

УДК: 575.2:57.04

Індукція ефекту свідка в кореневій меристемі проростків сої після γ-опромінення

О.Ю.Герман, О.В.Легостаєва, О.М.Бабука

Ефект свідка – виникнення радіаційних пошкоджень в інтактних клітинах за умови їхнього перебування в одному живильному середовищі чи поруч із опроміненими клітинами в момент дії опромінення, але не зазнавши його прямого впливу. Метою роботи є оцінка імовірних змін у мітотичній активності і хромосомному апараті клітин кореневої меристеми проростків інтактного насіння сої при пророщуванні його в спільному з опроміненим насінням водному середовищі. Досліджували мітотичну активність клітин кореневої меристеми проростків насіння сої *Glycine max* (L.) Mer. селекційних сортів Райдуга і Спритна, а також генномодифікованого сорту Аполло в нормі, після опромінення гамма-радіацією в дозі 40 Гр і після сумісного пророщування з опроміненим насінням в одному водному середовищі. Встановлено, що рівень стартового мітотичного потенціалу у селекційних сортів був приблизно однаковий, а в меристемі генномодифікованого сорту клітини ділилися інтенсивніше. Опромінення гамма-радіацією в дозі 40 Гр підвищує рівень мітотичної активності у всіх сортів, але у генномодифікованого сорту збільшення менш значне, що може бути пов'язане із високим рівнем мітотичної активності в нормі. Опромінення насіння гамма-радіацією в дозі 40 Гр сприяє появі клітин з хромосомними абераціями в меристемі проростків. Ступінь синхронізації клітин на лівній фазі мітотичного циклу в меристемі генномодифікованого сорту менший порівняно із селекційними сортами. При сумісному пророщуванні опроміненого в дозі 40 Гр і неопроміненого насіння відбувається індукція ефекту свідка за критерієм підвищення мітотичної активності: в меристемі проростків неопромінених «насінин-свідків» інтенсивність клітинних поділів вища за контроль. Ефект свідка не впливає на синхронність клітинних поділів. Таким чином, в роботі продемонстровано можливість формування ефекту свідка за умови пророщування опроміненого і неопроміненого насіння в спільному водному середовищі. Інтенсивність ефекту свідка залежить від генотипу і стартового мітотичного потенціалу.

Ключові слова: ефект свідка; мітотична активність; меристема; аберації хромосом; іонізуюче опромінення.

Induction of bystander effect in root meristem of soybean seedlings after γ-irradiation

O.Y.German, O.V.Legostaeva, O.M.Babyka

The bystander effect refers to the non-target effects of ionizing radiation and it is the occurrence of radiation damages in the cells that have not been exposed to direct action of ionizing radiation. The aim of the study is to investigate the possibility of forming the "bystander effect" during the germination of irradiated and intact seeds of some soybean *Glycine max* (L.) Mer. varieties in the common aquatic environment. The soybean seeds of the Raiduga and Sprytна varieties (obtained by selection) and the genetically modified Apollo variety had been exposed to γ-radiation at a dose of 40 Gy. The mitotic activity of the seedlings root meristem cells of irradiated (IR) and intact (IN) seeds, as well as intact seeds, which were germinated in the same aqueous medium together with irradiated (IN^{IR}), was analyzed. The similar levels of mitotic activity were observed in seedlings of breeding varieties in "IN" variant, while cells in genetically modified variety divided more intensively. Radiation exposure in a dose of 40 Gy increased the level of mitotic activity in all varieties. The values of the mitotic indices increased 2 times in the varieties of Raiduga and Sprytна. The increase in Apollo variety was less significant, but this may be due to a high level of mitotic activity in the control variant. Irradiation also contributed to the appearance of chromosomal aberrations: fragments and bridges. The increase in mitotic activity in the meristem of the studied varieties to the mentioned levels may indicate the presence of a pool of meristem cells that can accelerate the passage of phases of the mitotic cycle under extreme conditions. Mitotic activity increased in the "IN^{IR}" variant in all investigated varieties. The largest excess over the "IN" was in Sprytна, a little less in the variety Raiduga. The proliferative activity in the Apollo variety meristem remained almost unchanged. Thus, the work shows the possibility of a "bystander effect" forming under the condition of joint germination of irradiated and intact seeds in the common aquatic environment. The intensity of "bystander effect" formation depends on the genotype and start mitotic potential.

