

УДК 573.086.581.085

Н. К. БИШИМБАЕВА

ОБНАРУЖЕНИЕ КЛЕТОК С ПРИЗНАКАМИ ПРОГРАММИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ В ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ

(Институт физиологии, генетики и биоинженерии растений МОН РК)

Методами световой микроскопии выявлено, что интенсивно окрашенные деградирующие клетки эмбриогенных каллусов пшеницы и ячменя обладают характерными чертами клеток с признаками программированной гибели: разрушение ядерного материала и выход его содержимого в цитоплазму, сжатие цитоплазмы, наличие периплазматического пространства, утолщение клеточной стенки, увеличение размеров клеток, высокая активность окислительно-восстановительных процессов и изменение рН цитоплазмы в кислую сторону. Дополнительно, методами флуоресцентной микроскопии при окрашивании акридин оранжевым и методом TUNEL выявлены разрушение ядерного материала и межнуклеосомная фрагментация молекул ДНК в деградирующих клетках, являющиеся характерными признаками апоптоза.

Программированная клеточная смерть (ПКС) или апоптоз – генетически запрограммированная смерть, процесс, включающий большое количество регуляторных генов, сигнальных путей и ряд событий, приводящих к изменению морфологических признаков клеток. Наряду с делением и дифференцировкой программированная гибель клеток или апоптоз является процессом, необходимым и благоприятным для организма, способствующим становлению и функционированию организма в нормальных физиологических условиях [1]. Поэтому апоптоз еще называют физиологической гибелью клеток.

Программируемая клеточная смерть также происходит в процессе защитных реакций живых организмов при умеренных дозах стрессов [2]. При высокой дозе стресса наблюдается некроз клеток, который сопровождается набуханием и почернением тканей и в отличие от апоптоза ведет к отмиранию тканей организма.

Процесс апоптоза хорошо изучен для животных клеток и характеризуется следующими основными морфологическими признаками: конденсация хроматина, сжатие клетки, систематическое расщепление ДНК, сопровождающееся разрушением ядра, фрагментация клетки на дискретные апоптические тела [1]. При апоптозе в первую очередь страдает ядро и содержимое ядра выливается в цитоплазму, при этом сохраняется целостность клеточной мембраны. В отличие от апоптоза при некрозе в первую очередь происходит лизис клеточной мембраны и мембран органелл, в результате чего все содержимое клетки выходит наружу.

ПКС у растений также происходит в процессе развития и защитных реакций и в целом сходна по проявлениям и механизмам с апоптозом у животных [3]. В отличие от животных остовы апоптозных клеток растений, как правило, не исчезают бесследно благодаря прочности клеточных стенок и составляют основу сосудистых пучков и аэренхимы [3]. Однако сведения об апоптозе у растений все еще очень фрагментарны, и до сих пор еще не сложилось целостного представления о типичной апоптозной растительной клетке как *in vivo*, так *in vitro* от появления первых признаков программированной клеточной смерти до ее терминальной стадии.

Ранее при изучении цитоморфологического строения эмбриогенных каллусов пшеницы и ячменя нами выявлены интенсивно окрашенные деградирующие клетки (ИОДК) [4]. Установлено, что пропорция ИОДК в каллусных тканях регулируется при помощи фитогормонов и трофических факторов питательной среды и рост их числа приводит к усилению эмбриогенного потенциала и интенсивности роста каллусных тканей. Иными словами, деградация и гибель ИОДК не оказывают отрицательного действия на процессы морфогенеза эмбриогенных тканей, а напротив, являются благоприятными и необходимыми для роста и эмбриоидогенеза в каллусной ткани, т. е. физиологически полезными. Последнее, как указывалось, характерно для процессов программированной гибели клеток или апоптоза. Исходя из этого мы сделали предположение о том, что обнаруженные в эмбриогенных каллусах интенсивно окрашенные деградирующие клетки представ-

ляют собой не что иное, как клетки с признаками программированной или физиологической гибели.

