

КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ РАДІОЗАХИСНОЇ ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ НА ПРОРОСТКИ ГОРОХУ



Досліджували реакцію проростків гороху Pisum sativum L. на гамма-випромінювання в залежності від фази їх реакції на модифікуючу дію іонів кадмію. При аналізі стану проростків у динаміці за параметрами швидкості росту головного кореня і за проліферативною активністю клітин його апікальної меристеми встановлено, що існує зв'язок між значеннями цих параметрів та типом радіомодифікуючого ефекту. Радіозахисний ефект спостерігали при опроміненні проростків в дозі 5 Гр у завершальний момент фази надвідновлення ростової реакції на дію сульфату кадмію у концентрації 0,625 мкМ.

Вступ. В реальних умовах існування біологічні системи зазнають практично неперервної дії зовнішніх факторів, багато з яких є стресорами, тобто факторами, дози яких перевищують порогове значення стійкості конкретної біологічної системи. При цьому ефект кожного з цих стресорів проявляється на фоні впливу попереднього фактора, який може бути або адаптуючим, або дезадаптуючим. В першому випадку спостерігається підвищення стійкості біосистеми до дії наступних факторів (перехід системи у стан адаптованості). В другому випадку система знижує рівень своєї стійкості до наступних впливів. Значна кількість експериментальних даних свідчить про можливість посилювати чи послаблювати, а в загальному випадку, модифікувати стійкість біологічних структур до подальшої дії зовнішніх факторів різноманітної природи [1–6].

Ефективність дії другого за порядком впливу фактора (тест-доза) визначається фазою реакції (перехідного процесу) біологічного об'єкта, що індукується першим фактором, на яку припадає ця повторна дія. В загальному випадку реакція на дію стресора включає одну, кілька або всі наступні фази: інгібування (яке завершується в деяких випадках летальним ефектом), відновлення та надвідновлення (стан перевищення значення параметра дослідного варіанта відповідного параметра у контрольного). Через багатостадійність реакції біологічного об'єкта [7] і різнонаправленість дії стресора у відношенні різних параметрів, які характеризують стан цього об'єкта, не завжди можна зробити однозначний висновок щодо знака модифікуючого впливу фактора. Наприклад, стимуляція синтезу шокових білків в рослинних клітинах відбувається на фоні сповільнення протікання інших клітинних функцій, в тому числі при повній зупинці мітозу [8].

Відносно самого явища адаптації існує ще багато нез'ясованих питань. Точно невідома фаза відповіді на модифікуючий вплив, на яку припадає максимальна здатність протистояти тестуючій дозі, та відповідні механізми різних структурно-функціональних рівней біологічної системи, що беруть участь у забезпеченні адаптивної відповіді. Нез'ясованими залишаються також закономірності індукції чи стимуляції перехресної стійкості, тобто стійкості до одних факторів, що зумовлена дією інших за своєю природою факторів.

З метою перевірки можливості отримання перехресної стійкості в наших дослідженнях було вирішено дослідити здатність кадмію модифіку-

вати стійкість проростків до гострого гамма-опромінення. Головне завдання дослідження полягало у вивченні реакції проростків на дію гамма-опромінення в залежності від фази їх реакції на модифікуючу дію наявності іонів кадмію у середовищі. Аналізуючи стан проростків у динаміці за швидкістю росту головного кореня і за проліферативною активністю клітин його апікальної меристеми, ми сподівалися встановити зв'язок між рівнями значень цих параметрів та типом радіомодифікуючого ефекту, тобто між радіоадаптующим та радіодезадаптующим (знижующим рівень радіостійкості) ефектами.

