

УДК 573.086.581.085

Н. К. БИШИМБАЕВА

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОГРАММИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ

Методами электронной микроскопии доказано, что деградирующие клетки обладают всеми известными ультраструктурными признаками, характерными для клеток с признаками программированной клеточной смерти (ПКС): сильная вакуолизация, увеличение размера ядра, маргинация ядерного материала, чашевидные инвагинации пластид, сохранение митохондрий до последних этапов деградации клеток и образование везикул, похожих на апоптозные тельца. Впервые показано, что для клеток эмбрионных каллусов с признаками ПКС характерны разрушение ядерной оболочки и выход ядерного материала в цитоплазму, отсутствие плазмодесм и выделение веществ в периплазматическое пространство и на поверхность клеток.

Хорошо известным цитоморфологическими признаками апоптоза клеток животных являются конденсация и маргинация хроматина, фрагментация цитоплазмы и ядра, сжатие цитоплазмы, фрагментация клетки на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым (апоптозные тельца) [1]. Программированная клеточная смерть (ПКС) у растений, так же, как у животных, сопровождается комплексом структурно-морфологических изменений в клетках: конденсацией хроматина [2], фрагментацией ДНК [3]. Вместе с тем у растений апоптоз может иметь и свои отличительные черты. Так, в отличие от животных происходит формирование гигантских вакуолей [4] и клеточные стенки, как правило, не исчезают и обычно составляют основу сосудистых пучков и аэренхимы [5]. Ранее нами было показано, что обнаруженные в эмбрионных каллусах интенсивно окрашенные деградирующие клетки (ИОДК) обладают всеми признаками, характерными для клеток с признаками ПКС [6]. В данной работе нами предпринято изучение ультраструктуры этих клеток в эмбрионных каллусных тканях зерновых злаков.

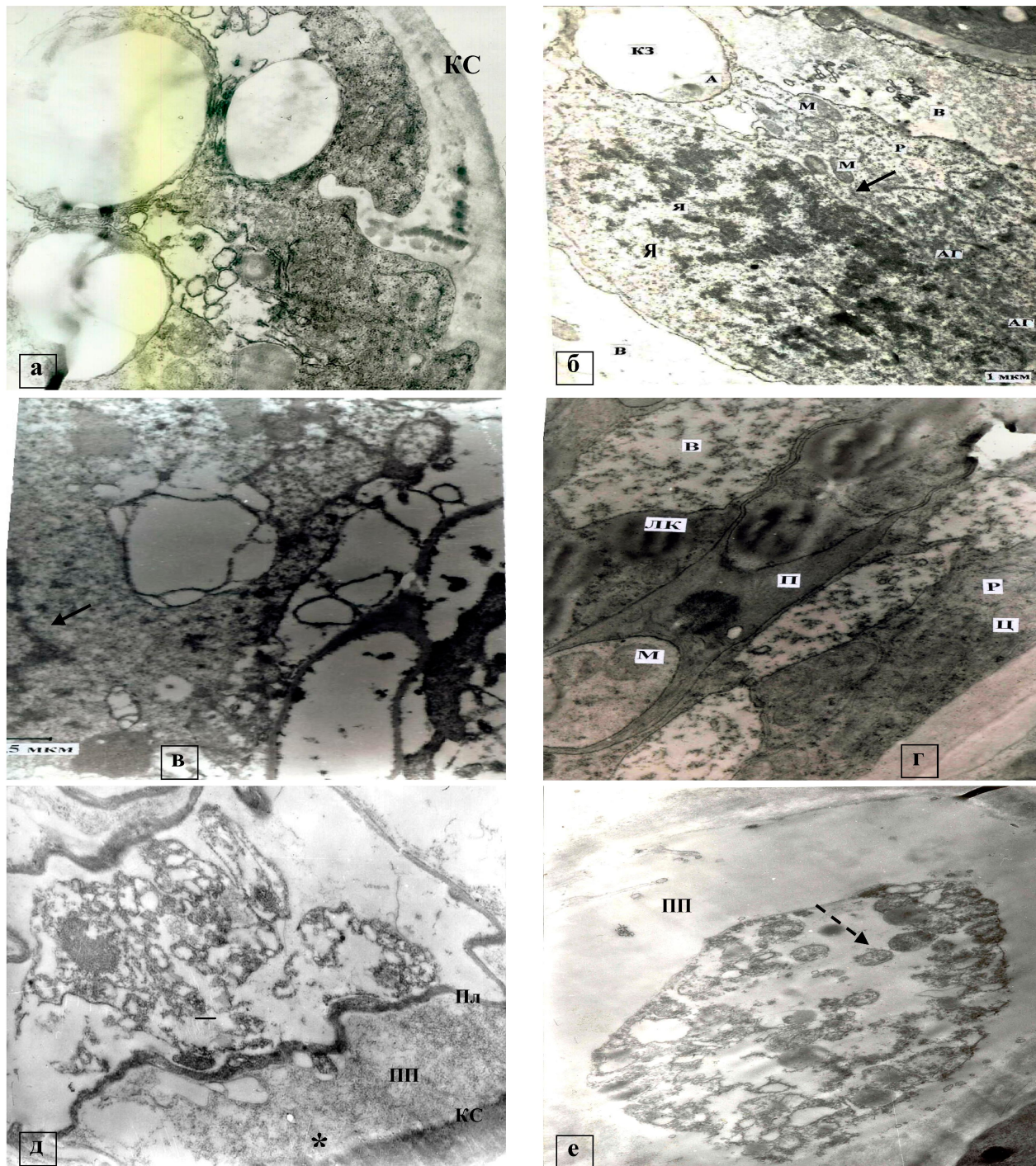
Материалы и методы. Объектами исследования служили эмбрионные каллусы (ЭК) ячменя и пшеницы. Для электронно-микроскопического исследования эмбрионные каллусы фиксировали в 2%-м растворе глутаральдегида (2,5 ч) и 1% тетроксиде осмия на какодилатном буфере (2 ч) и заключали в смесь эпон-аралдит. Материал контрастировали уранил-ацетатом [7]. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Reichert. Препараты исследовали и фотографировали при помощи трансмиссионного элект-