Целью данного исследования являлось выяснение вопроса о том, обладают ли ИОДК признаками программированной клеточной гибели или апоптоза. Для этого ИОДК были изучены различными методами световой и флуоресцентной микроскопии. Традиционно апоптоз выявляется сложными и дорогостоящими методами флуоресцентной микроскопии (акридин оранжевый, метод TUNEL) [1]. Одной из наших задач было на основе сопоставления данных световой и флуоресцентной микроскопии выявить цитоморфологические признаки программированной клеточной смерти в эмбрионных культурах растений, позволяющие легко их распознавать при помощи простых и доступных методов световой микроскопии.

Материалы и методы. Объектами исследования служили длительно культивируемые эмбрионные каллусные ткани, индуцированные из незрелых зародышей ячменя *Hordeum vulgare* и пшеницы *Triticum aestivum*, субкультивируемые в течение 5 лет на среде Мурасиге и Скуга (МС) [5] и Гамборга В5 [6] с высокими концентрациями 2,4-Д (5,0 и 7,0 мг/л, соответственно). Каллусные культуры инкубировали при температуре 26 ± 2 °С и субкультивировали каждые 30 дней.

Давленные цитологические и постоянные гистологические препараты готовили согласно Паушевой [7]. Для исследования ядерного материала давленные и постоянные препараты окрашивали ацетокармином [7] и реактивом Шиффа в сочетании с гематоксилином [8] соответственно. Для выявления особенностей цитоплазмы и клеточных стенок постоянные препараты подкрашивали алциановым синим [8] и азур-эозином по Романовскому [9]. Гистологические и давленные препараты изучали и фотографировали на микроскопе Polyvar.

Для выявления фрагментации ядерного материала и ДНК использовали методы флуоресцентной микроскопии, традиционно используемые для выявления апоптоза: окрашивание акридин оранжевым [1] и по методу TUNEL [10, 11]. TUNEL-метод заключается в проведении реакции ник-мечения 3'-концов молекулы ДНК. В итоге обнаруживаются фрагменты ДНК, образующиеся в результате межнуклеосомной фрагментации, катализируемой эндогенными эндонуклеазами. Препараты анализировали под флуоресцентным микроскопом Leica в области зеленого ($\lambda=530-570$ нм) и красного ($\lambda=620-750$ нм) свечения.

Для выявления уровня окислительно-восстановительных процессов проводили качественную оценку активности сукцинат-дегидрогеназы с использованием тетразолия синего [12].

Результаты и их обсуждение. Изучение давленных препаратов показало, что среди клеточных популяций эмбрионных каллусов резко выделяются интенсивно окрашенные деградирующие клетки, ранее упомянутые нами как ИОДК, которые имеют хорошо окрашенное ацетокармином содержимое (рис. 1, а). Размеры их в диаметре довольно крупные: от 30–50 мкм на ранних стадиях гибели до 60–80 мкм на терминальных этапах. Они значительно крупнее меристематических клеток (8–10 мкм) и компетентных эмбрионных клеток (12–20 мкм), ядра которых хорошо окрашиваются таким ядерным красителем, как ацетокармин (рис. 1, а, б, г). Но в отличие от этих клеток вся область цитоплазмы ИОДК окрашивается ацетокармином и реактивом Шиффа с гематоксилином, что свидетельствует о нарушении целостности ядра и о выходе ядерного материала в цитоплазму (рис. 1, а–г).

На более поздних стадиях деградации ИОДК протопласт, содержащий разрушенный ядерный материал сжимается, в результате чего между плазмалеммой и клеточной стенкой образуется периплазматическое пространство (рис. 1, г). На препаратах также видны пустые неокрашенные клетки, представляющие, по всей видимости, картину финальной стадии ПКС (рис. 1, г). В этих клетках наблюдаются уменьшение интенсивности окраски протопласта этих клеток и его сжатие вплоть до полного исчезновения.