Матеріали і методи. У дослідях використовували чотирьохдобові проростки гороху *Pisum sativum* L. сорту Зеленозерний. Насіння замочували і пророщували стандартним методом. Середня вихідна довжина проростків, які використовували у досліді, складала приблизно 35 мм. Проростки вирощували на водопровідній воді за умов природного освітлення та при температурі 16–18 °C. У відповідні варіанти досліді вносили сульфат кадмію у концентраціях 0,625; 1,25 та 2,5 мкМ. Попередні наші дослідження показали, що ріст рослин не залежав від присутності кадмію у розчині, якщо його концентрація не перевищувала 0,25 мкМ. Значне пригнічення росту відбувалося при концентрації іонів кадмію в середовищі 6 мкМ, а концентрація кадмію 25 мкМ незворотно пригнічувала ріст кореневої системи проростків гороху, викликаючи при цьому лізис головного кореня. Застосовані нами концентрації солі кадмію, при яких відбувалося пригнічення ростової реакції коренів проростків гороху, були нижчими порівняно з описаними в літературі даними, згідно з якими іони кадмію в концентраціях 4–50 мкМ пригнічували ріст коренів та індукували розвиток окислювального стресу [9, 10]. Контрольні рослини вирощували без внесення сульфату кадмію у середовище. Через 5 діб інкубації контрольні рослини та рослини, які вирощували з внесенням сульфату кадмію у середовище, опромінювали в дозі 5 Гр при потужності дози 6,4 сГр/с на кобальтовій гамма-установці «Исследователь». Довжину головних коренів проростків вимірювали з інтервалом у 24 год та розраховували їх відносну швидкість росту (ВШР) як відношення добового приросту головного кореня у дослідному варіанті до відповідного показника контрольного варіанта. Маючи зна-

чення ВШР для опромінених варіантів з попереднім вирощуванням проростків на розчинах сульфату кадмію та при його відсутності і відносячи першу величину ВШР до другої (контрольної), ми мали можливість оцінювати величину та знак радіомодифікуючого впливу сульфату кадмію. Отримане відношення відображали у відсотках. Якщо значення цього відношення перевищувало 100 %, то ми трактували це як факт радіоадаптующого впливу модифікатора, а якщо його значення було меншим за 100 %, то вважали, що має місце радіосенсибілізуюча дія сульфату кадмію. У подальшому ми будемо говорити про модифікуючу дію тільки кадмію, оскільки аніони сульфату у використаній концентрації не могли значно впливати на ростову активність коренів. Одночасно з вимірюванням довжини головного кореня відбирали фрагменти кореневих апексів довжиною 2–3 мм та фіксували їх у суміші Карнуа для визначення мітотичного індексу (МІ) в апікальних меристемах [11].

Результати досліджень і їх обговорення. При вирощуванні проростків гороху на різних концентраціях сульфату кадмію в динаміці ВШР їх головних коренів спостерігали два періоди стимуляції ростової активності, причому, якщо для мінімальної концентрації сульфату кадмію другий пік реєстрували на сьому добу інкубації, то для більш високих концентрацій повторне зростання ВШР починалося лише на 14-ту добу (рис. 1). Не вдаючись до більш детального аналізу динаміки ВШР, відзначимо, що присутність в середовищі катіонів кадмію виявилася в індукції складного хвилеподібного характеру реакції коренів на дію стресора з проходженням гіперкомпенсаторних (стимуляційних) фаз.

Важливо звернути увагу на те, що момент опромінення (п'ята доба інкубації) припадав на висхідну ділянку ВШР коренів, які росли на мінімальній концентрації сульфату кадмію, та на низхідні ділянки кривої ВШР коренів при більш високих концентраціях. При цьому всі три значення ВШР перевищували 100 %, тобто дослідні рослини за параметром ростової активності знаходились у фазі надвідновлення (стимуляції). Динаміка радіомодифікуючого впливу іонів Cd^{2+} у різних концентраціях відображена на рис. 2. Значний стійкий радіозахисний ефект мав місце при мінімальній з використаних нами концентрацій солі металу. Сульфат кадмію у більш високих