ронного микроскопа JEM-100B при разных увеличениях. Размеры ядер и клеточных органелл определяли по электронно-микроскопическим снимкам медианных срезов этих органелл.

Результаты и обсуждение. Электронно-микроскопическое исследование деградирующих клеток в ЭК пшеницы и ячменя показало, что они обладают всеми признаками, характерными для ультраструктуры клеток с признаками ПКС.

Вакуоль. Типичным для изучаемых нами деградирующих клеток ЭК каллусов пшеницы и ячменя является наличие крупных вакуолей, цитоплазма оттеснена к клеточной стенке и в ней наблюдаются мелкие вакуоли с пузырьками (см. рис., а). Часть вакуолей содержит разреженный осадок, в большинстве из них имеются пузырьки. Как известно, интенсивная вакуолизация клеток является одним из наиболее характерных признаков апоптоза и способствует автолизу клеток, их самоперевариванию [4].

Клеточная стенка. Отмечено, что клеточные стенки деградирующих клеток ЭК пшеницы и ячменя умеренной электронной плотности; иногда в них наблюдаются видоизменения, представленные ее инвагинациями (рис., а). Возможно, видоизменения клеточных стенок связаны с процессом фрагментации цитоплазмы [4]. Выявлено, что в клеточных стенках деградирующих клеток отсутствуют плазмодесмы (рис., а). Считается, что отсутствие плазмодесм и особенность апоптозной клетки сохранять целостность клеточной стенки до полной деградации, связывающих с соседними клетками, позволяет предотвратить возможность попадания содержимого цитоплазмы в окружающие клетки и исклю-



Строение клеток с признаками ПКС в эмбрионных каллусах.

