, Taylor MD, et al. Concise review of nickel human health toxicology and ecotoxicology. *Inorganics* [Internet]. 2019 [cited 2019 July 20];7(7):89. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6740/7/7/89/htm>. DOI: 10.3390/inorganics7070089.
- Balachandran C, Haribabu J, Jeyalakshmi K, Bhuvanesh NSP, Karvembu R, Emi N, et al. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018;182:208–221. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.02.014.
- Bergmann W, editor. *Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis*. Jena: G. Fisher; 1992. 741 p.
- Rizvi A, Khan MS. Heavy metal-mediated toxicity to maize: oxidative damage, antioxidant defence response and metal distribution in plant organs. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(8):4873–4886. DOI: 10.1007/s13762-018-1916-3.
- Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany* [Internet]. 2012 [cited 2019 July 21];2012. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/872875/>. DOI: 10.1155/2012/872875.
- Kehrer JP. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43–50. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
- Joshi S, Husain MM, Chandra R, Hasan SK, Srivastava RC. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide. *Human & Experimental Toxicology*. 2005;24(1):13–17. DOI: 10.1191/0960327105ht493oa.
- Richau KH, Kozhevnikova AD, Seregin IV, Vooijs R, Koevoets PLM, Smith JAC, et al. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. 2009;183(1):106–116. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x.
- Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, Smith JAC. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*. 2005;17(7):2089–2106. DOI: 10.1105/tpc.104.030577.
- Inoue S, Kawanishi S. ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel(II) complex of glycyglycyl-L-histidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;159(2):445–451. DOI: 10.1016/0006-291x(89)90012-0.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. 936 p.

13. Ghasemi R, Ghaderian SM, Krämer U. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytologist*. 2009;184(3):566–580. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02993.x.
14. Мацкевич ВС, Звонарев СН, Шикер АА, Туровец ОА, Смолич ИИ, Соколик АИ и др. Выявление особенностей NaCl-индуцированной модификации ростовых процессов и индукции запрограммированной клеточной гибели в корне подсолнечника. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;3:13–20. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-13-20.
15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
16. Datta AK, Misra M, North SL, Kasprzak KS. Enhancement by nickel(II) and L-histidine of 2'-deoxyguanosine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*. 1992;13(2):283–287. DOI: 10.1093/carcin/13.2.283.
17. Akbaş H, Dane F, Meriç Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2009;46(4):332–336.
18. Fiala R, Kenderešová L, Syschykov DV, Martinka M, Repka V, Pavlovkin J, et al. Comparison of root growth and morphological responses to cadmium and nickel in two maize cultivars. *Modern Phytomorphology*. 2013;3:131–137. DOI: 10.5281/zenodo.162002.
19. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):28–46. DOI: 10.1071/fp16380.
20. Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015 [cited 2019 July 23];6:69. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00069/full>. DOI: 10.3389/fpls.2015.00069.
21. Hogg BV, Kacprzyk J, Molony EM, O'Reilly C, Gallagher TF, Gallois P, et al. An *in vivo* root hair assay for determining rates of apoptotic-like programmed cell death in plants. *Plant Methods* [Internet]. 2011 [cited 2019 July 23];7(1):45. Available from: <http://www.plantmethods.com/content/7/1/45>. DOI: 10.1186/1746-4811-7-45.
22. Kumar SR, Mohanapriya G, Sathishkumar R. Abiotic stress-induced redox changes and programmed cell death in plants – a path to survival or death? In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, editors. *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Cham: Springer; 2016. p. 233–252. DOI: 10.1007/978-3-319-44081-1\_11.
23. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. *Arabidopsis* root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
24. Asrar Z, Mozafari H, Rezanejad F, Pourseyedi S, Yaghoobi MM. Calcium and L-histidine effects on ascorbate-glutathione cycle components under nickel-induced oxidative stress in tomato plants. *Biologia Plantarum*. 2014;58(4):709–716. DOI: 10.1007/s10535-014-0443-4.

