

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЮЦИГЕНИНА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Д.В. Земко

Белорусский государственный университет, г. Минск;

makovitskayama@gmail.com;

науч. рук. – М. А. Войтехович

Изучение активных форм кислорода является важной частью понимания различных процессов протекающих в клетке, а разработка методов, позволяющих регистрировать образование активных форм кислорода в живых системах, является актуальной задачей исследований в данной области. Одним из таких методов является метод хемилюминесценции, который связан с использованием зондов – соединений, вступающих в реакции с активными формами кислорода, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Переход из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием квантов света. Одним из представителей таких зондов является люцигенин. Целью настоящей работы было протестировать возможность применения люцигенина для обнаружения активных форм кислорода в клетках растений.

Ключевые слова: корни проростков *Pisumsativum*L.; активные формы кислорода; хемилюминесцентные зонды; люцигенин; люминесценция; люминометр.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) образуются в живых системах постоянно и являются обычным продуктом обмена веществ, играющим важную роль в клеточной сигнализации и поддержании гомеостаза. Однако, действие различных абиотических стресс-факторов способно резко увеличивать продукцию АФК и приводить к повреждению клеточных структур или гибели целого организма. К основным АФК, обнаруженным в биологических системах, и играющим важное значение в индукции окислительного стресса относятся: супероксидный анионный радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), перекись водорода (H_2O_2) и др. [1]. Изучение АФК является важной частью понимания различных процессов протекающих в клетке, а разработка методов, позволяющих регистрировать образование АФК в живых системах, является актуальной задачей исследований в данной области. Одним из таких методов является метод хемилюминесценции (ХЛ), который обладает рядом преимуществ по сравнению с другими. Во-первых, он не связан с изменением хода процессов в растворах, клетках или даже целых тканях, где регистрируется свечение; во-вторых, он весьма чувствителен при обнаружении именно высокорекреационных радикалов [2].

Метод ХЛ связан с использованием веществ активаторов ХЛ(ХЛ-зонды)[2]. Одним из представителей таких ХЛ-зондов является люцигенин (10,10'-диметил-9,9'-биакридиния динитрат). Люцигенин работает как ХЛ-зонд начиная с рН 9,0. Люцигенин-активируемая ХЛ (Люц-ХЛ) может применяться для обнаружения $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [3]. В водном щелочном растворе люцигенин находится в виде двухвалентного катиона, способного взаимодействовать с $O_2^{\cdot-}$ и приводить к образованию нестабильного соединения – люцигениндиоксетана, который распадается на две молекулы N-метил-акридона. Одна из молекул N-метил-акридона находится в электронно-возбужденном состоянии, ее переход из возбужденного состояния в основное приводит к люминесценции. Реакция люцигенина с H_2O_2 также приводит к образованию возбужденного состояния N-метил-акридона, способного к свечению [3]. Таким образом, считается, что люминесценция наблюдаемая от N-метил-акридона пропорциональна концентрации АФК. В ранних работах Люц-ХЛ применялась для оценки продукции АФК фагоцитами[2]. Однако, ряд исследователей ставит под сомнения возможность применения люцигенина для достоверной оценки продукции АФК в живых системах, так как в определенных условиях люцигенин может сам являться источником $O_2^{\cdot-}$ в результате его автоокисления [3]. В связи с этим, целью работы было протестировать возможность применения люцигенина для обнаружения АФК в клетках растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись 5-дневные проростки гороха полевого (*Pisum sativum* L.). Регистрация люминесценции осуществлялась при помощи высокочувствительного компьютеризированного люминометра Turner BioSystems 20/20 (США). Нарезанные на небольшие фрагменты (длиной 3-4 мм) корни проростков гороха помещались в кварцевые кюветы с 300 мкл H_2O . Далее, кюветы, переносились в измерительный отсек люминометра, и записывался временной ход эмиссии светового сигнала от пробы с частотой 1 Гц. Через 2 мин в кювету вводился люцигенин или люцигенин с тестируемым раствором через специальный канал, ведущий в рабочий отсек люминометра. Остановка записи люминометра осуществлялась по завершению реакции свечения. Рабочие растворы готовились на деионизированной воде. Конечная концентрация люцигенина в пробе с растениями составляла 10 мкМ. В качестве дополнительного источника АФК использовался 200 мМ NaCl. Значение рН для всех растворов фиксировалось на отметки 9,0 при помощи 1 М ТРИС / 0,5 М МЕС.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы с люцигенином проводился подбор рабочей концентрации зонда и оптимального значения рН. Было протестировано влияние различных концентраций люцигенина (10–1000 мкМ) с рН 9 на способность вызывать собственное свечение. Показано, что концентрация люцигенина от 10 до 100 мкМ не приводила к свечению. Люминесценция начиналась от 150 мкМ люцигенина и составляла 0,57 отн. ед., для 0,5 мМ люцигенина – 1,98 отн. ед., а 1 мМ люцигенина – 25,30 отн. ед. Далее было протестировано влияние рН на возникновение свечения люцигенина. Раствор люцигенина в концентрациях 0,5 мМ и 1 мМ доводили до отметки рН в 6, 7, 8, 9 и 10. Установлено, что при рН 6–8 свечения люцигенина не наблюдалось, а при рН 9 и 10 отмечалось явление люминесценции. Различий в интенсивности свечения люцигенина с рН 9 и 10 выявлено не было. Следующим шагом было изучено взаимодействие различных концентраций люцигенина с 1 мМ H_2O_2 . Результаты эксперимента показали, что реакция люцигенина с H_2O_2 приводила к резкому увеличению интенсивности свечения: 10 мкМ люцигенина – на 50 отн. ед.; 150 мкМ – на 680 отн. ед.; 500 мкМ – на 3300 отн. ед.; 1000 мкМ – на 8800 отн. ед.. Таким образом, даже самая низкая концентрация люцигенина в 10 мкМ вызывала значительное увеличение свечения, что позволило использовать данную концентрацию в качестве рабочей. Эксперименты по обнаружению АФК в растениях показали, что после добавления к корням гороха люцигенина отмечалось небольшое свечение около 2 отн. ед., которое к 17 мин записи практически прекращалось. Такое длительное по времени свечение может быть связано с взаимодействием люцигенина с H_2O_2 , которая содержится в тканях корня (рис. 1).