а – видоизменения клеточной стенки у деградирующих клеток ячменя; б – маргинация ядра и частичное разрушение ядерной оболочки у деградирующих клеток ячменя; в – конденсированный хроматин в виде хрономем в цитоплазме плазмолизированных клеток при полном разрушении ядерной оболочки у деградирующих клеток пшеницы; г – чашевидные инвагинации пластид, заполненные цитоплазмой с митохондриями, рибосомами и липидами в деградирующих клетках пшеницы; д – отложение тяжей электронно-плотных веществ в периплазматическом пространстве у деградирующих клеток ячменя; е – образование фрагментов цитоплазмы в виде апоптотных телец, содержащих митохондрии и другие органеллы в деградирующих клетках ячменя. Ц – цитоплазма, Я – ядро, КС – клеточная стенка, В – вакуоль, П – пластиды, М – митохондрий, Р – рибосомы, АГ – аппарат Гольджи, ЛК – липидные капли, КЗ – крахмальные зерна, А – амилопласт, —> – конденсированный хроматин, - - > – апоптотные тельца, Пл – плазмалемма, ПП – периплазматическое пространство, * – отложение тяжей электронно-плотных веществ

чает процесс распространения воспаления, в результате чего происходит гибель только определенных клеток, генетически запрограммированных на смерть. Тогда как при некрозе происходит массовая гибель клеток, так как клетки здесь тесно взаимосвязаны между собой, и воспалительный процесс может быстро распространяться на соседние клетки через плазмодесмы, и, кроме того, в результате разрушения клеточных мембран содержимое клетки попадает в межклеточное пространство.

Ядро. Ядро описываемых клеток пшеницы и ячменя довольно крупное, в среднем $10,89 \times 8,88$ мкм, центральную позицию занимает редко, что, вероятно, связано с прогрессирующей вакуолизацией клеток (рис., б). Ядерная оболочка на срезах слегка волнистая, на наружной мембране отмечаются редкие рибосомы. Тип ядра хромонемный, что характерно для физиологически активных клеток. Конденсированный хроматин представлен длинными, высоко контрастными тяжами-хромонемами. Некоторые хромонемы контактируют с ядерной оболочкой, что характерно для явления маргинации ядра. Одним из характерных признаков начальных этапов апоптоза как у животных, так и у растений является маргинация ядра, т.е. смещение гетерохроматина к периферии ядра [8]. Это явление видно на электронно-микроскопических (рис., б) и гистологических препаратах (фото не представлено), при этом ядро приобретает форму серпа или полулуния, и в них четко видно ядрышко.

Ядрышко. Ядрышко крупное, в среднем $3,63 \times 2,55$ мкм, с ядрышковыми вакуолями (фото не представлено), присутствие которых считается одним из признаков, характерных для секреторных клеток [9]. В некоторых ядрах наблюдаются два ядрышка, одно из которых значительно крупнее второго ($2,64 \times 2,17$ и $1,85 \times 1,53$ мкм соответственно). Для деградирующих клеток характерно быстрое разрушение всех органелл, в том числе и ядра. Вначале происходит увеличение объема ядра и ядрышек, последние увеличиваются в числе (1–3). Затем наблюдаются разрушение ядерной оболочкой и выход ядерного материала в цитоплазму. При частичном разрушении ядерной оболочкой ядро с ядрышками выглядят интактными, а при полном разрушении ядерной оболочкой конденсированный хроматин в виде хромонем сохраняется в цитоплазме (рис., в).

Следует отметить, что данное явление – разрушение ядерной оболочкой и выход ядерного материала в цитоплазму описано нами впервые для деградирующих клеток по типу ПКС.

Рибосомы. Рибосомы в деградирующих клетках ЭК встречаются в значительном количестве. Они могут наблюдаться как в свободном состоянии, так и ассоциированные с цистернами эндоплазматического ретикулума (ЭР) на поверхности их наружных мембран (рис., г). Кроме того, часть рибосом встречается в виде полисомных агрегатов. У клеточной стенки описываемых клеток отмечены пузырьки, на наружной поверхности мембраны которых находятся прикрепленные рибосомы (так называемые «окаймленные пузырьки») (рис., в).

Аппарат Гольджи. Аппарат Гольджи представлен достаточно хорошо и состоит из 3–12 цис-терн, сложенных стопочкой и окруженных отчленяющимися от них пузырьками (рис., б). Необходимо отметить, что среди этих пузырьков не наблюдаются «окаймленные». Из продуктов запаса характерны довольно многочисленные липидные капли.

