

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРОРОСТКОВ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

© 2023 г. Л.А. Минасбекян*,#, И.А. Авагян*

*Научно-исследовательский институт биологии Ереванского государственного университета,
ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения

#E-mail: minlia@ysu.am

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Исследовано влияния γ -излучения в дозах 50 Гр и 100 Гр на радиочувствительность клеточных ядер проростков семян мягкой карликовой пшеницы. Определены изменения биохимического состава ядерных фракций проростков облученных семян пшеницы под воздействием γ -излучения. Под действием ионизирующего излучения в растворимой ядерной фракции наблюдалось повышение общего содержания белка и нуклеиновых кислот, а в ядерной мембране — увеличение содержания ДНК и белка. Обнаружено также падение величины ζ -потенциала изолированных ядер проростков облученных семян в градиенте электростатического поля. Изменения в поверхностном заряде ядер ведут к нарушению их функциональной активности, поскольку поверхностный заряд ядер необходим для нормального функционирования и регулирования ядерно-цитоплазматического транспорта макромолекул. Воздействие излучения вызывает разрушение ионогенных групп молекул ядерной мембраны, в результате чего происходит уменьшение электроотрицательности ядер, что, в свою очередь, влечет за собой изменение функциональной активности ядра. Полученные результаты указывают на прямую зависимость изменений в электроотрицательности и в содержании ядерных фракций от дозы ионизирующего излучения. Можно заключить, что ионизирующее излучение в диапазоне от 50 до 100 Гр оказывает благоприятное воздействие на метаболическую и пролиферативную активность клеток мягкой пшеницы.

Ключевые слова: биохимический состав ядерной мембраны, биохимический состав растворимой ядерной фракции, проростки семян пшеницы, электроотрицательность, ζ -потенциал, γ -облучение.

DOI: 10.31857/S0006302923030171, EDN: FSROSQ

На сегодняшний день в сельском хозяйстве при предпосевной обработке для защиты семян от патогенов и стимулирования их всхожести и роста чаще всего используют различные химические препараты. Однако такая обработка ведет к изменению химического состава и продуктивности обрабатываемых культур, поэтому разрабатываются новые подходы с применением физических методов воздействия, такие как магнитное поле, микроволновое излучение, ультрафиолетовое излучение, «холодная» (низкотемпературная) плазма, ионизирующее излучение (ИИ), ультразвук, импульсное электрическое поле [1, 2]. Физические методы перспективны для предпосевного облучения семян, поскольку способны вызывать радиационный мутагенез. В то же время при

определенных дозах ИИ формируют эффект радиационного гормезиса [3, 4]. Вопрос безопасности их использования, предусматривающий нормы радиационной безопасности и использование определенных видов ионизирующих источников излучения (НРБ-99/2009) [5], а также подбора оптимальных доз облучения в каждом случае требует широкомасштабного исследования. К тому же недостаточный уровень знаний о биохимических и физических процессах, происходящих в семенах в результате их обработки, препятствует широкому использованию физических технологий.

Воздействие ИИ на живые организмы происходит в несколько последовательных этапов. Непосредственно при облучении семян, за доли секунды происходит поглощение энергии на физическом уровне, далее следуют разрывы химических связей, изменение свойств повре-

Сокращения: ИИ — ионизирующее излучение, ЭКП — электрокинетический потенциал, NLS — сигналы ядерной локализации (nuclear localization signals).

жденных молекул и химического состава клетки. Однако повреждения клеток на молекулярном уровне пока менее изучены и требуют детального исследования. Сравнительные исследования облучения цитоплазмы и ядра показали более высокую радиочувствительность ядра, что и явилось основанием для наших исследований: определение электроотрицательности изолированных ядер, а также исследования биохимических изменений ядерной мембраны и содержимого ядра. Очевидно, что для каждого организма существует определенный оптимальный уровень ζ -потенциала ядра в клетке, формирующийся благодаря поверхностному заряду ядра в среде. Для нормального функционирования ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке электроотрицательность ядра имеет важное значение в реакции клетки и всего организма на действия разных факторов, как экзогенных, так и эндогенных, и определяется посредством измерения электрокинетического потенциала ядра в электростатическом поле [6–8].

Более того, под воздействием низких доз ИИ происходят изменения экспрессии более чем в 500 генах проростков риса и грецкого ореха [9, 10], что является адаптивной реакцией растений на малые дозы стресса. Под воздействием ИИ в растениях изменяется метаболизм углеводов и белков [11, 12], а в митохондриях и хлоропластах синтезируются активные формы кислорода, контролирующие экспрессию генов и активность систем антистресса [10, 13, 14]. Однако при высоких концентрациях молекулы активных форм кислорода сами могут являться источником генотоксического стресса для растительной клетки. Как результат такого воздействия, при низких дозах ИИ происходит подавление всех физиологических процессов и развития растения, определяющих скорость роста. Высокие дозы и длительное воздействие ИИ может негативно сказаться не только на интенсивность роста, но и привести к гибели растения [14, 15]. Таким образом, активные формы кислорода, синтезируемые в митохондриях и хлоропластах растительных клеток под действием облучения, играют не только сигнальную роль в клетке, воздействуя на биомолекулы, входящие в ее состав, но и модулируют поверхностный заряд ядерной мембраны.