Key words: bystander effect; mitotic activity; meristem; chromosomal aberrations; ionizing irradiation.

Індукція ефекта свідателя в кореневій меристемі проростков сої після γ -облучення

Е.Ю.Герман, Е.В.Легостаева, О.Н.Бабыка

Ефект свідателя – виникнення радіаційних пошкоджень в інтактних клітках при умови їх перебування в одній питательній середі або поряд з облученими клітками в момент дії облучення, але не підвергнувшись йому прямому дію. Метою роботи є оцінка ймовірних змін у митотическій активності та хромосомному апараті кліток кореневій меристемі проростков інтактних насіння сої *Glycine max* (L.) Mer. при спільному пророщуванні їх в одній водній середі з облученими насіннями. Досліджували митотическу активність кліток кореневій меристемі проростков насіння сої селекційних сортів Радуга та Спритна, а також генномодифікованого сорту Аполло в нормі, після облучення гамма-радіацією в дозі 40 Гр і після спільного пророщування з облученими насіннями в одній водній середі. Встановлено, що початковий митотический потенціал у селекційних сортів знаходився на одній рівні, а в меристемі генномодифікованого сорту клітки ділилися з більшою інтенсивністю. Облучення гамма-радіацією в дозі 40 Гр підвищувало рівень митотическій активності у всіх сортів, але у генномодифікованого сорту збільшення було не настільки значущим, як у селекційних сортів. Облучення насіння в гамма-радіацією в дозі 40 Гр сприяє появі кліток з хромосомними абераціями в меристемі проростков. Степень синхронізації кліток на певній фазі митотического циклу в меристемі генномодифікованого сорту була менше порівняно з селекційними сортами. При спільному пророщуванні облучених в дозі 40 Гр та необлучених насіння відбувається індукція ефекта свідателя за критерієм митотическій активності: в меристемі проростков необлучених «насіння-свідателя» інтенсивність клітинних ділень вище, ніж в контролі. Ефект свідателя на синхронність клітинних ділень впливати не може. Таким чином, в роботі продемонстровано можливість формування ефекта свідателя в умови пророщування облучених та необлучених насіння в загальній водній середі. Інтенсивність ефекта свідателя залежить від генотипу та початкового митотического потенціалу.

Ключові слова: ефект свідателя; митотическа активність; меристема; аберації хромосом; іонізуюче облучення.

Вступ

Ефект свідка як біологічне явище був описаний у 1992 р. Х.Нагасавой і Дж.Б.Літлом і полягає у виникненні пошкоджень в інтактних клітинах, що знаходилися поруч із опроміненіми в момент впливу опромінення, але були екрановані від нього. Тобто неопромінені клітини є «свідками» нанесення променевого пошкодження іншим клітинам.

Схеми експериментів з індукції ефекта свідка включають як безпосередній контакт опроміненіх і неопроміненіх клітин, так і знаходження їх в одному і тому ж культуральному судині, а також контакт неопроміненіх клітин із середовищем, в якій інші клітини піддавалися опроміненню (Шеметун, Пілінська, 2007). Ефект свідка відноситься до немішених ефектів опромінення, хоча механізм його формування повністю не вивчений. Припускають існування двох шляхів передачі сигналу про радіаційне опромінення: через міжклітинні контакти і шляхом секреції деяких біологічно активних чинників у культуральне середовище.

Ефект свідка продемонстрований на ряді біологічних об'єктів (Кравец і др., 2009; Widela et al., 2015; Mothersill et al., 2019), на клітинному і організменому рівнях. Відомо, що в інтактних клітинах-свідках відбуваються генетичні зміни, такі як виникнення хромосомних мутацій (Karthik et al., 2019), зміни в експресії генів (Verma, Tikku, 2017), апоптоз (Marin et al., 2015). Подібні зміни впливають на безліч клітинних функцій, серед яких – здатність до поділу. Здатність клітин меристемі ділитися є основним механізмом, що забезпечує ріст і розвиток рослинного організму. Отже за допомогою цитогенетичного аналізу можливо оцінити ймовірні зміни в клітинах-свідках і зробити висновок про наявність або відсутність формування ефекта свідка, його інтенсивність.