Кроме того, у ИОДК утолщается клеточная стенка, что хорошо видно на давленных и постоянных препаратах (рис. 1 а–г). Это согласуется с данными литературы о том, что апоптозные клетки эмбрионных клеточных культур растений содержат утолщенные клеточные стенки [2, 13]. Следует отметить, что образование периплазматического пространства и сохранение целостности клеточной стенки вплоть до последних этапов гибели являются отличительными чертами апоптоза растений [2, 14]. У животных клеточная стенка отсутствует, поэтому апоптозная клетка сама по себе сжимается, фрагментируясь на апоптозные тела, без образования какого-либо периплазматического пространства [1]. Сохранение клеточной стенки вплоть до последних этапов гибели отличает апоптоз растений и от некроза – непрограммированной гибели, при кото-

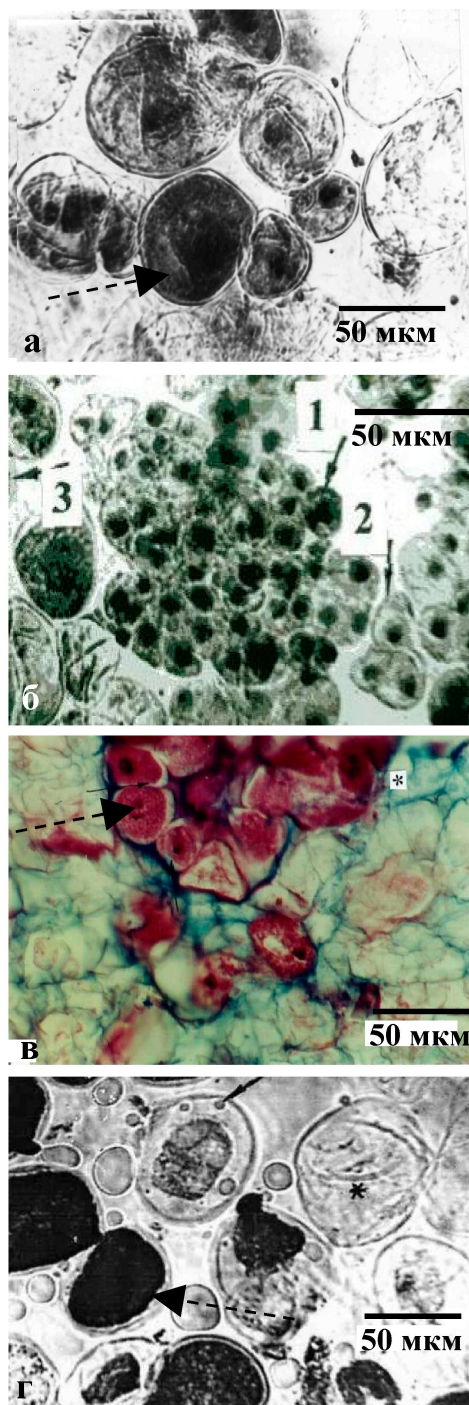


Рис. 1. Клетки с признаками ПКС в эмбрионных каллусах ячменя. ↑ – периплазматическое пространство, → – ПКС; а, в, г – окраска ацетокармином; б – окраска реактивом Шиффа в сочетании с гематоксилином

рой в первую очередь происходят разрыв клеточных стенок и лизис клеток [1].

Таким образом, методами световой микроскопии нами выявлено, что интенсивно окрашенные деградирующие клетки в эмбрионных каллусах имеют все морфологические характеристики, при-

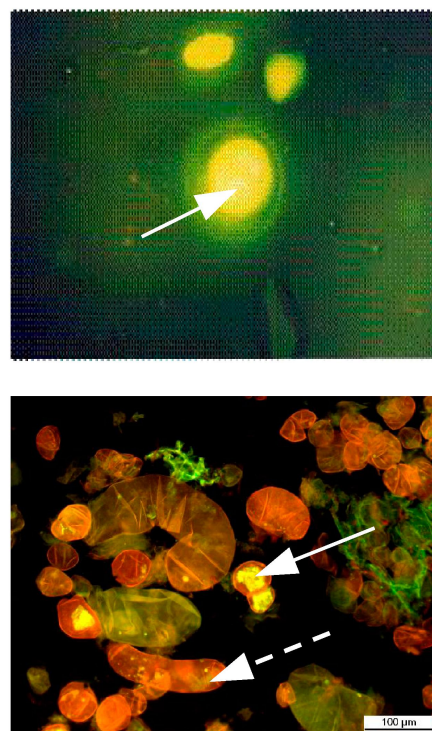


Рис. 2. Клетки с признаками ПКС в эмбрионных каллусах ячменя (окраска акридин оранжевым)
→ – клетки с признаками ПКС,
-- → – неапоптотические клетки

сущие клеткам с признаками программированной гибели [2, 12]: разрыв ядерной мембраны и выход ядерного материала в цитоплазму, сжатие цитоплазмы, образование периплазматического пространства и утолщение клеточной стенки (рис. 1, а–г). Исходя из этого мы классифицировали ИОДК как клетки с признаками программированной клеточной смерти.