Как известно, ядерная мембрана представляет собой двойную мембрану липидного бислоя, пронизанную насквозь крупными белковыми комплексами — так называемыми комплексами ядерных пор (nuclear pore complex — NPC), контролирующими избирательную проницаемость ядерно-цитоплазматического транспорта [16]. Сам комплекс состоит из более чем 30 видов белков, так называемых нуклеопоринов, богатых гидрофобными незаряженными фенилаланин-глициновыми повторами [16, 17]. Каждый ком-

плекс ядерных пор соединен с внутренней и внешней ядерными мембранами, образуя центральный канал с внешним диаметром 122 нм и внутренним диаметром 70 нм [18]. Разнообразные белки, факторы транскрипции, гистоны и регуляторы клеточного цикла, могут преодолеть этот барьер только при наличии сигнала ядерной локализации (nuclear localization signals — NLS). Сигналы ядерной локализации содержат на концах локусы положительно заряженных аминокислот, таких как аргинин, лизин, гистидин [18, 19], что делает их биодоступными для отрицательно заряженного ядра, и этот факт еще раз подтверждает важность электрического заряда на поверхности ядра для осуществления ядерно-цитоплазматического транспорта [20, 21].

Целью данного исследования было изучение воздействия γ -облучения на изменения электроотрицательности изолированных клеточных ядер проростков семян мягкой пшеницы, а также воздействия на биохимический состав фракций ядра: ядерную мембрану и растворимую ядерную фракцию. Обсуждается коррелятивная зависимость электрокинетического потенциала (ЭКП) ядер от изменений в биохимическом составе фракций ядра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обработка и проращивание семян. В качестве объекта исследований использованы семена мягкой пшеницы *Triticum aestivum* сорта Amby ($d_1D_2D_3$; $ch_{1r}Ch_{2r}$), содержащей гены гибридной карликовости и красного хлороза. Гибридную депрессивность пшеницы особенно трудно преодолеть в случаях сочетания сильных аллелей. По мнению некоторых авторов, наиболее действенным методом преодоления депрессии у сильно-некротических гибридов (F_1) является облучение радиоактивным изотопом кобальта (Co^{60}). Кобальт-60 является наиболее долгоживущим из радиоактивных изотопов кобальта и имеет важное практическое применение. Для получения экспериментальных семян пшеницы, воздушно-сухие семена подвергались одноразовому γ -излучению, которое было проведено в Институте физических исследований НАН РА на изотопном излучателе $K120.000\ Co^{60}$, с энергией кванта в 1.17 МэВ при мощности облучения 0.4 Гр/сек. Обработанные и контрольные семена замачивали на ночь, а затем проклюнувшиеся семена пересеивали в лотки и далее проращивали в термостате в течение последующих 72 ч.

Изолирование клеточных ядер. Ядра четырехсуточных проростков пшеницы выделяли по методу, описанному в работе [22], с некоторыми модификациями. Проростки семян пшеницы, замороженные в жидком азоте, измельчали фарфо-

ровой ступкой до получения тонкого порошка, добавляли 0.25 М сахарозы в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, 25 мМ KCl, 15 мМ MgCl₂, pH 7.4 (ТКМ -буфер), далее фильтровали сквозь марлю и центрифугировали 10 мин при 9000 g на центрифуге 310 В (Mechanica Precyzyjna, Польша). Осажденные ядра повторно отмывали в ТКМ-буфере без сахарозы, в результате чего получали осадок очищенных неповрежденных ядер.

Получение ядерных фракций. Для разделения ядерных мембран полученные цельные ядра клеток проростков ресуспендировали в 10% сахарозе в 50 мМ Трис-НСl буфере, pH 7.4, содержащем: 1 мМ ДТТ, 1 мМ MgCl₂ и ингибитор протеаз. Далее добавляли ДНКазу-1 и РНКазу А (Serva, Германия), и инкубировали гомогенат 15 мин при 37°C, после чего центрифугировали 10 мин при 20000 g для разделения растворимой ядерной фракции (супернатанта) и фракции ядерных мембран (осадка). Осажденные ядерные мембраны далее отмывали двух-трехкратным ресуспендированием в ТКМ-буфере, содержащем 0.25 М сахарозу, с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 20000 g, как было описано ранее [22].

Определение общего растворимого белка во фракциях ядра проводили по методу Лоури, как описано в работе [23]. Щелочной виннокислый реагент (20 г карбоната натрия и 0.5 г тартрата натрия) растворяли в 1000 мл 0.1 N NaOH. 10 мкл образца белка добавляли к 5 мл щелочного медного реагента и оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Сразу после этого 0.5 мл разбавленного реагента Фолина смешивали со смесью и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 30 мин. Оптическую плотность полученных образцов измеряли на спектрофотометре Genesys 10s (Thermo Scientific, США) при длине волны 750 нм.

Экстракцию и гидролиз нуклеиновых кислот для количественного определения проводили согласно методу, описанному в работе [23]. Количество РНК в гидролизованных образцах определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм, принимая коэффициент экстинкции $\epsilon = 0.025$, а ДНК — при той же длине волны, коэффициент экстинкции $\epsilon = 0.02$ (после предварительного кипячения в 0.5 н HClO₄). Измерения проводили на спектрофотометре Genesys 10s (Thermo Scientific, США).