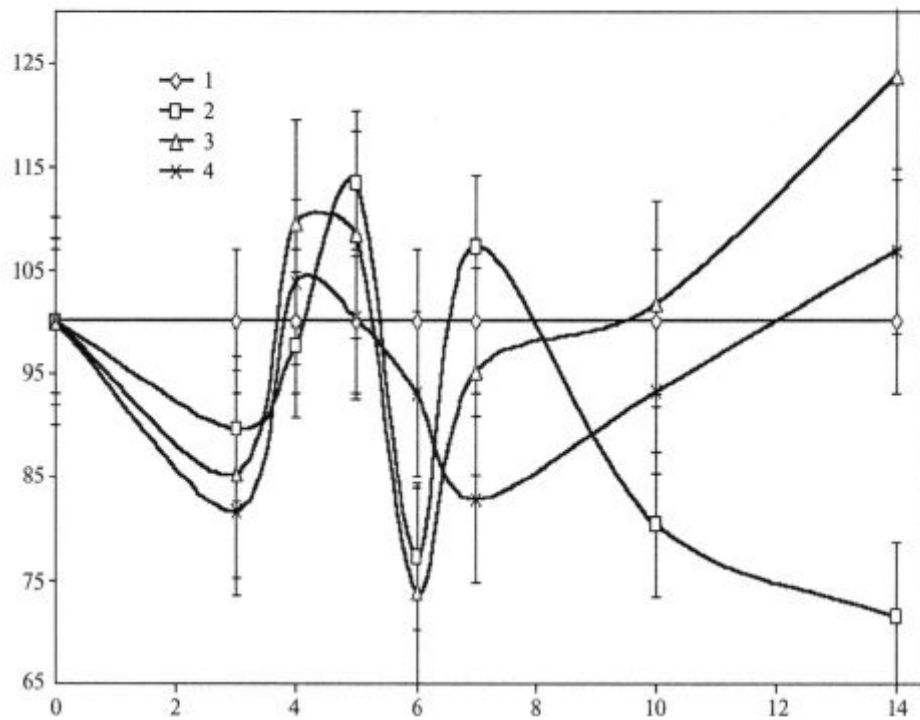


Рис. 1. Динаміка швидкості росту головного кореня проростків гороху (по вертикалі, проц. до контролю) в залежності від концентрації сульфату кадмію: 1 — контроль, 2 — 0,625 мкМ, 3 — 1,250 мкМ, 4 — 2,500 мкМ; по горизонталі — час спостереження, доба

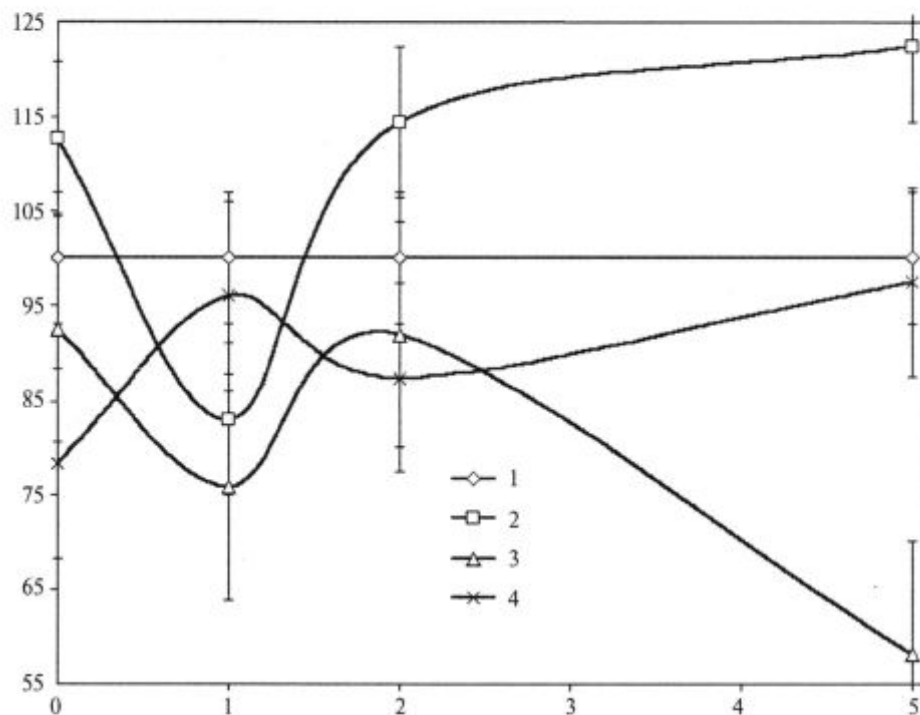


Рис. 2. Вплив різних концентрацій сульфату кадмію на відносну швидкість росту головного кореня проростків гороху (по вертикалі, проц. до опроміненого контролю): 1 — контроль, 2 — 0,625 мкМ, 3 — 1,120 мкМ, 4 — 2,500 мкМ; по горизонталі — час після радіаційної інкубації, доба

концентраціях мав виключно радіосенсибілізувальний вплив за параметром ВШР головного кореня.