Далее мы поставили перед собой задачу выявить признаки программированной гибели в ИОДК при помощи методов флуоресцентной микроскопии, традиционно используемых для выявления апоптотических клеток у животных и растений [3], и сопоставить их с полученными нами данными по световой микроскопии. Для выявления фрагментации ядерного материала и ДНК использовали окрашивание акридин оранжевым и по методу TUNEL [1].

При связывании с ДНК акридин оранжевый флуоресцирует в желто-зеленой области спектра, а РНК цитоплазмы – в красно-оранжевой области [1]. Поэтому при рассмотрении клетки, которая не вступила на путь апоптоза, флуоресценция в желто-зеленой области спектра наблюдается только в области ядра, а вся клетка флуоресцирует в красно-оранжевой области. В случае апоптотических клеток желто-зеленое свечение заполняет весь объем клетки, так

как ядерный материал при этом разрушается и ДНК оказывается в цитоплазме. При окрашивании давленных препаратов акридин оранжеевым мы наблюдали флуоресценцию в зеленой области во всем объеме клеток, что еще раз подтвердило полученные нами данные световой микроскопии о разрушении ядра и выходе его содержимого в цитоплазму (рис. 2).

Одним из характерных признаков апоптоза является межнуклеосомная фрагментация молекулы ДНК, которая происходит под действием эндонуклеаз, в результате чего образуются многочисленные разрывы нитей ДНК и множество ее 3'-концов. Их присутствие можно детектировать с помощью метода TUNEL, который заключается в ник-мечении 3'-концов молекулы ДНК. Ник-меченые концы затем выявляются с помощью флуоресцентного красителя. Для выявления ядерной ДНК в этих же препаратах был использован краситель пропидий йодид. На рис. 3 представлен фрагмент эмбрионного каллуса пшеницы, окрашенный пропидий йодидом. Исходя из того, что пропидий йодид окрашивает только ядерную ДНК, из данного рисунка следует, что в некоторых клетках ядра сильно увеличены и занимают практически весь объем клетки (рис. 3, а, в). Можно предположить, что эти клетки находятся на одной из стадий ПКС, когда объем ядра увеличивается, но еще без разрыва ядерной оболочки.

Некоторые клетки данного ЭКК положительно реагируют на ник-мечение, что указывает на фрагментацию нитей ДНК в этих клетках (рис. 3, б). Видимо, эти клетки, представляют собой раннюю стадию апоптоза, так как флуоресцентное свечение имеет небольшие размеры, что соответствует ядрам клеток, только вступившим на путь программированной клеточной гибели.

В эмбрионных каллусах ячменя и пшеницы мы наблюдали и другие типы TUNEL-положительной реакции клеток, когда окрашивание занимает весь объем клетки (рис. 3, г). Это явно свидетельствует о том, что все содержимое ядра находится в цитоплазме и подвергается фрагментации при помощи нуклеаз, т. е. фрагментация ДНК в эмбрионных культурах может происходить как на ранних, так и на более поздних стадиях гибели клеток. Обычно TUNEL-метод позволяет выявлять «ранние» апоптотические клетки с фрагментацией ДНК, у которых еще отсутствуют и слабо выражены морфологические изменения, характерные для апоптоза [1]. Это отличие может быть связано с тем, что в нашем случае