Определение электроотрицательности ядер. Электрокинетический или ζ -потенциал определяется как средний электростатический потенциал, существующий в гидродинамической плоскости сдвига в коллоидных системах в межфазном двойном электрическом слое. Измерение ζ -потенциала в настоящее время является самым простым и доступным способом для характеристики

поверхности заряженных коллоидных частиц [24]. Электрокинетический потенциал ядер определяли по величине электрофоретической подвижности ядер с помощью микроэлектрофореза под микроскопом в градиенте электрического поля согласно методу, ранее описанному в работах [7, 22]. Изолированные неповрежденные ядра семян пшеницы суспендировали в ТКМ-буфере и заливали суспензию в горизонтальную камеру для микроэлектрофореза. Электрофорез проводили при напряжении 70–80 В и силе тока 10–15 мА. За движением ядер наблюдали под микроскопом «Биолам» (ЛОМО, Россия) в среднем слое суспензии на определенной глубине камеры, где исключаются электроосмотические явления из-за взаимодействия со стенками камеры. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Скорость движения ядер в градиенте электрического поля измеряли с помощью секундомера и сетки окуляр-микрометра [7]. В данном исследовании все ядра проростков пшеницы при всех использованных экспозициях имели отрицательный заряд, и перемещались в сторону анода. Значение ЭКП рассчитывали по формуле Смолуховского:

$$\text{ЭКП} = 4\pi\eta\omega/DE, \quad (1)$$

где η — коэффициент вязкости дисперсионной среды, ω — скорость движения ядер, D — диэлектрическая постоянная воды ($D = 81$), E — градиент напряжения приложенного электрического поля в электрофоретической камере. Размерность ЭКП — в вольтах (В). Для пересчета поверхностного заряда ядер использовали следующую формулу:

$$Q = \text{ЭКП} \cdot D \cdot r, \quad (2)$$

где r — радиус эукариотического ядра, равный 5 мкм. Изменения поверхностного заряда, соответственно, позволяют оценивать электроотрицательность ядер, которую мы выразили в процентах от контроля.

Статистический анализ. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Все вычисления средних значений и стандартные ошибки были рассчитаны с использованием Microsoft Office Excel. Статистическую значимость всех наблюдаемых различий между средними значениями полученных экспериментальных данных и контрольными значениями оценивали посредством критерия Стьюдента, который составлял 3.0–3.5 для значений в диаграммах, отмеченных звездочками. Уровень достоверности был принят за $p < 0.05$.

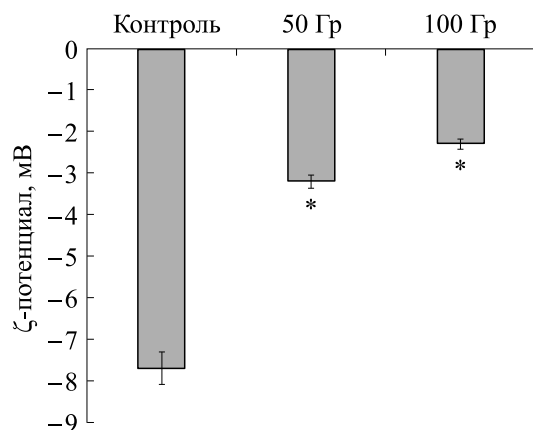


Рис. 1. Зависимость изменения электрокинетического потенциала ядер проростков семян от величины ионизирующего гамма-излучения. * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

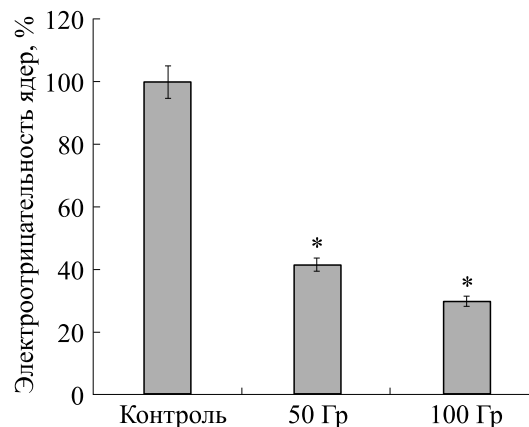


Рис. 2. Зависимость подавления электроотрицательности ядер проростков семян от величины ионизирующего гамма-излучения. * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Облучение растений ИИ, источником которого является ^{60}Co , широко используется в селекции растений для получения новых улучшенных сортов, устойчивых к различного рода стрессам и болезням. Особенно важно знать какие изменения вызывает такая обработка на молекулярном уровне растений, что может сказаться и на здоровье человека.

Тест на радиационную чувствительность семян пшеницы сорта Amby после гамма-излучения в 50 Гр и 100 Гр показал, что максимальный процент прорастания наблюдался у необлученных проростков контрольных семян [15, 25], что свидетельствует о глубоких изменениях на клеточном уровне. С этой целью нами проведены исследования воздействия γ -излучения радиоактивного изотопа ^{60}Co в дозе 50 Гр и 100 Гр на электроотрицательность ядер и на биохимический состав фракций ядра — ядерной оболочки и растворимой ядерной фракции.

Электроотрицательность ядра считается одним из информативных биофизических параметров его функциональной активности, которая измеряется посредством определения величины электрокинетического потенциала ядер [6, 7, 26]. Величину ЭКП очищенных ядер определяли измерением их электроподвижности в градиенте электростатического поля, посредством микроэлектрофореза, проводимого под микроскопом с секундомером [7]. Определение ЭКП может пролить свет на вопрос о влиянии γ -излучения на поверхностный заряд ядра, а также выявить взаимосвязь между электроотрицательностью ядер и изменениями в биохимическом составе ядерных фракций и функциональной активностью всей клетки.