Эндоплазматический ретикулум. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) развит очень хорошо. Длинные и средней длины цистерны ЭР окутывают ядро, образуя так называемый ретикулярный чехол. Небольшие цистерны ЭР часто окружают вакуоли и митохондрии, иногда образуя контакты. В некоторых клетках трубочки и короткие цистерны ЭР формируют густую разветвленную сеть. Количество агранулярного ретикулума и соотношение агранулярных и гранулярных элементов сильно колеблется от клетки к клетке. Из литературы известно, что шероховатый ЭР участвует в синтезе гликопротеинов, гладкий ЭР – в синтезе терпеноидов и транспорте веществ внутри клетки [10].

Пластиды. Пластиды в деградирующих клетках ЭК характеризуются высокой полиморфностью своей формы. Наблюдаются пластиды гантелевидной и неправильной формы, для многих из них характерны чашевидные инвагинации (рис., г). В большинстве описываемых клеток пластиды крупных размеров (в среднем $3,19 \times 1,19$ мкм). Плотность стромы пластид выше, чем таковая митохондрий или цитозоля. У некоторых пластид не выражена двумембранная оболочка, а имеется лишь одна из мем-

бран. Также в некоторых пластидах отмечают проламеллярное тельце, зачатки ламеллярной системы или 1–2 мелкие пластоглобулы. Инвагинации органелл заполнены цитоплазмой с митохондриями, рибосомами и липидами. Такие удлиненные пластиды с инвагинациями найдены и в клетках с признаками ПКС в колеоптилях пшеницы [4]. Согласно выводам некоторых авторов [11, 12], выше описанные особенности строения характерны для пластид, встречающихся в секреторных клетках сосудистых растений и продуцирующих вторичные метаболиты – терпены и гликопротеины.

Митохондрии. Несмотря на активные процессы автолиза, деградирующие клетки ЭК обладают признаками высокой метаболической активности, что характерно для клеток с признаками ПКС. Хорошо развитый хондриом представлен митохондриями удлиненной формы, размером в среднем 1,38x0,40 мкм с длинными кристами, параллельными друг другу (рис., б, г). Матрикс митохондрий несколько плотнее, чем цитозоль. В митохондриях хорошо заметны миторибосомы, интрамитохондриальные гранулы отмечаются крайне редко. Постепенно митохондрии теряют свою правильную форму (средний размер 0,84x0,52 мкм), их матрикс просветляется, а кристы сильно укорачиваются и разбухают. Миторибосомы собираются в группы. В то же время нами выявлено, что в деградирующих клетках ЭК митохондрии сохраняются до последних этапов деградации клетки (рис., д, е). Длительное сохранение митохондрий в процессе гибели вполне объяснимо, поскольку ПКС – энергозависимый процесс, а митохондрии обеспечивают энергией клетку до последних этапов гибели. На рис., е отчетливо видно образование цитоплазматических образований в виде апоптозных телец – ограниченных мембраной фрагментов цитоплазмы, содержащих митохондрии, другие органеллы и включения, которые постепенно деградируют. Возможно, такая цитоплазматическая форма организации в виде апоптозных телец способствует длительной защите структуры и активности митохондрий в процессе физиологической гибели клеток [13].

Известно, что у животных апоптозные везикулы поглощаются соседними или специализированными клетками [1], у растений нет таких специализированных клеток. Более того, фагоци-

тозу препятствует наличие клеточной стенки. Апоптозные везикулы в дальнейшем разрушаются. И в конечном итоге остатки разрушенных клеток утилизируются другими клетками [1]. Однако каким образом происходят процессы деградации и утилизации апоптозных клеток у растений, до сих пор не установлено.

Фибриллярные вещества. Электронно-микроскопическое исследование позволило нам обнаружить выделение электронно-плотных веществ в периплазматическое пространство (рис., д) и на поверхность деградирующих клеток [14].

Таким образом, деградирующие клетки обладают всеми известными ультраструктурными признаками, характерными для клеток с признаками ПКС: сильная вакуолизация, увеличение размера ядра, маргинация ядерного материала, чашевидные инвагинации пластид, сохранение митохондрий до последних этапов деградации клеток и образование везикул, похожих на апоптозные тельца. Полученные данные представляют собой электронно-микроскопическое доказательство того, что гибель ИОДК клеток в эмбриогенных каллусах пшеницы и ячменя происходит по типу запрограммированной клеточной смерти.