Таким чином, виявилося, що при оцінці стану рослин у процесі їх взаємодії зі стресором за параметром ВШР (рис. 1) має значення не тільки зміна значень цього параметра відносно контролю (100 %), але й направленість тенденції його зміни. У даному експерименті ми спостерігали радіозахисний ефект при опроміненні проростків у завершальний момент фази стимуляції ВШР. Хоча через добу ВШР для концентрації сульфату кадмію, що здійснювала радіозахисний вплив, знову спадала нижче рівня контрольних значень, проте у момент опромінення апікальна меристема кореня, очевидно, ще знаходилася в стані підвищеної проліферативної активності, яка і забезпечила зростання радіорезистентності кореня. Іншими словами, радіозахисний ефект іонів кадмію неоднозначно пов'язаний з фазою стимуляції індукованого цим фактором перехідного процесу. Якщо остання визначається за динамічними параметрами (ВШР), то має значення також, у якій субфазі самої фази стимуляції дається тестуюча дія (висхідна чи низхідна ділянки). Якщо період

відновлення в порівнянні з інтервалом часу між найближчими вимірами довжини кореня (24 год в наших експериментах) складає кілька діб, то тест-опромінення в середині цього періоду, тобто в момент, після якого відновлення від токсичної дії кадмію ще продовжується, індукує радіозахисний ефект. Підтвердженням цього є дані, представлені на рис. 2. Момент опромінення відповідав п'ятій добі інкубації проростків в присутності іонів кадмію і, як ми зазначили вище, співпадав з фазою стимуляції швидкості росту головного кореня.

Досить ретельно вивчено радіомодифікуючу дію кадмію на насінні пшениці [12]. Була встановлена можливість радіозахисної дії при опроміненні дейтронами і швидкими нейтронами насіння, обробленого хлоридом кадмію. Виявилося, що ефект кадмію в значному ступені залежить від фази клітинного циклу. Це вказує на важливість прийняття до уваги наявності ендогенної циклічності для врахування можливості отримання відповідного ефекту модифікації. У своїх дослідженнях ми акцентуємо увагу на значенні фазового характеру спонтанної або індукованої проліферативної активності меристема-

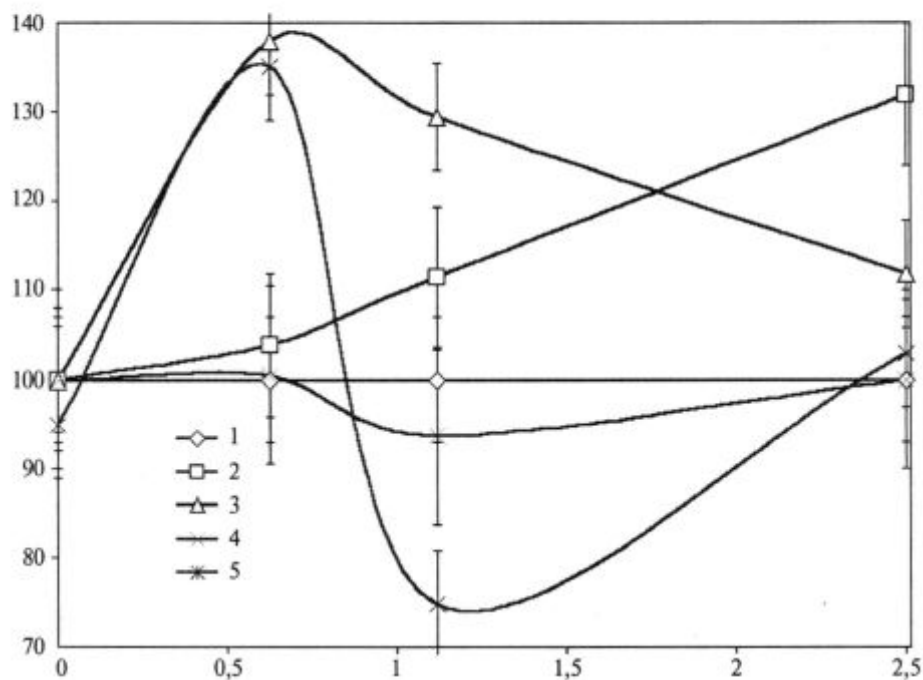


Рис. 3. Зміна мітотичного індексу (МІ) меристеми головного кореня проростків гороху (по вертикалі, проц. до контролю) під впливом сульфату кадмію та його сумісної дії з гострим гамма-опроміненням у дозі 5 Гр: 1 — вихідний МІ, 2 — МІ на четверту добу, 3 — МІ на п'яту добу, 4 — МІ на шосту добу, 5 — МІ на шосту добу при додатковому гамма-опроміненні; по горизонталі — концентрація сульфату кадмію, мкМ