Мы провели исследования воздействия ионизирующего излучения радиоактивным изотопом ^{60}Co в низких дозах (50 Гр и 100 Гр) на прорастание семян пшеницы, поскольку считается, что низкие дозы ионизирующего излучения индуцируют различные биологические эффекты, некоторые из которых оказываются благоприятными для роста и развития растений. В данном исследовании нами изучен поверхностный заряд ядер в зависимости от дозы облучения ИИ, посредством определения величины ЭКП ядер в градиенте электрического поля (рис. 1), который является важным определяющим параметром функционального состояния ядра. На основании полученных величин ЭКП были вычислены значения поверхностного заряда, который для всех ядер имел отрицательный знак. Данные о влиянии γ -излучения на электроотрицательность ядер проростков пшеницы представлены на рис. 2, где изменения значений электроотрицательности изолированных ядер клеток проростков пшеницы облученных семян, находятся в обратно пропорциональной зависимости от полученной дозы γ -излучения. Данные, приведенные на рис. 2, свидетельствуют об уменьшении электроотрицательности ядер под воздействием ИИ в зависимости от дозы облучения, что проявляется как падение электроподвижности ядер в градиенте электростатического поля. Так, воздействие в 50 Гр приводит к уменьшению абсолютной величины ζ -потенциала от -7.7 мВ до -3.2 мВ (рис. 1), то есть электроподвижность ядер уменьшается более чем в два раза. Соответственно уменьшается электроотрицательность поверхностного заряда, что, выраженное в процентах, составляет чуть более 40% от контроля (рис. 2). Сдвиги в величинах ЭКП ядер, изменение электроподвижности ядер в градиенте постоянного электрического поля

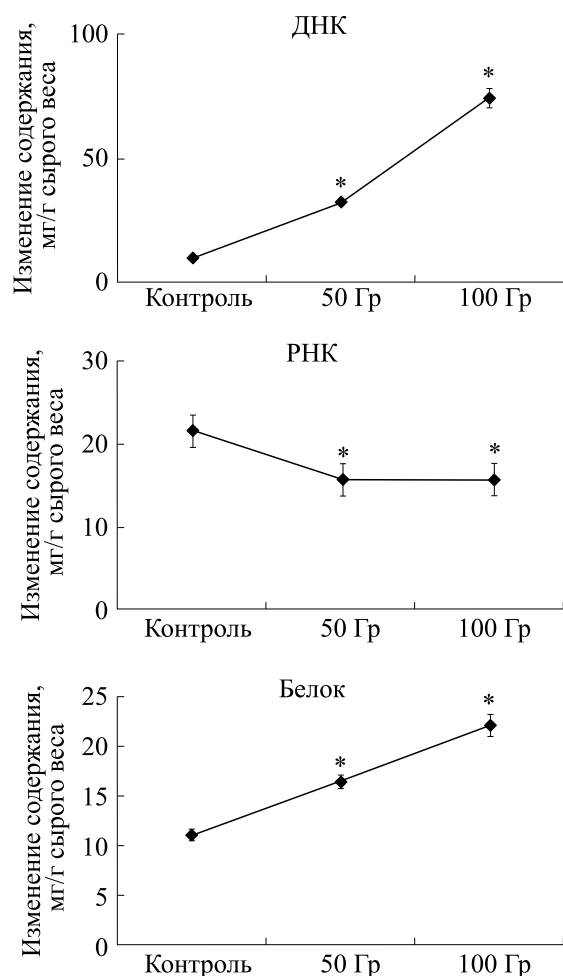


Рис. 3. Изменения содержания ДНК, РНК и белков в составе ядерной мембраны проростков в зависимости от дозы облучения семян (в мг/г сырого веса проростков). * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

могут быть связаны с изменением содержания ионогенных, заряд-формирующих молекул, таких как анионные фосфолипиды в составе двухслойной ядерной мембраны, и ассоциированные с ней белки и нуклеиновые кислоты. Описанные выше гидрофобные белки в составе ядерного порового комплекса нуклеопоринов, хотя и электронейтральны, однако под действием ИИ могут ионизироваться, принимая положительный заряд, и таким образом уменьшая отрицательную заряженность ядерной мембраны, обусловленной анионными фосфолипидами [7]. В свою очередь, уменьшение количества отрицательно заряженных молекул в составе ядерной мембраны неминуемо приводит к падению величины ЭКП ядер.

Облучение семян более высокой дозой γ -излучения в 100 Гр приводит к еще более низким значениям электроотрицательности, к падению электроподвижности ядер и соответственно к

уменьшению абсолютных значений ЭКП до 2.3 мВ, что составляет 29.9% от электроподвижности ядер из проростков контрольных семян мягкой пшеницы (см. рис. 1). В результате воздействия γ -излучения наблюдалось падение ЭКП более чем в 3.3 раза. Столь резкие изменения в электроотрицательности ядер и уменьшение величины ЭКП под воздействием ИИ могут приводить к достаточно резким изменениям в функционировании ядра, проницаемости ядерной мембраны, ее целостности и, наконец, изменений в содержании основных ее составляющих компонентов.

Изучение биохимического содержания фракций ядра клеток проростков, облученных γ -излучением (^{60}Co) семян мягкой пшеницы. Мы провели исследования воздействия ионизирующего излучения в дозах 50 Гр и 100 Гр на ранней стадии прорастания семян, поскольку на этой стадии прорастания семян низкие дозы ионизирующего излучения индуцируют различные биологические эффекты через повреждения ДНК и изменение ядерной активности [27]. С этой целью были проведены исследования воздействия γ -излучения радиоактивного изотопа ^{60}Co в дозе 50 Гр и 100 Гр на биохимический состав фракций ядра — ядерной оболочки и растворимой ядерной фракции.

В составе ядерной мембраны проростков семян мягкой пшеницы, в зависимости от дозы облучения, в наших исследованиях были зарегистрированы изменения в содержании нуклеиновых кислот и белков, данные которых представлены на рис. 3. В составе ядерной мембраны проростков семян пшеницы под воздействием облучения ИИ в дозе 50 Гр наблюдалось повышение содержания ДНК до 32.45 ± 0.19 мг/г в пересчете на сырой вес проростков относительно содержания 9.35 ± 0.32 мг/г в контрольных проростках семян пшеницы, т.е. содержание ДНК в составе ядерной мембраны увеличивается почти в 3.5 раза.