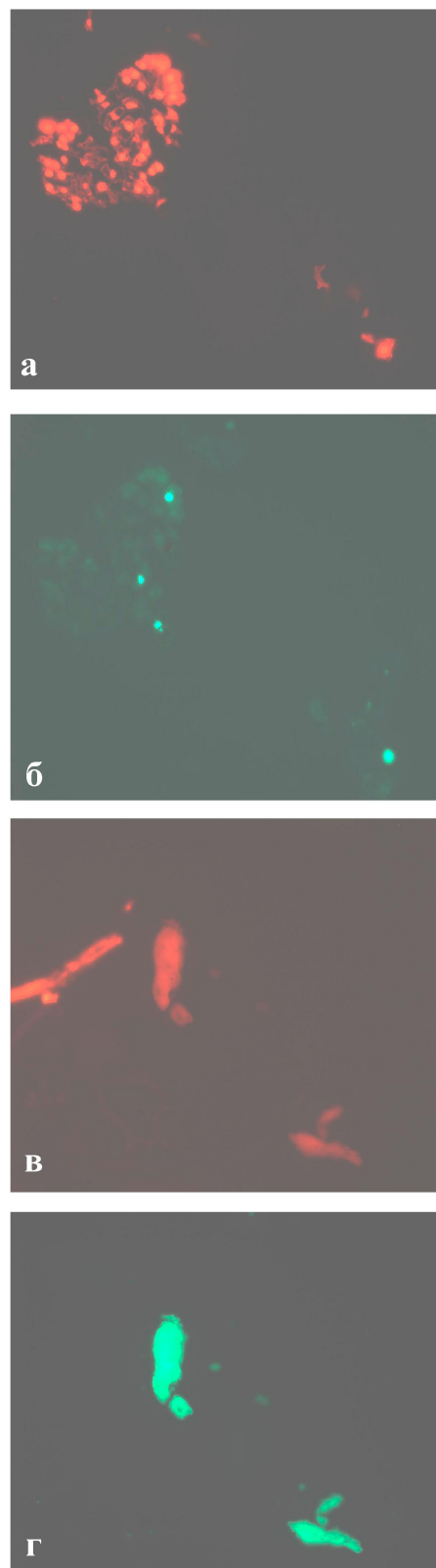


Рис. 3. Фрагменты срезов эмбрионных каллусов пшеницы (увеличение 1300x1030): а, в – флуоресценция ядер (пропидий йодид); б, г – флуоресценция межнуклеосомных фрагментов ДНК (TUNEL-метод)

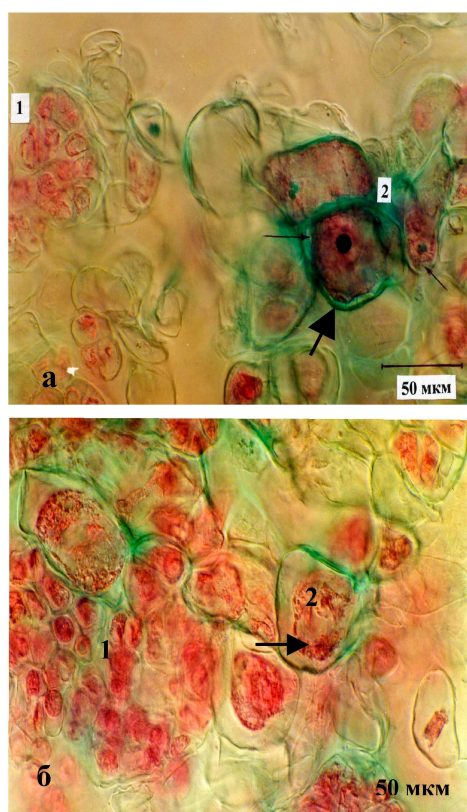


Рис. 4. Меристематические клетки и клетки с признаками ПКС (окраска азур-эозином по Романовскому): 1 – меристематические клетки; 2 – клетки с признаками ПКС
 → – пурпурная окраска протоплазмы клеток с признаками ПКС

клетки растительные, а не животные и принадлежат к специфическому эмбрионному типу тканей.

Помимо исследований ядерного материала клеток нами были выявлены некоторые особенности цитоплазмы и клеточных стенок с признаками ПКС в эмбрионных каллусах. Сравнительное изучение меристематических клеток и клеток с признаками ПКС показало различную степень окраски этих клеток азур-эозином по Романовскому (рис. 4). Известно, что азур-эозин относится к полихромным красителям, который окрашивает клеточные структуры в разные цвета: от красного (в случае ацидофильных структур) до пурпурного (в случае базофильных структур) [9].