Мета роботи – оцінити ймовірні зміни в митотическій активності і хромосомному апараті клітин кореневої меристемі проростків інтактного насіння сої при пророщуванні його в спільному з опроміненіми насіннями водному середовищі.

Методика

В роботі використовували насіння сої *Glycine max* (L.) Mer. сортів Радуга і Спритна, отриманих шляхом селекції в Інституті рослинництва імені В.Я.Юр'єва УААН, і

генномодифікованого сорту Аполло. Повітряно сухе насіння опромінювали гамма-радіацією Co^{60} в ХНУ імені В.Н. Каразіна дозою 40 Гр, яка, згідно з нашими попередніми дослідженнями, чинить стимулюючу дію на рослинний організм. В експерименті були варіанти:

1. К – контроль – неопромінене насіння.
2. 40 Гр – насіння, опромінене гамма-радіацією в дозі 40 Гр.
3. K_{40Gr} – режим ефекту свідка: спільне пророщування контрольного насіння і опроміненого дозою 40 Гр в одному водному середовищі.

Корінці проростків фіксували в оцтовому алкоголі (96% етиловий спирт – 3 частини; крижана оцтова кислота – 1 частина). Готували тимчасові давлені препарати, забарвлені за методикою Фьольгена. У кожному корінці переглядали близько 1000 клітин для визначення мітотичної активності. Також враховували кількість хромосомних мутацій (мости і фрагменти) в анафазі і телофазі мітозу.

Для кожного варіанту експерименту розраховували середнє арифметичне значення мітотичного індексу і похибку вибіркової частки. Переводили процентні долі у величини центрального кута. Для порівняння контрольної і експериментальної вибірок використовували F -критерій. Використовували двофакторний дисперсійний аналіз для оцінки впливу сорту насіння і пророщування в режимі ефекту свідка на мітотичну активність клітин кореневої меристеми проростків. Перевірку нульової гіпотези проводили на рівні значущості $p < 0,05$ (Атраментова, Утевська, 2007).

Результати і обговорення

Мітотична активність тканини являє собою відношення числа клітин, що знаходяться в мітозі, до загальної кількості клітин досліджуваної тканини. Цей показник відображає інтенсивність ростових процесів проростка і змінюється у відповідь на вплив численних агентів, серед яких є і іонізуюча радіація. Мітотична активність клітин меристеми проростків селекційних сортів Спритна і Райдуга знаходилась на одному рівні – 3,4–3,7 %, тоді як стартовий мітотичний індекс у генномодифікованого сорту Аполло був значно вищий – 5,1% (рис. 1).

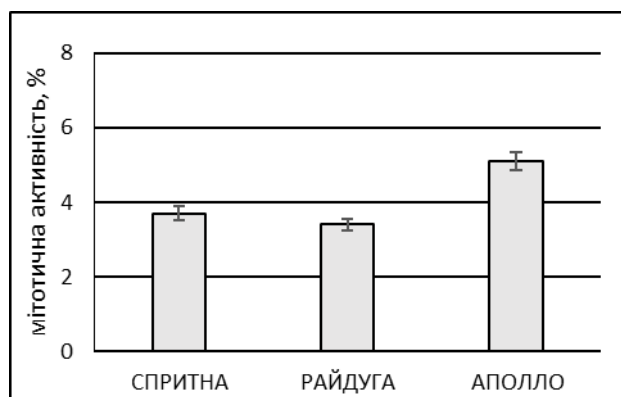


Рис. 1. Мітотична активність клітин меристеми проростків насіння досліджуваних сортів у нормі

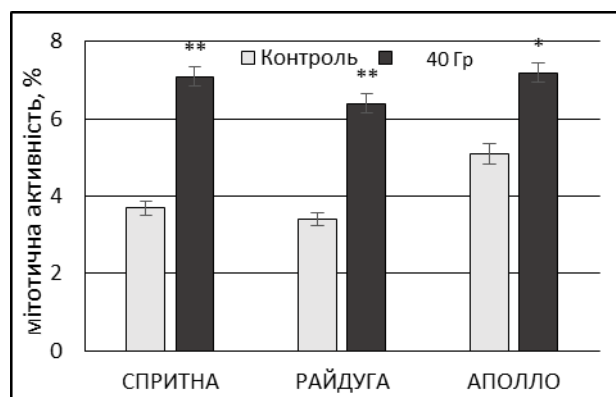


Рис. 2. Мітотична активність клітин меристеми проростків насіння досліджуваних сортів у нормі і після опромінення в дозі 40 Гр

* різниця між контролем і дослідом $p < 0,05$;
** різниця між контролем і дослідом $p < 0,01$.