В составе ядерной мембраны при дозе облучения в 50 Гр наблюдалось увеличение также и в содержании белка, которое оказалось почти в полтора раза выше содержания такового в контрольных проростках.

Нами зафиксировано также относительное изменение в содержании РНК при этих же дозах облучения. Содержание РНК незначительно снижалось (с 21.70 ± 0.29 мг/г до 15.75 ± 0.18 мг/г в пересчете на сырой вес проростков мягкой пшеницы), как представлено на рис. 3. Зафиксированное увеличение содержания ДНК наряду с возрастанием содержания белка в составе ядерной мембраны свидетельствует об изменении структуры и увеличении плотности ядерной мембраны, а также об увеличении плотно упакован-

ного в белки гетерохроматина, прилегающего к внутреннему листку ядерной мембраны.

Необходимо отметить, что большинство исследований по изучению воздействия γ -излучения на растения сводились в основном к определению глобального содержания белков и макромолекул в клетке, однако исследования по воздействию излучения на компартменты ядра клеток и изменений в содержании ядра осуществляются впервые. Этот факт ограничивает наши возможности сравнения полученных результатов с литературными данными.

Повышение дозы γ -излучения до 100 Гр, приводит к еще более глубоким изменениям в структуре ядерной мембраны. При облучении семян в дозе 100 Гр содержание ДНК в ядерной мембране проростков превышает значение содержания ДНК в контрольных проростках более чем в семь раз, достигая величины в 74.25 ± 0.51 мг/г, как представлено на рис. 3. Содержание РНК при этом остается практически на уровне, соответствующем ядрам проростков семян, обработанных ИИ в дозе 50 Гр. При этой дозе облучения содержание белка также возрастает в два раза вследствие увеличения количества ферментов и компонентов ядер, интегрированных в ядерную мембрану. Возрастание содержания нуклеиновых кислот и белков в составе ядерной мембраны свидетельствуют о глубоких изменениях структуры ядерной мембраны, набухании ядер, а также об изменениях ее функциональной активности и проницаемости.

В составе растворимой ядерной фракции под действием γ -излучения мы также наблюдали изменения в зависимости от дозы облучения. На рис. 4 представлены данные о содержании нуклеиновых кислот и белков в растворимой ядерной фракции. Как свидетельствуют полученные нами данные, при воздействии γ -излучения дозой в 50 Гр было получено незначительное возрастание содержания РНК.

Согласно полученным данным, содержание ДНК в составе растворимой ядерной фракции незначительно уменьшилось при дозе облучения в 50 Гр (рис. 4), что свидетельствует о подавлении митотической и пролиферативной активности в клетках проростков облученных семян, а также подтверждается полученными нами ранее и имеющимися в литературе данными [27, 28]. Исходя из данных по проращению семян, облученных дозой в 50 Гр, эта доза оказалась стимулирующей для прироста массы проростков, несмотря на падение митотической активности [3,4]. Индукция роста растений может быть связана с активацией синтеза РНК и белка на ранних стадиях проращивания в ответ на стрессирующее воздействие. Общее содержание белка в составе растворимой ядерной фракции проростков семян пшеницы,

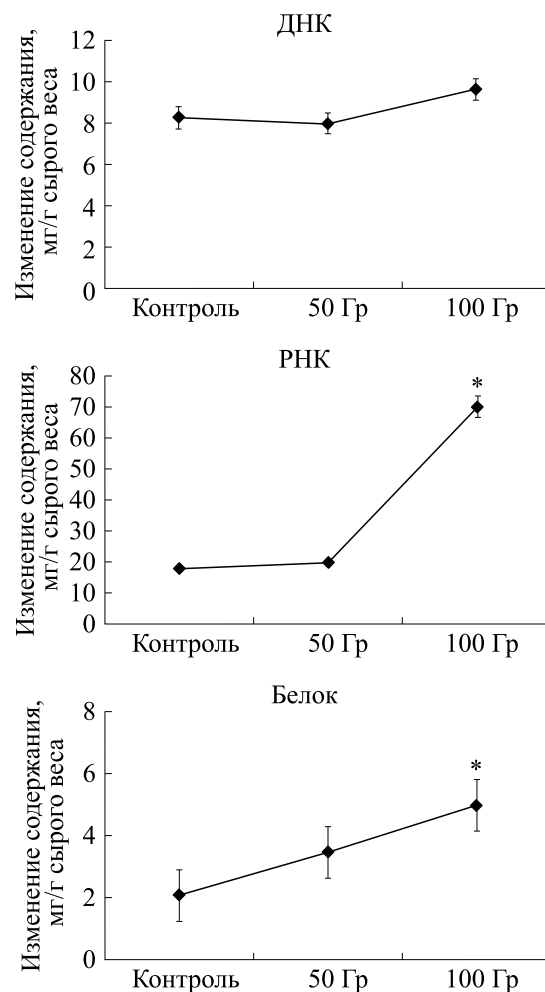


Рис. 4. Изменения содержания ДНК, РНК и белков в составе растворимой ядерной фракции проростков в зависимости от дозы облучения семян (в мг/г сырого веса проростков). * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

облученных в дозе 50 Гр, возрастало с 2.04 мг/г до 3.5 мг/г сырого веса проростков (см рис.4).

При обработке семян γ -излучением дозой 100 Гр в составе растворимой ядерной фракции увеличивается содержание ДНК с 8.25 мкг/мг до 9.62 мкг/мг, что, по-видимому, связано с нарушением митотического веретена делящихся клеток, со специфическими изменениями концентрации ключевых фитогормонов и паттернов экспрессии генов - факторов метаболизма.