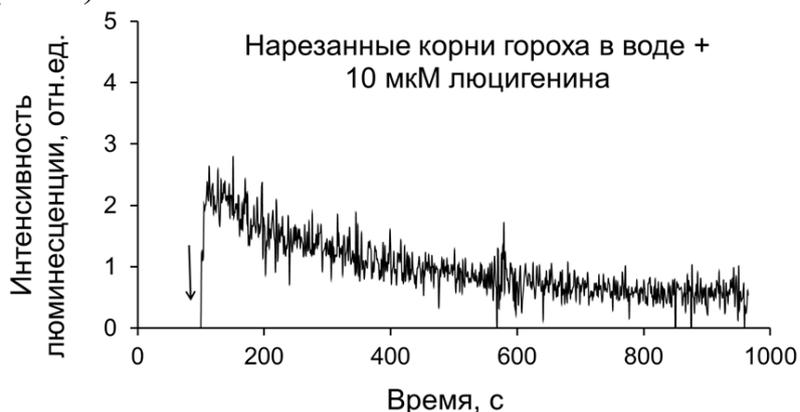


Рис. 1 Реакция 10 мкМ люцигенина с корнями гороха при рН 9 (стрелкой указан момент добавления тест-раствора)

Далее было протестировано взаимодействие люцигенина с корнями гороха и 200 мМ NaCl . Таким действием корни гороха подвергались соле-

тому стрессу, который неизбежно приводит к генерации большого количества АФК. Показано, что добавление NaCl приводило к резкому увеличению свечения образца и такому же быстрому его затуханию. Время жизни световой волны представлено на рис. 2. Интенсивность люминесценции на пике составляла 120 отн.ед.. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что такое свечение могло быть вызвано генерацией $O_2^{\cdot-}$.

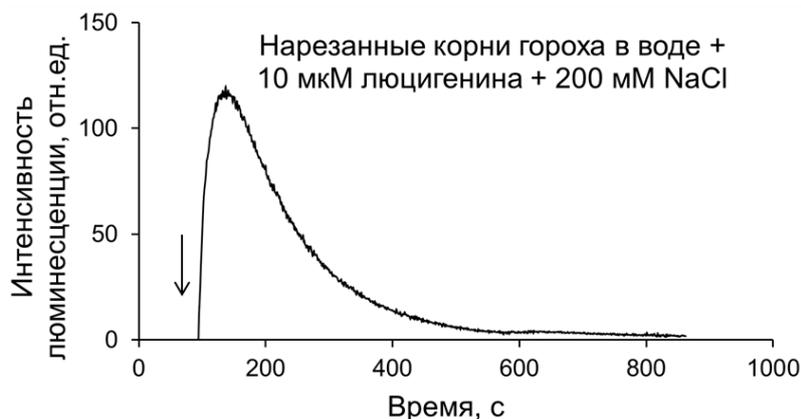


Рис.2 Реакция 10 мкМ люцигенина с корнями гороха и 200 мМ NaCl при pH 9 (стрелкой указан момент добавления тест-раствора)

Таким образом, было показано, что люцигенин может быть использован в качестве ХЛ-зонда на обнаружение АФК в тканях растений. Однако, важным условием в работе с этим зондом является правильный подбор рабочей концентрации, которая не будет вызывать собственного свечения люцигенина (автоокисление) и соблюдение уровня pH.

Библиографические ссылки

1. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology // Environmental and Experimental Botany. 2015. Vol. 109, № 17. P. 212–228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
2. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341–388.
3. Afanas'ev I. B., Ostrachovitch E. A., Korkina L. G. Lucigenin is a mediator of cytochrome C reduction but not of superoxide production // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1999. Vol. 366, № 2. P. 267–274. DOI: 10.1006/abbi.1999.1215.