Радіація в дозі 40 Гр сприяла підвищенню рівня мітотичної активності клітин меристеми усіх сортів (рис. 2). Вдвічі збільшилися значення мітотичних індексів у сортів Райдуга і Спритна. У сорту Аполло збільшення було менш значне, але це може бути пов'язане із високим рівнем мітотичної активності в нормі. Абсолютне значення мітотичного індексу в усіх сортів знаходилось на рівні 6,4–7,2 %. Підвищення мітотичної активності в меристемі досліджуваних сортів до вказаних рівнів може свідчити про наявність пулу меристемних клітин, які можуть прискорювати проходження окремих фаз мітотичного циклу в екстремальних умовах.

Відомо, що доза гамма-радіації 40 Гр стимулює ростові процеси в рослинному організмі: знімає фізіологічний спокій насіння, сприяє інтенсифікації фотосинтезу, транспорту, накопиченню метаболітів, поділу клітин, пришвидшує ростові процеси в організмі (Гудков, 2014). Найчастіше це відбувається за рахунок скорочення тривалості мітотичного циклу, проходження окремих фаз без перевірки генетичного матеріалу на цілісність, що призводить до накопичення хромосомних аберацій в клітинах, що були опромінені. В контролі, як і у варіанті K_{40Gr} , клітин з хромосомними мутаціями не було виявлено. У варіанті з опроміненням 40 Гр в меристемі селекційних сортів з'являлись поодинокі анафази з абераціями хромосом: фрагментами і мостами.

Наступний етап роботи полягав в визначенні змін у мітотичній активності меристеми насіння за умови пророщування його в одному водному середовищі з опроміненим насінням. Результати представлені на рис. 3. В усіх досліджуваних сортів спостерігали підвищення рівня мітотичної активності в варіанті « K_{40Gr} ». Найбільше перевищення над контролем було у сорту Спритна (37% від контролю, $p < 0,05$), трохи менше – 23% – у сорту Райдуга. Проліферативна активність у меристемі сорту Аполло варіанті « K_{40Gr} » була більша за контрольну на 9,0%.

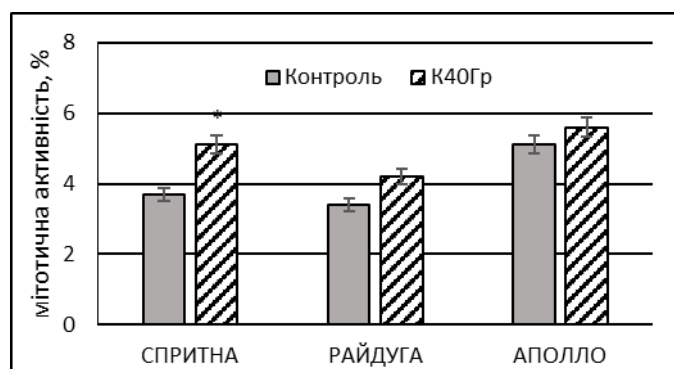


Рис. 3. Мітотична активність клітин меристеми проростків насіння досліджуваних сортів сої при спільному пророщуванні опроміненого і неопроміненого насіння

* різниця між контролем і дослідом $p < 0,05$.