Содержание ДНК в растворимой ядерной фракции незначительно повышается с 8.25 ± 0.31 мг/г до 9.62 ± 0.28 мг/г. Данные, демонстрирующие незначительное возрастание содержания ДНК в растворимой ядерной фракции (рис. 4), согласуются с ранее полученными нами цитогенетическими данными, указывающими на увеличение количества клеток с хромосомными

абберациями и понижением митотической способности клеток [28], а также имеет место амплификация некоторых генов.

Наряду с подавлением митотической активности клетки в содержании растворимой ядерной фракции наблюдалось резкое повышение содержания РНК с 17.85 ± 0.18 мг/г до 70.1 ± 0.22 мг/г, т.е. содержание РНК увеличилось приблизительно в три раза.

Также были получены данные об увеличении содержания белка в составе растворимой ядерной фракции с 2.04 ± 0.29 мг/г (референсные значения) до 5.2 ± 0.12 мг/г при облучении в дозе 100 Гр. В результате облучения было получено увеличение содержания белка в два с половиной раза, что является перспективным для получения высокобелковых сортов.

В результате воздействия γ -излучения в дозе 100 Гр незначительно изменяется содержание ДНК, происходит падение митотической активности, разрывы хромосом и хромосомные абберации, что приводит к подавлению роста. Однако для преодоления стресса клетке необходим синтез большого количества и-РНК для интенсификации синтеза белков *de novo*, для восполнения белков и ферментов, утративших активность в результате облучения, чем объясняются полученные нами данные резкого повышения в содержании РНК и белка в составе растворимой ядерной фракции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Неподвижность и многочисленные стрессы, с которыми сталкиваются растения в течение онтогенеза, привели к выработке механизмов адаптации растений к изменениям окружающей их среды. Растения лучше справляются со стрессом даже при высоких дозах облучения ИИ, используя механизмы репарации ДНК, антиоксидантные пути, изменение соотношения фенольных соединений и АБК/ГК [10, 11], которыми они обладают в большей степени, чем многие другие многоклеточные организмы [29]. Известно, что ионизирующее излучение способно выбивать электроны из атомов макромолекул и, таким образом, приводить к окислению биологически важных молекул и к возникновению активных форм кислорода, вовлеченных в цепные реакции, повреждающие клеточные мембраны, белки и ДНК [11, 14]. Эти высокоактивные сигнальные молекулы запускают реакции окислительного стресса, приводящие к изменениям структуры ядерной мембраны и ее проницаемости, после чего сигнальные молекулы ($O^{\cdot -}$, $NO^{\cdot -}$, $OH^{\cdot -}$) передаются к клеточному ядру [30], вызывая специфические изменения в метаболических путях, сопровождающиеся

модификацией экспрессии генов [12, 31]. В результате перечисленных выше процессов происходят изменения в физиологических и морфометрических параметрах растений [25], изменения в биохимическом составе клетки, возрастание синтеза белков и вторичных метаболитов, что приводит к полученным нами изменениям в содержании и функциональной активности ядра растительной клетки, а также подтверждается литературными данными [27, 32].

Исследуемые семена мягкой пшеницы сорта Amby ($d_1D_2D_3$; $ch_{1r}Ch_{2r}$), также как и мягкой пшеницы сорта Frisco ($D_1d_2D_3$; $ch_{1r}Ch_{2r}$), обладают гибридным красным хлорозом по идентичным генам, но депрессивностью по разным генам. Для преодоления гибридной депрессивности этих сортов ранее было применено облучение радиоактивным изотопом Co^{60} , что, однако не привело к положительным результатам [28]. В зависимости от дозы облучения ИИ (50–200 Гр) подавлялся рост в длину семисуточных проростков облученных семян мягкой пшеницы сортов Frisco и Amby по сравнению с контрольными [25, 28].

Согласно полученным данным, низкие дозы ИИ оказываются благоприятными для роста растений, что широко используется в сельском хозяйстве при предпосевной обработке семян [3]. Множеством исследований показана повышенная радиочувствительность делящихся клеток семян на ранних стадиях прорастания семян [29]. Наблюдаемые нами изменения в содержании белка в растворимой ядерной фракции проростков семян пшеницы при облучении в 50 Гр также свидетельствуют о том, что под воздействием ионизирующего излучения запускаются ферментативные системы, для которых необходим синтез белка *de novo*, что подтверждается также и литературными данными [14, 15]. В составе ядерной мембраны нами также наблюдалось увеличение содержания белка в ответ на облучение ИИ в дозе 50 Гр, что свидетельствует об интенсификации синтеза белков и ферментов, участвующих в запуске процессов регенерации и адаптации клеток, что также согласуется с литературными данными [11].

Ионизирующее излучение — один из немногих физических факторов, который может вызвать ряд повреждений, включая двухцепочечные разрывы ДНК, нарушение митотического веретена, амплификацию генов репарации, радиомаркеров и антиоксидантной системы [28, 31–33]. Соответственно, возрастание активности генов радиопротекторных белков, приводит к синтезу большого количества ферментов и белков, ассоции-

рованных с ядерной мембраной и необходимых клетке для преодоления стресса, что подтверждается полученными нами данными по возрастанию содержания белка и РНК с растворимой ядерной фракции (см. рис. 4).

С увеличением дозы γ -излучения до 100 Гр в составе растворимой ядерной фракции нами было получено незначительное увеличение содержания ДНК, которое связано, по-видимому, со специфическими изменениями паттернов экспрессии генов метаболизма [10] и амплификацией генов-радиомаркеров [32]. Известно, что ИИ вызывает двухцепочечные разрывы ДНК, что приводит к нарушению целостности генома и отражается на функциональной активности всей клетки [15].