Кроме того, нами впервые для эмбриогенных каллусов показано, что в деградирующих клетках с признаками ПКС отсутствуют плазмодесмы, происходит разрушение ядерной оболочки и выход ядерного материала в цитоплазму, выделяются вещества фибриллярной природы в периплазматическое пространство и на поверхность клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программируемая клеточная смерть, 2000 /<http://1.cellimm.bio.msu.ru/edocs/samuilov-2.html>. С. 31.
2. O'Brien I.E., Murray B.G., Baguley B.C., et al. Major Changes in Chromatin Condensation Suggest the Presence of an Apoptotic Pathway in Plant Cells // *Exp. Cell. Res.* 1998. V. 241. P. 46-54.
3. Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. Apoptosis in the cells of an initial leaf and coleoptile of wheat seedlings: internucleosomal fragmentation of genome and synthesis of heavy oligonucleosomal DNA fragments // *Biochemistry (Moscow)*, 1997. V. 62. P. 1008-1014.
4. Замятина В.А., Бакеева Л.Е., Александрушклина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у этиолированных проростков пшеницы. 1. Характерная ультраструктура апоптозной клетки // *Физиология растений*. 2002. Т. 49, №6. С. 828-838.
5. 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.

6. Бишимбаева Н.К. Обнаружение клеток с признаками программированной гибели в эмбрионных каллусных тканях пшеницы и ячменя // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. 2005.

7. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: Атлас. Л.: Наука, 1987. 103 с.

8. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // Успехи биол. Химии. 2001. Т. 41. С. 3-38.

9. Шубникова Е.А. Цитология и цитофизиология секреторного процесса. М., 1967. 116 с.

10. Васильев А.Е. Функциональная морфология секреторных клеток растений. Л.: Наука, 1977. 208 с.

11. Vassilyev A.E. Quantitative ultrastructural data of secretory epithelial cells in *Rhus toxicodendron* // Int. J. Plant Sci. 2000. V. 161, № 4. P. 615-630.

12. Колалите М.Р., Иванова А.Н. Особенности ультраструктуры пластид секреторных клеток растений // Труды II Международной конф. по анатомии и морфологии растений. СПб., 2002. С. 338-339.

13. Bakeeva L.E., Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., et al. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles // FEBS Letters. 1999. V. 457. P. 122-125.

14. Bishimbayeva N. K. A role for apoptosis and polysaccharides secretion in the long-term somatic embryogenesis of cereals. Proceedings of International Symposium "Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources" 26-31 May 2002, Yalta, Ukraine. Bull. of State Nikit. Bot. Gard. 2002. № 86. P. 47-52.

Резюме

Жойылатын клеткалар барлық танымал бағдарламалы өлетін клеткаларға тән ультрақұрылымдық белгілерімен сипатталатыны электронды микроскоп әдісімен дәлелденді: жоғары деңгейде вакуолденуі, ядроның көлемінің ұлғаюы, ядролық заттардың маргинациясы, тостағанша иілген пластидтер, митохондриялардың клетканың соңғы жойылу кезеңіне дейін сақталуы және апоптозды денелерге сәйкес везикулалардың түзілуі. Эмбриогенді каллустардың бағдарламалы өлу белгілері бар клеткаларына ядролық қабықшаның жойылуы және ядролық заттардың цитоплазмаға шығуы; плазмодесманың болмауы; периплазматикалық кеңістікке және клетканың сыртына заттардың бөлінуі тән екені алғаш рет көрсетілді.

Summary

By the use of electron microscopy it was proved that degrading cells have the all known ultrastructural signs of programmed cell death (PCD): strong vacuolization, increase of nucleus size, margination of nuclear material, plastids invaginations, presence of mitochondria up to the last stages of cells degradation and appearance of vesicles similar with apoptotic bodies. It was shown for the first time that release of nuclear material into the cytoplasm, absence of plasmodesmata and allocation of substances into the periplasmatic and extracellular space are the specific characteristics of embryogenic calli cells with signs of PCD.

Алматының филиалы НЦБ РК,
г. Алматы

Поступила 2.02.07г.