Для меристем характерною є певна синхронність. В один і той же момент часу в популяції знаходяться клітини на різних стадіях мітотичного циклу. Чим більше клітин в популяції знаходиться в одній і тій же фазі, тим більше ця популяція є синхронною. Синхронність сприяє ритмічному поділу клітин і ліпшому росту і розвитку. Облік клітин, що знаходилися на ранніх і пізніх фазах мітозу, показав, що у селекційних сортів кількість про- і метафаз в меристемі була трохи вища, ніж у генномодифікованого сорту Аполло в усіх досліджуваних варіантах. Можна зробити висновок про більший ступінь асинхронізації в меристемі генномодифікованого сорту порівняно із селекційними сортами. Пророщування насіння всіх сортів у режимі « K_{40Gr} » не вплинуло на синхронність поділів.

Результати проведеного дисперсійного аналізу (табл. 1) свідчать, що на рівень мітотичної активності клітин кореневої меристеми проростків впливають обидва фактори: сорт насіння і пророщування в режимі ефекту свідка ($p < 0,05$).

Таблиця 1.

Дисперсійний аналіз впливу сорту і сумісного пророщування опроміненого і неопроміненого насіння в спільному водному середовищі на мітотичну активність клітин меристеми проростків насіння сої

Фактор	SS	df	MS	F експ.	p	F крит.
Режим ефекту свідка	3,55	1	3,55	4,84	0,048	4,75
Сорт	7,16	2	3,58	4,88	0,028	3,89

У 2000-х рр. було висловлено припущення про передавання ефекту від радіаційної дії між організмами, якщо вони знаходяться у спільному водному середовищі (Mothersill, Seymour, 2002; Кравец и др., 2009). Збільшення мітотичної активності в меристемі проростків неопроміненого насіння, що пророщується в одному водному середовищі разом з опроміненим (рис. 3), дозволяє судити про формування ефекту свідка на рівні організму.

Згідно з літературними даними (Котеров, 2011), ефект свідка буває таким, що не лише ушкоджує (передавання сигналу, який спричинює нестабільність геному, появу ушкоджень ДНК, явище апоптозу і тому подібне), але і стимулюючим (передавання сигналу до адаптивної відповіді і гормезису). Підвищення рівня проліферації клітин у варіанті «К_{40Гр}», що спостерігали в експерименті, зазвичай характерне для дії малих, стимулюючих доз радіації.

Передавання ефекту свідка можливе як при безпосередньому контакті опромінених і неопромінених клітин (через щільні міжклітинні контакти), так і через медіатори, що виділяються в культуральне середовище. При пророщуванні опроміненого і неопроміненого насіння в одному водному середовищі передавання радіаційного ефекту, очевидно, здійснюється деякими медіаторами, якими можуть бути, наприклад, активні форми кисню (Rozhko et al., 2019), гормони (цитокініни і ауксини). Концентрація і спектр речовин, що виділяються у водне середовище при проростанні опроміненого в дозі 40 Гр насіння, виявилися достатніми для формування ефекту свідка у неопроміненого насіння, але інтенсивність цього ефекту залежить від генотипу сорта і дози опромінення.

Висновки

В роботі показана можливість формування ефекту свідка на організменому рівні в умовах спільного пророщування опроміненого і неопроміненого насіння в одному водному середовищі.

1. Стартовий мітотичний потенціал генномодифікованого сорту Аполло вищий, ніж у селекційних сортів Спритна і Райдуга.

2. Радіація в дозі 40 Гр підвищує рівень мітотичної активності у всіх сортів, у сорту Аполло збільшення було менш значне, що може бути пов'язане із високим рівнем мітотичної активності в нормі.

3. Ступінь синхронізації клітин на певній фазі мітотичного циклу в меристемі генномодифікованого сорту менший порівняно із селекційними сортами. Ефект свідка не впливає на синхронність поділів.

4. Підвищення мітотичної активності клітин меристеми проростків неопроміненого насіння при його сумісному пророщуванні з опроміненим в дозі 40 Гр є наслідком формування ефекту свідка, інтенсивність прояву якого залежить від генотипу сорту.

Подяки

Автори висловлюють подяку співробітниці Центру генетичних ресурсів рослин України Інституту рослинництва імені В.Я.Юр'єва УААН к.с.-г.н. Н.О.Вус і керівнику незалежної випробувальної лабораторії «Агроген НОВО» к.б.н. В.М.Попову за люб'язно надані зразки насіння сої, співробітникам кафедри молекулярної та медичної біофізики ХНУ імені В.Н.Каразіна доц., к.ф.-м.н. О.А.Горобченко, с.н.с., к.ф.-м.н. О.Т.Ніколову за опромінення насіння.