В свою очередь, физиологическая активность клеток определяется функциональной активностью клеточного ядра и ядерно-цитоплазматического транспорта сквозь ядерную мембрану, что находится в прямо пропорциональной зависимости от поверхностного заряда ядра [20, 21, 23]. Облучение семян мягкой пшеницы в дозе 100 Гр приводит к уменьшению величины электроотрицательности изолированных ядер проростков семян пшеницы. В данном исследовании было получено многократное увеличение содержания ДНК в ядерной оболочке, что свидетельствует о возрастании гетерохроматиновых областей, прилегающих к внутреннему слою ядерной мембраны. Воздействие γ -излучения в дозах 100–300 Гр у трех различных сортов семян пшеницы *T. aestivum* L. оказывало специфичное воздействие в зависимости от дозы облучения и вида, вызывая множество аберрантных хромосом, раскручивание хромосом, нарушение экваториальной пластинки и т.д. [31]. Ранее нами также была показана зависимость между изменениями ЭКП ядер проростков пшеницы и повышением функциональной активности ядер проростков семян для трех видов пшениц в течение прорастания, а также было получено уменьшение электроотрицательности ядер и даже смены знака после обработки ферментами РНКазой и ДНКазой, которые обычно применяются для разрушения ядерной мембраны [23]. Следовательно, уменьшение абсолютной величины ЭКП под воздействием ИИ свидетельствует о падении электроотрицательности ядер проростков, разрушении ионогенных молекул на поверхности клеточного ядра, а также о глубоких нарушениях в функционировании ядра, изменении проницаемости ядерной оболочки вплоть до структурных нарушений в ядерной мембране и растворимой ядерной фракции. Так, если ранее ядерная оболочка рассматривалась только как барьер

для избирательной проницаемости в ядро, то теперь уже имеется достаточно доказательств того, что ядерная оболочка вместе с трансмембранными белками ядерной оболочки (nuclear envelope transmembrane proteins – NETs) и связанными с нею растворимыми белками участвует во множестве клеточных функций, включая организацию генома, ядерную миграцию, локализацию хроматина, регуляцию клеточного цикла и дифференциации клеток [34].

В то же время наши исследования показали, что, с одной стороны, происходит замедление роста семян в длину, а с другой стороны – наблюдается возрастание общего содержания ДНК и белка в ядерной мембране и в содержимом ядра, что приводит к падению электроотрицательности клеточных ядер в ответ на воздействие ИИ и, соответственно к резкому увеличению метаболической активности ядер. Несколько экспериментальных результатов показали, что пролиферативные клетки в целом деполяризованы, т.е. обладают трансмембранным отрицательным электрическим потенциалом V_m , который ниже, чем у непролиферативных клеток [35]. В то же время клетки имеют несколько механизмов регуляции электрического потенциала, в частности, это ионные каналы и насосы, взаимодействующие с внеклеточной средой, и щелевые контакты для связи с соседними клетками [36]. Возможно, регистрируемое нами падение электроотрицательности ядер в результате облучения ИИ происходит как результат увеличения пролиферации клеток и глубоких изменений в содержании ядра и ядерной мембраны.

В результате облучения семян ИИ в клетке увеличивается синтез белка, запускаются все возможные метаболические пути, используются все ресурсы клетки для преодоления стресса, для выживания и адаптации к новым условиям. Вопрос об уменьшении электроотрицательности ядер клеток открывает новые перспективы исследования электрических явлений в клетке, особенно проявляющиеся при действии высокоэнергетических полей.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования показали, что культивируемые пшеницы, обладая крупным, гексаплоидным геномом, достаточно устойчивы к воздействию ИИ в дозах от 50 до 100 Гр. В течение эволюции в растениях выработался эффективный механизм адаптации к физическим стрессовым факторам, используя механизмы репарации ДНК, антиоксидантные пути, а также изменение

соотношения фенольных соединений и АБК/ГК. Из полученных данных можно сделать вывод, что полученная извне энергия полностью расходуется на изменения экспрессии генома и увеличение метаболической и пролиферативной активности клеток, тем самым деполяризуя ядро и приводя к падению величины ζ -потенциала, к уменьшению электроотрицательности поверхности ядерной мембраны. Полученные изменения в составе растворимой ядерной фракции — возрастание содержания РНК и белков — объясняются интенсивным синтезом ферментов и амплификацией радиопротекторных генов, необходимых для преодоления стресса и выживания в изменяющихся условиях.