тичних клітин у визначенні типу радіомодифікуючого впливу (радіоадаптуючого чи радіодезадаптуючого) кадмію на проростки.

Згідно з даними, представленими на рис. 3, у момент опромінення МІ меристематичних клітин головного кореня (швидкість росту якого фіксували паралельно) у всіх варіантах обробки перевищував контрольні значення. Між величиною МІ на момент опромінення і відповідною концентрацією іонів кадмію спостерігалася зворотна залежність, тобто максимальне значення МІ (137,9 %) відповідало мінімальній концентрації сульфату кадмію (0,625 мкМ). Саме для цієї концентрації був отриманий радіозахисний ефект за параметром ростової активності головного кореня. Величини МІ меристематичних клітин проростків, які росли при вищих концентраціях сульфату кадмію, також перевищували контрольні значення, проте в одному випадку (при концентрації 2,5 мкМ) МІ значно знижувався, а у другому випадку (1,25 мкМ) він не досягав максимального в даному досліді значення.

Значний радіозахисний ефект за критерієм мітотичної активності був отриманий для тієї ж концентрації сульфату кадмію, при якій спостерігали аналогічний ефект за параметром ростової активності головного кореня. Значення МІ для мінімальної концентрації сульфату кадмію значно зростало до моменту гострого гамма-опромінення (рис. 3). На цей момент ВШР головного кореня в даному варіанті досліду також була максимальною.

Одержані результати потребують відповіді на два основних запитання: по-перше, який з використаних параметрів дозволяє точніше прогнозувати можливість отримання радіозахисного (радіоадаптаційного) ефекту і, по-друге, яка роль стимульованої проліферативної активності в забезпеченні радіоадаптаційної відповіді.

Радіоадаптаційний ефект був отриманий при інкубації проростків в присутності 0,625 мкМ CdSO_4 . При цьому як ВШР головного кореня, так і МІ меристематичних клітин проростків в цьому варіанті обробки в момент опромінення мали максимальне значення серед відповідних параметрів інших варіантів. Інакше кажучи, такі показники, як ВШР та МІ, виявились в умовах даного експерименту практично рівнозначними, хоча не виключено, що величина МІ (при рівному інтервалі його оцінки з величиною ВШР) буде

більш оперативним показником, оскільки в більшій мірі відображає стан меристеми в момент опромінення.

Щодо значення проліферативної активності у формуванні радіоадаптивної відповіді, то необхідно розглянути роль фаз клітинного циклу в забезпеченні радіостійкості популяції клітин. Зокрема, показано, що розвиток радіоадаптивної відповіді залежить від фази клітинного циклу в момент адаптуючої дії [13]. Радіоадаптація не спостерігалася при опроміненні синхронізованих лімфоцитів в фазі G_0 , проте мала місце при дії на ці клітини в фазі G_1 (через 4–14 год після внесення фітогемаглютиніну (ФГА)) і в S-фазі та спостерігалася протягом трьох клітинних циклів (до 66 год) після стимуляції ФГА. Проте через 90 і 114 год ефект був уже відсутній. Оскільки на момент адаптуючої дії меристематичні клітини утворювали асинхронізовану популяцію, то в ній, очевидно, була субпопуляція клітин, які знаходились у «адаптабельній» фазі. Мабуть це клітини в S- та G_1 -фазах циклу. Враховуючи той факт, що опромінення прийшлося на момент стимуляції проліферативної активності меристематичних клітин, можна припускати участь двох механізмів, які забезпечили радіоадаптивний ефект іонів металу. З одного боку, цей ефект міг бути результатом прямого впливу кадмію на внутрішньоклітинні механізми адаптивної відповіді. У даному випадку, очевидно, слід говорити про стимуляцію репараційних систем клітини. Крім того, відомо, що толерантність рослин до важких металів, в тому числі до кадмію, зумовлена перш за все існуванням клітинних механізмів стійкості [14, 15]. Показано, що у формуванні стійкості рослинних клітин до кадмію можуть брати участь фітохелатини (ФХ), низькомолекулярні кадмій-зв'язуючі білки, органічні кислоти, металотіонеїни (МТ), білки теплового шоку (БТШ), глутатіон [14–20]. Як показано, захист від опромінення може зумовлюватися радіопротекторними властивостями МТ, активацією антиоксидантної системи глутатіона. Наприклад, у рослин ячменю показана індукція ФХ як під впливом іонів кадмію, так і при дії іонізуючого випромінювання [21]. У мишей відзначали кореляцію синтезу МТ з вираженим захисним ефектом попереднього введення іонів кадмію перед опроміненням [22]. Було показано, що індукція синтезу МТ іонами кадмію та дексаметазоном