Список літератури / References

Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. – Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2007. – 288с. /Atramentova L.O., Utevska O.M. Statistical methods in biology. – Kharkiv: V.N.Karazin Kharkiv National University, 2007. – 288p./

Гудков И.Н. Радиационная стимуляция растений // Материалы Международной научно-практической конференции «Микроэлементы и регуляторы роста в питании растений: теоретические и практические аспекты». – Ульяновск, 2014. – С.27. /Gudkov I.N. Radiation stimulation in plants // Materials of the International scientific-practical conference "Microelements and growth regulators in plant nutrition: theoretical and practical aspects." – Ulyanovsk, 2014. – P.27./

Котеров А.Н. Перспективы учета «Эффекта свидетеля» при оценке радиационных рисков // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2011. – №1 (5). – С. 7–19. /Kotero A.N. Prospects for taking into account the "Bystander effect" in assessing radiation risks // Biomedical Problems of Life. – 2011. – No.1 (5). – P. 7–19./

- Кравець А.П., Венгжен Г.С., Гродзинский Д.М. Эффекты дистанционного взаимодействия облученных и необлученных растений // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т.49, №4. – С. 490–494. /Kravets A.P., Wengzhen G.S., Grodzinsky D.M. Effects of the remote interaction of irradiated and unirradiated plants // Radiation Biology. Radioecology. – 2009. – Vol.49, no.4. – P. 490–494./
- Шеметун О.В., Пілінська М.А. Радіаційно-індукований «ефект свідка» // Цитология и генетика. – 2007. – Т.41, №4. – С. 66–71. /Shemetun O.V., Pilinska M.A. Radiation-induction "bystander effect" // Cytology and Genetics. – 2007. – Vol.41, no.4. – P. 66–71./
- Karthik K., Vasumathy R., Badri N.Pandey et al. Primary and secondary bystander effect and genomic instability in cells exposed to high and low linear energy transfer radiations // International Journal of Radiation Biology. – 2019. – Published online: 09/17/2019.
- Marin A., Martin M., Linan O. et al. Bystander effects and radiotherapy // Rep. Pract. Oncol. Radiother. – 2015. – Vol.20 (1). – P. 12–21.
- Mothersill C., Seymour C. Relevance of radiation-induced bystander effects for environmental risk assessment // Radiats. Biol. Radioecol. – 2002. – Vol.42, no.6. – P. 585–587.
- Mothersill C., Rusin A., Seymour C. Relevance of non-targeted effects for radiotherapy and diagnostic radiology: a historical and conceptual analysis of key players // Cancers (Basel). – 2019. – Vol.11 (9). – pii: E1236.
- Rozhko T.V., Nogovitsyna E.I., Badun G.A. et al. Reactive oxygen species and low-dose effects of tritium on bacterial cells // Journal of Environmental Radioactivity. – 2019. – Vol.208–209. – Article 106035.
- Verma N., Tiku A.B. Significance and nature of bystander responses induced by various agents // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2017. – Vol.773. – P. 104–121.
- Widela M., Lalika A., Krzywona A. et al. The different radiation response and radiation-induced bystander effects in colorectal carcinoma cells differing in p53 status // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2015. – Vol.778. – P. 61–70.

Представлено: Н.О.Вус / Presented by: N.O.Vus
Рецензент: В.Ю.Страшнюк / Reviewer: V.Yu.Strashnyuk
Подано до редакції / Received: 23.09.2019

Про авторів: О.Ю.Герман – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, elenagerman2009@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8753-2143>

О.В.Легостаєва – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, lenochek1231@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3601-2447>

О.М.Бабука – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, oksanababika@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8803-6352>

About the authors: O.Y.German – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, elenagerman2009@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8753-2143>

O.V.Legostaeva – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, lenochek1231@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3601-2447>

O.M.Babyka – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, oksanababika@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8803-6352>

Об авторах: Е.Ю.Герман – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, elenagerman2009@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8753-2143>

О.В.Легостаева – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, lenochek1231@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3601-2447>

О.М.Бабука – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, oksanababika@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8803-6352>