Таким образом, низкие дозы в пределах 50–100 Гр оказывают благоприятное воздействие на семена гексаплоидной мягкой пшеницы, вызывая возрастание метаболической и пролиферативной активности, изменения экспрессии генов и мутации. Именно эти дозы можно рекомендовать для обеззараживания и повышения метаболической активности культивируемых мягких пшениц. На сегодняшний день целенаправленный ИИ-индуцированный мутагенез является перспективной и передовой технологией в улучшении наиболее важных сельскохозяйственных культур в мире.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Wang, H. Ma, and Sh. Wang, *Food Sci. Technol. Res.*, **25** (4), 489 (2019).
2. A. M. Khaneghah, M. H. Moosavi, C. A. F. Oliveira, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **143**, 111557 (2020).
3. P. Yu. Volkova, E. V. Bondarenko, and E. A. Kazakova, *Curr. Opin. Toxicol.*, **30**, 100334 (2022).
4. L. A. Minasbekyan, *Proc. YSU*, **56** (3) (2023).
5. НРБ-99/2009 — интернет ресурс: <https://files.stroyinf.ru/Data1/56/56325/index.htm>
6. L. J. Colwell, M. P. Brenner, and K. Ribbeck, *PLoS Comput. Biol.*, **6** (4), e1000747 (2010).
7. Л. А. Минасбекян и А. В. Неркаряян, *Биофизика*, **67** (6), 1131 (2022).
8. В. Г. Шахбазов, *Экологическая и биофизическая генетика: Избранные труды*, под ред. В. Чешко (Штрих, Харьков, 2001).
9. S. Kimura, J. Shibato, G. K. Agrawal, et al., *Rice Genet. Newsl.*, **24**, 52 (2008).
10. H. Liu, H. Li, G. Yang, et al., *Postharvest Biol. Technol.*, **172**, 111380 (2021).
11. R. S. Hanafy and S. A. Akladios, *J. Genetic Engineer. Biotechnol.*, **16**, 683 (2018).
12. G. Singh, P. Pal, M. Masand, et al., *Plant Physiol. Biochem.*, **148**, 90 (2020).
13. D. S. Kim, J. B. Kim, E. J. Goh, et al., *J. Plant Physiol.*, **168**, 1960 (2011).
14. K. Kawamura, F. Qi, and J. Kobayashi, *J. Rad. Res.*, **59** (2), ii91 (2018).
15. N. Caplin and N. Willey, *Front. Plant Sci.*, **9**, 847 (2018).
16. S. S. Patel, B. J. Belmont, J. M. Sante, and M. F. Rexach, *Cell*, **129**, 83 (2007).
17. P. Upla, S. J. Kim, M. P. Rout, and J. Fernandez-Martinez, *Structure*, **25**, 434 (2017).
18. J. Lu, T. Wu, B. Zhang, et al., *Cell Commun. Signal.*, **19**, 60 (2021).
19. Y. Ma, K. Poole, J. Goyette, and K. Gaus, *Front. Immunol.*, **8**, 1513 (2017).
20. S. Bhattacharjee, *J. Controlled Release*, **235**, 337 (2016).
21. X-J. Du, Ji-L. Wang, Sh. Iqbal, et al., *Biomater. Sci.*, **6**, 642 (2018).
22. L. A. Minasbekyan, Zh. V. Yavroyan, et al., *Russ. J. Plant Physiol.*, **55** (3), 412 (2008).
23. L. A. Minasbekyan, S. A. Gonyan, M. A. Parsadanyan, and P. O. Vardevanyan, *Russ. J. Plant Physiol.*, **49** (2), 250 (2002).
24. А. Г. Варехов, *Научное приборостроение*, **27** (2), 21 (2017).
25. L. A. Minasbekyan and I. A. Avagyan, *Proc. YSU*, **55** (2), 165 (2021).
26. E. von Well, A. Fossey, and M. Booyse, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, **11**, 75 (2018).
27. E. von Well, M. Booyse, and A. Fossey, *Protoplasma*, **11**, 75 (2021).
28. R. R. Sadoyan and L. A. Minasbekyan, *Ann. Agrar. Sci.*, **8** (2), 32 (2010).
29. A. Majeed, Z. Muhammad, R. Ullah, and H. Ali, *Pak. J. Bot.*, **50** (6), 2449 (2018).
30. P. M. Mullineaux, M. Exposito-Rodriguez, P. P. Laisue, et al., *Phil. Trans. R. Soc. B*, **375**, 20190405 (2020).
31. S. Oney-Birol and A. Balkan, *Pak. J. Bot.*, **51** (3), 887 (2019).
32. J. E. Hwang, S. G. Hwang, S. H. Kim, et al., *Physiol. Plant.*, **150**, 604 (2014).
33. Y. Matsumoto, S. Imamichi, M. Fukuchi, et al., In: *New Research Directions in DNA Repair*, Ed. by C. Chen (InTech, 2013).
34. J. A. Talamas and M. Capelson, *Front. Genet.*, **6**, 95 (2015).
35. J. Carvalho, *Sci. Rep.*, **12** (9), 206 (2022).
36. J. L. Whited and M. Levin, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **57**, 61 (2019).

Effects of Ionizing Radiation on Radio Sensitivity of Cell Nuclei of Wheat Seedlings**Minasbekyan* and I.A. Avagyan*****Yerevan State University, Research Institute of Biology, ul. A. Manukyana 1, Yerevan, 0025 Armenia*

Effects of the 50 Gy and 100 Gy doses of γ -irradiation on radiosensitivity of cell nuclei of soft dwarf wheat seedlings were studied. Changes in the biochemical composition of the nuclear fractions of seedlings of wheat seeds exposed to γ -irradiation were determined. After exposure to ionizing radiation, total protein and nucleic acids levels appeared to be greater in the soluble nuclear fraction and the nuclear membrane-associated DNA content and proteins increased. It was also found that the value of the ζ -potential of isolated nuclei of seedlings of irradiated seeds decreased in a static electric field. Changes in the surface charge of the nucleus lead to a violation of its functional activity, since the surface charge of the nuclei is necessary for the normal functioning and regulation of the nuclear-cytoplasmic transport of macromolecules. Exposure to radiation causes destruction of ionogenic groups of molecules of the nuclear membrane, leading to a decrease in the electronegativity of the nuclei, which, in turn, entails a change in the functional activity of the nucleus. The results obtained show that changes in electronegativity and in the content of nuclear fractions are directly dependent on the dose of ionizing radiation. It can be concluded that γ -irradiation in a range from 50 to 100 Gy had beneficial effects on metabolic and proliferative activities of soft wheat cells.

Keywords: the biochemical composition of the nuclear membrane, the biochemical composition of the soluble nuclear fraction, wheat seedlings, electronegativity, ζ -potential, γ -irradiation