захищала клітини HeLa і фібросаркоми від опромінення [23].

Захист від опромінення може бути пов'язаний з радіопротекторними властивостями МТ (інактивація вільних радикалів), участю в репарації ДНК, відновленням клітинних структур, стимуляції проліферації клітин в пострадіаційному періоді [23].

З іншого боку, факт зміни структури клітинної популяції, про що свідчить зміна МІ, передбачає наявність популяційного механізму забезпечення адаптивної відповіді, тобто, з участю процесів клітинної проліферації, які, перебуваючи у стимульованому стані, зумовлюють збільшення загальної кількості елементів (у даному випадку ферментів репарації) системи відновлення радіаційних пошкоджень. Одним з підтверджень такого припущення можуть бути результати досліджень Афанасьєва та ін. [24], які встановили, що найбільший внесок у процес відновлення швидкості синтезу ДНК у популяції опромінених клітин, разом із справжнім відновленням у кожній клітині, може вносити процес зміни структури клітинної популяції під впливом опромінення.

Таким чином, виявлено складний хвилеподібний характер реакції на дію катіонів кадмію у коренів проростків гороху за показниками швидкості росту головного кореня та мітотичного індексу, зокрема відзначено два піки стимуляції (надвідновлення) в динаміці цих показників. Показано, що радіозахисний ефект кадмію неоднозначно пов'язаний з фазою стимуляції, індукованої ним реакції (перехідного процесу) проростків гороху. Якщо остання визначається за динамічними параметрами (ВШР), то має значення також, у якій субфазі самої фази стимуляції дається тестуюча дія (висхідна чи низхідна ділянка при графічному представленні залежності параметрів тест-реакції від часу). Фазовий характер залежності величини мітотичного індексу від часу свідчить про зміну структури клітинної популяції і передбачає наявність репопуляційного механізму радіомодифікуючого впливу кадмію на проростки і забезпечення адаптивної відповіді. Одержані дані дозволяють припустити участь двох механізмів, які забезпечують радіозахисний ефект іонів металу — репараційного та репопуляційного.

SUMMARY. The reaction of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings on the test — action (gamma-radiation) depending on a phase of seedling reaction on modifying action of cadmium ions was investigated. The existence of correlation between growth rate of the seedling main root and proliferative activity of root apex meristem and the type of radiomodifying effect was established. Radioprotective (radioadaptation) effect was observed at the 5 Gy dose irradiation of the seedlings at the final moment of hypercompensatory phase of the growth reaction on the action of 0,625 мкМ CdSO₄.