При помощи азур-эозина нами обнаружено, что протоплазма ПКС клеток окрашивается в пурпурный цвет в отличие от меристематических клеток, где протоплазма окрашивается в светло-красный цвет, что свидетельствует об изменении pH протоплазмы от щелочной до кислой в процессе программированной гибели клеток (рис. 4, а, б). Это согласуется с литературными данными об изменении pH

цитоплазмы клеток животных в процессе программированной гибели в кислую сторону [1].

Кроме того, при использовании азур-эозина окраска клеточных стенок клеток с признаками ПКС резко отличается от таковой у меристематических клеток (рис. 4, а): у клеток с признаками ПКС она голубовато-синяя, а у меристематических красновато-коричневая, что может указывать на изменения в составе клеточных стенок.

Важной характеристикой апоптоза является то, что данный процесс энергозависимый и митохондрии в апоптотных клетках сохраняются вплоть до полного разрушения клетки [1], тогда как при некрозе одно из ранних событий – резкое снижение и последующее исчезновение активности окислительно-восстановительных ферментов. Индикатором окислительно-восстановительных процессов могут служить соли тетразолия, которые при взаимодействии с сукцинат-дегидрогеназой каталитически отщепляют водород от сукцината, в результате чего в местах локализации фермента откладывается пурпурно-синий формазан [12]. В экспериментах по качественной оценке активности сукцинат-дегидрогеназы на препаратах эмбрионных каллусов нами установлено, что цитоплазма меристематических клеток интенсивно окрашивается в пурпурно-синий цвет, что свидетельствует о высокой активности окислительно-восстановительных процессов, происходящих в этих клетках. Что касается клеток с признаками ПКС, то окраска данных клеток варьирует от интенсивной пурпурной до более светлой, что может указывать на различную степень активности сукцинат-дегидрогеназы или постепенное снижение активности данного фермента по мере деградации клеток.

Таким образом, с помощью методов световой микроскопии выявлено, что ИОДК клетки обладают характерными чертами клеток с признаками ПКС: разрушение ядерного материала и выход его в цитоплазму, конденсация цитоплазмы, наличие периплазматического пространства, утолщение клеточной стенки и увеличение размеров клеток, высокая активность окислительно-восстановительных процессов, изменение pH цитоплазмы в кислую сторону. Дополнительно, при помощи флуоресцентной микроскопии с использованием красителя акридин оранж и метода TUNEL установлены разрушение ядерного материала и фрагментация молекул ДНК в ИОДК клетках, являющиеся характерными признаками апоптоза.

Сравнение различных методов определения апоптоза показало, что простые доступные методы световой микроскопии более информативны по сравнению с дорогостоящими методами флуоресцентной микроскопии. Так, методы окраски акридин оранжевым и методом TUNEL хотя и являются маркерами апоптоза, но не позволяют получить картину различных этапов программированной гибели. Особый интерес представляет, на наш взгляд, метод обнаружения апоптических клеток методом окрашивания давленных препаратов ацетокармином. На препаратах, полученных этим методом, видны практически все характеристики и этапы программированной гибели (см. рис. 1).

Согласно данным литературы по исследованию ПКС в эмбрионных культурах клеток растений клетки с признаками ПКС характеризуются конденсированной цитоплазмой, наличием пространства между цитоплазмой и клеточной стенкой, утолщенной клеточной стенкой [3, 13, 15]. С помощью методов TUNEL и электрофореза ДНК доказано наличие межнуклеосомной фрагментации ДНК [13]. Однако эти работы не дают достаточно ясного представления о поведении ядра в процессе программированной гибели клеток. В нашей работе впервые для эмбрионных тканевых и клеточных культур растений методами световой (окраска ацетокармином) и флуоресцентной (окраска акридин оранжевым) микроскопии четко доказан факт разрушения ядра и выхода его содержимого в цитоплазму клеток с признаками ПКС. Кроме того, в отличие от указанных выше исследований нами показаны увеличение размеров клеток, изменение рН цитоплазмы в кислую сторону и высокая активность окислительно-восстановительных процессов в этих клетках.