## References

1. Buxton S, Garman E, Heim KE, Lyons-Darden T, Schlekot CE, Taylor MD, et al. Concise review of nickel human health toxicology and ecotoxicology. *Inorganics* [Internet]. 2019 [cited 2019 July 20];7(7):89. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6740/7/7/89/htm>. DOI: 10.3390/inorganics7070089.
2. Balachandran C, Haribabu J, Jeyalakshmi K, Bhuvanesh NSP, Karvembu R, Emi N, et al. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018;182:208–221. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.02.014.
3. Bergmann W, editor. *Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis*. Jena: G. Fisher; 1992. 741 p.
4. Rizvi A, Khan MS. Heavy metal-mediated toxicity to maize: oxidative damage, antioxidant defence response and metal distribution in plant organs. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(8):4873–4886. DOI: 10.1007/s13762-018-1916-3.
5. Srekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;10(5):1129–1140. DOI: 10.1007/s13762-013-0245-9.
6. Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany* [Internet]. 2012 [cited 2019 July 21];2012. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/872875/>. DOI: 10.1155/2012/872875.
7. Kehrer JP. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43–50. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00231-6.
8. Joshi S, Husain MM, Chandra R, Hasan SK, Srivastava RC. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide. *Human & Experimental Toxicology*. 2005;24(1):13–17. DOI: 10.1191/0960327105ht493oa.
9. Richau KH, Kozhevnikova AD, Seregin IV, Vooijs R, Koevoets PLM, Smith JAC, et al. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. 2009;183(1):106–116. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x.
10. Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, Smith JAC. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*. 2005;17(7):2089–2106. DOI: 10.1105/tpc.104.030577.
11. Inoue S, Kawanishi S. ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel(II) complex of glycylglycyl-L-histidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;159(2):445–451. DOI: 10.1016/0006-291x(89)90012-0.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. 936 p.
13. Ghasemi R, Ghaderian SM, Krämer U. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytologist*. 2009;184(3):566–580. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02993.x.



14. Mackievic VS, Zvanarou SM, Shyker AA, Turovets OA, Smolich II, Sokolik AI, et al. Determination of NaCl-induced modifications in growth processes and induction of programmed cell death in sunflower roots. *Journal of Belarusian State University. Biology*. 2019;3:13–20. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2019-3-13-20.
15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
16. Datta AK, Misra M, North SL, Kasprzak KS. Enhancement by nickel(II) and L-histidine of 2'-deoxyguanosine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*. 1992;13(2):283–287. DOI: 10.1093/carcin/13.2.283.
17. Akbaş H, Dane F, Meriç Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2009;46(4):332–336.
18. Fiala R, Kenderešová L, Syshchykov DV, Martinka M, Repka V, Pavlovkin J, et al. Comparison of root growth and morphological responses to cadmium and nickel in two maize cultivars. *Modern Phytomorphology*. 2013;3:131–137. DOI: 10.5281/zenodo.162002.
19. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):28–46. DOI: 10.1071/fp16380.
20. Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015 [cited 2019 July 23];6:69. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00069/full>. DOI: 10.3389/fpls.2015.00069.
21. Hogg BV, Kacprzyk J, Molony EM, O'Reilly C, Gallagher TF, Gallois P, et al. An *in vivo* root hair assay for determining rates of apoptotic-like programmed cell death in plants. *Plant Methods* [Internet]. 2011 [cited 2019 July 23];7(1):45. Available from: <http://www.plantmethods.com/content/7/1/45>. DOI: 10.1186/1746-4811-7-45.
22. Kumar SR, Mohanapriya G, Sathishkumar R. Abiotic stress-induced redox changes and programmed cell death in plants – a path to survival or death? In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, editors. *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Cham: Springer; 2016. p. 233–252. DOI: 10.1007/978-3-319-44081-1\_11.
23. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. *Arabidopsis* root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
24. Asrar Z, Mozafari H, Rezanejad F, Pourseyedi S, Yaghoobi MM. Calcium and L-histidine effects on ascorbate-glutathione cycle components under nickel-induced oxidative stress in tomato plants. *Biologia Plantarum*. 2014;58(4):709–716. DOI: 10.1007/s10535-014-0443-4.

Статья поступила в редколлегию 01.11.2019.  
Received by editorial board 01.11.2019.