РЕЗЮМЕ. Исследовали реакцию проростков гороха *Pisum sativum* L. на тест-действие (гамма-излучение) в зависимости от фазы реакции проростков на модифицирующее действие наличия ионов кадмия в среде. При анализе состояния проростков в динамике по скорости роста главного корня и по пролиферативной активности клеток его апикальной меристемы установлено, что существует связь между значениями этих параметров и типом радиомодифицирующего эффекта. Радиозащитный (радиоадаптирующий) эффект наблюдали при облучении проростков в дозе 5 Гр в завершающий момент фазы гиперкомпенсации ростовой реакции на действие сульфата кадмия в концентрации 0,625 мкМ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Генкель П.А. О сопряженной и конвергентной устойчивости растений // Физиология растений. — 1979. — 26, № 5. — С. 921–931.
2. Гикошвили Т.И., Вагабова М.Э., Виленчик М.М., Кузин А.М. Индуцируемая теплом и радиацией (перекрестная) радио- и термотолерантность в проростках *Zea mays* // Радиобиология. — 1985. — 2, вып. 6. — С. 806–809.
3. Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений. — Кишинев: Штиинца, 1988. — 768 с.
4. Месарович М., Такахара Я. Общая теория систем: математические основы. — М.: Мир, 1978. — 312 с.
5. Методы математической биологии. Кн. 7. Методы анализа и синтеза биологических систем управления. — Киев: Вища шк., 1983. — 272 с.
6. Shukla U. C., Joshi P. C., Kakkar P. Synergistic action of ultraviolet-B radiation and cadmium on the growth wheat seedlings // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2002. — 51, № 2. — P. 90–96.
7. Урманцев Ю.А., Гудсков Н.М. Проблема специфичности и неспецифичности ответной реакции растений на повреждающее воздействие // Журн. общ. биологии. — 1986. — 47, № 3. — С. 337–349.
8. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. — Л.: Наука, 1985. — 318 с.
9. Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants // J. Exp. Bot. — 2001. — 52, № 364. — P. 2115–2126.
10. Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) // J. Exp. Bot. — 2001. — 52, № 358. — P. 1101–1109.

11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
12. Мельничук Ю.П. Влияние ионов кадмия на клеточное деление и рост растений. — Киев : Наук. думка, 1990. — 148 с.
13. Москалева Е.Ю., Илюшина Н.А. Повреждение ДНК при действии ионизирующих излучений и их репарация. — М.: ВИНТИ, 1990. — С. 5–113.
14. Феник С.Й. Вивчення формування індукованих механізмів детоксикації іонів кадмію в культурі клітин *Nicotiana plumbaginifolia* : Автореф. дис. ...канд. біол. наук. — Київ, 1996. — 21 с.
15. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи соврем. биологии. — 1995. — 115, вып. 3. — С. 261–275.
16. Takagi M., Satofuka H., Amano S. et al. Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatin, expressed in Mammalian cells // J. Biochem. (Tokyo). — 2002. — 131, № 2. — P. 233–239.
17. Piqueras A., Olmos L., Martinez-Solano J. R., Hellin E. Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response // Free Radic. Res. — 1999. — Suppl. — P. 33–38.
18. Barque J. P., Abahamid A., Chacun H., Bonafy J. Different heat-shock proteins are constitutively overexpressed in cadmium and pentachlorophenol adapted *Euglena gracilis* cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1996. — 223, № 1. — P. 7–11.
19. Tripathi R.D., Rai U.N., Gupta M., Chandra P. Induction of phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (Lf.) role under cadmium stress // Bull. Environ. Contam. Toxicol. — 1996. — 56, № 3. — P. 505–512.
20. Czarnecka-Verner E., Yuan C.X., Fox P.C., Gurley W.B. Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean // Plant Mol. Biol. — 1995. — 29, № 1. — P. 37–51.
21. Данилин И.А., Дикарев В.Г. Индукция синтеза фитохелатинов малыми дозами гамма-облучения и ионами кадмия // IV съезд по радиац. исследованиям : Тез. докл. — М., 2001. — Т. 2. — С. 385.
22. Сморянова О.А., Ротт Г.М., Баранова О.А. и др. Содержание белков-металлотионеинов, изменение биомассы и выживаемости мышей после комбинированного воздействия кадмия и гамма-облучения // Там же. — С. 376.
23. Котеров А.Н., Филиппович И.В. Радиобиология металлотионеинов // Радиационная биология. Радиозкология. — 1995. — 35, вып. 2. — С. 162–180.
24. Афанасьев В.Н., Матилевич Н.П. Индукция репликативного синтеза ДНК в пролиферирующих клетках в ответ на гамма-облучение. Анализ методом проточной цитометрии // I Всесоюз. радиобиол. съезд : Тез. докл. — Пушино, 1989. — Т. 1. — С. 130–131.

Надійшла 29.01.01