Ранее нами выявлено, что ИОДК, классифицируемые нами теперь как клетки с признаками ПКС, встречаются только в эмбрионных культурах и их количество прямо коррелирует с эмбрионным потенциалом [4]. В неэмбрионных тканях клетки с признаками программированной гибели отсутствовали. Это наводит на мысль о важной роли ПКС в регуляции процессов роста и морфогенеза в эмбрионных тканевых и клеточных культурах растений. Выяснению роли программированной гибели клеток в процессе соматического эмбриогенеза и изучению ультратонкой организации клеток с признаками ПКС будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Работа выполнена в рамках проекта фундаментальных исследований «Изучение цитофизиологических закономерностей роста, дифференцировки и программированной гибели клеток в культуре тканей зерновых злаков» и гранта Президента РК для проведения научных исследований за рубежом. Автор выражает признательность д-ру Martin Dickman (Университет Небраска, США) за помощь в организации экспериментов по выявлению ПКС методом TUNEL.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. Киев, 1999. С. 181.
2. Drew M.C., He I.I., Morgan P.W. Programmed Cell Death and Aerenchyma Formation in Roots // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 123-127.
3. McCabe P.F., Levine A., Meijer P.J., Tapon, Pennel R.I. A programmed cell death pathway activated in cells cultured at low cell density // The Plant Journal. 1997. V. 12 (2). P. 267-280.
4. Бишимбаева Н. К., Денебаева М. Г., Амирова А. К., Рахимова Е. В. Особенности гистологического строения рыхлых эмбрионных каллусов ячменя (*Hordeum vulgare*) // Изв. НАН РК. Сер. биол. и мед. 2001. №1-2. С.7-14.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473 - 497.
6. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures // Physiol. Plant., 1968. V.15. P. 473-497.
7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М., 1988. 272 с.
8. Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Бот. журн. 1992. Т. 77, №4. С.93-96.
9. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных клеток. М., 1979. 155 с.
10. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // J. Cell Biol. 1992. V. 119. P. 493-501.
11. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // J. Immunol Methods, 1991. V. 139. P. 271-279.
12. Световая микроскопия в биологии / Под. ред. А. Лейсли. М., 1992. 462 с.
13. Pennell R.I., Janniche L., Scofield G.N., Booi H., de Vries S.C., Roberts K. Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis // J. Cell Biol. 1992. V. 119. P. 1371-1380.
14. Ванюшин Б.Ф., Шорнинг Б.Ю., Середина А.В., Александрюшкина Н.И. Влияние фитогормонов и 5-азациитидина на апоптоз у этилированных проростков пшеницы // Физиол. раст. 2002. Т. 49, № 4. С. 558-564.
15. Nomura K., Komamine A. Polarized DNA synthesis and cell division in cell clusters during somatic embryogenesis from single carrot cells // New Phytol. 1986. V. 104. P. 25-32.

Резюме

Жарықоптикалық микроскоп арқылы арпа және бидайдың эмбриогенді каллустарындағы қарқынды боялған клеткаларда бағдарламалы өлетін клеткаларға тән белгілер бар екені анықталды: ядроның бұзылуы және оның цитоплазмаға шығуы, периплазмалық кеңістіктің пайда болуы, клетка қабырғасының қалыңдауы, клеткалар көлемінің өсуі, тотығу-тотықсыздану үрдістерінің белсенділігінің жоғарылығы және цитоплазманың рН-ның қышқылдануы. Қосымша, акридин оранж және TUNEL әдісімен флуоресценттік микроскоп арқылы ядроның бұзылуы және ДНК молекуласының нуклеосом аралық фрагменттелуі байқалды, олар апоптозға тән белгілер болып саналады.

Summary

By the use of light microscopy it has been revealed, that intensively stained degraded cells of embryogenic calli have characteristic features of cells with signs of programmed cell death: destruction of a nuclear material and output in cytoplasm, shrinkage of cytoplasm, presence of periplasmatic space between the cytoplasm and the cell wall, thickened cell wall, increase of cells sizes, high activity of oxidative-reductive processes and decrease of cytoplasm pH. Additionally, destruction of nuclear material and internucleosomal fragmentation of DNA molecules, which are appeared to be a main attributes of apoptosis, has been revealed by the use of fluorescent microscopy and staining by acridine orange and according the TUNEL method.