

УДК 577.1:547.963.582.542.1

Ս. Օ. ՎԱՐԴԵՎԱՅԱՆ, Մ. Ր. ԴԱՐԲԻՆՅԱՆ, Ջ. Վ. ՅՎՐՅՈՅՆ, Լ. Ա. ՄԻՆԱՏԵԿՅԱՆ

ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ И ХРОМАТИНА ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Исследовано содержание фосфолипидов хроматина и ядерной мембраны проростков зародышей семян пшеницы. Показано, что исследуемые ядерные субфракции проростков зародышей пшеницы различаются по составу и количественному содержанию фосфолипидов. При обработке семян гиббереллином (ГК₃) происходит перераспределение фосфолипидов. Показано также, что под воздействием миллиметровых электромагнитных волн изменяются состав и количество фосфолипидов в препаратах ядерных мембран и хроматина проростков семян пшеницы. В исследуемых ядерных субфракциях чувствительность к воздействию факторов различной природы проявляют разные классы фосфолипидов.

Ядерно-мембранная структура играет важную роль в установлении динамического равновесия между ядром и цитоплазмой [1, 2]. Непосредственная связь структур внутренней ядерной мембраны с хроматином предполагает их возможное участие в изменении функциональной активности генома [3, 4]. В настоящее время уже доказано, что фосфолипиды ядерных структур имеют определенный вклад в регуляции генетической активности. Хорошо известно, что липиды ядер локализованы не только в мембранных структурах. Небольшое их количество является постоянной составной частью хроматина и может влиять на основные функции ядра – репликацию и транскрипцию ДНК путем изменения структуры ДНК, нуклеопротеиновых комплексов, гистонов и негистоновых белков или путем облегчения доступа РНК-полимеразы к промоторной части гена [5, 6].

Фосфолипиды ядерных структур – ядерной мембраны и хроматина клеток растений – исследованы недостаточно. Поэтому изучение фосфолипидного состава ядерной мембраны и хроматина семян пшеницы при прорастании в присутствии экзогенного фитогормона и под воздействием миллиметровых электромагнитных волн (ММЭМВ) представляет определенный интерес для выявления механизмов экспрессии растительного генома.

Методы исследования. Для обработки семян экзогенным гиббереллином (ГК₃) в проточную воду добавляли фитогормон в расчете 125мг на 1л.

Для получения проростков, обработанных ММЭМВ, замоченные однодневные семена 20 мин облучали с частотой 50,3 ГГц при помощи генератора Г4-141 как описано в [7]. Данная частота совпадает с резонансной частотой колебаний гексагональных колец молекулярной структуры воды.

Ядра получали из обработанных и необработанных проростков зародышей пшеницы по модифицированному нами методу Блобела и Потера [8]. Замороженные в жидком азоте проростки измельчали в ступке до получения тонкого порошка, добавляли 0,25М сахарозу в 10М Трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 25М КСl, 15М MgCl₂, ТКМ и проводили соответствующие процедуры, описанные в работе [8]. Для получения ядерных мембран осадок ядер суспендировали в 50М Трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 1% Тритон Х-100, 400М КСl, и далее проводили процедуры как было описано ранее в [8]. Осажденные ядерные мембраны отмывали 2–3-кратным ресуспендированием и последующим центрифугированием в течение 15 мин при 27000 g в центрифуге ЦВР-1 (МРТУ-42, СССР) в растворе 0,25М сахарозы в ТКМ буфере.

Хроматин выделяли по методу, описанному в работе [9]. «Грубый» хроматин, полученный после осаждения сульфатом аммония, дважды промывали в 10М Трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 10М NaCl, 3М MgCl₂ и 0,1М фенилметилсульфонилфторид.

Экстракцию фосфолипидов из ацетоновых порошков препаратов ядерных мембран и хроматина проводили смесью хлороформ–метанол (2:1) по методу Фолча [10]. Для фракционирования фосфолипидов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с применением пластинок с силикагелем L (*Chemapol*, Чехия). Хроматографию проводили в системе растворителей хлороформ–метанол–вода в соотношении 65:5:4. Для идентификации фосфолипидов были использованы стандартные препараты фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и кардиолипина (КЛ) (*Sigma*, США). Хроматограммы проявляли в парах йода. Количественное определение отдельных групп фосфолипидов после 2-часовой минерализации в присутствии смеси HClO₄ и HNO₃ проводили по неорганическому фосфору методом Эймса [11].

В таблицах представлены средние арифметические величины из 6 независимых экспериментов и их стандартные отклонения. Достоверность полученных данных оценивалась по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В отличие от разнообразия механизмов контроля у животных, в растениях существуют более общие механизмы, изменяющие направление роста и развития растительного организма в ответ на изменение окружающей среды. В организме высших растений гормоны являются наиболее подходящей формой контроля, поскольку клетки-мишени рассеяны по всему организму и предполагается некоторая свобода их реакций на химическую стимуляцию в зависимости от чувствительности зоны воздействия к данному гормону. Так, гибберелловая кислота необходима для осуществления последних этапов прорастания зародыша семени, а именно, для собственного роста осевых органов зародыша.

К настоящему времени изучены фосфолипиды многих растительных

объектов [12,13], однако фосфолипидный состав растительного хроматина и ядерной мембраны изучен недостаточно.

Таблица 1

Содержание отдельных групп фосфолипидов (ФЛ) в препаратах ядерной мембраны контрольных, обработанных гиббереллином и облученных ММЭМВ с частотой 50,3ГГц проростков зародышевой семян пшеницы (1 – мкгФЛ/мг сухого веса, 2 – % от суммы фосфолипидов).

Фосфолипиды	Контрольные		Обработанные ГК ₃		Обработанные ММЭМВ	
	1	2	1	2	1	2
фосфатидилхолин	0,39 ± 0,03	18,55	0,38 ± 0,02	19,09	0,33 ± 0,08	23,57
фосфатидилэтанол-амин	0,23 ± 0,01	11,08	*0,40 ± 0,03	20,10	0,28 ± 0,03	20
фосфатидилинозитол	0,18 ± 0,02	8,67	**0,13 ± 0,01	6,53	**0,34 ± 0,05	24,28
фосфатидилсерин	0,2 ± 0,02	9,40	**0,16 ± 0,01	8,04	0,27 ± 0,03	19,25
фосфатидная кислота	0,91 ± 0,02	43,86	*0,41 ± 0,02	20,60	*0,18 ± 0,08	12,85
кардиолипин	0,18 ± 0,02	8,44	*0,51 ± 0,03	25,63	н.о.	0
суммарные фосфолипиды	2,08	100	1,9	100	*1,4	100

В таблицах 1, 2: * – p < 0,05; ** – p < 0,1.

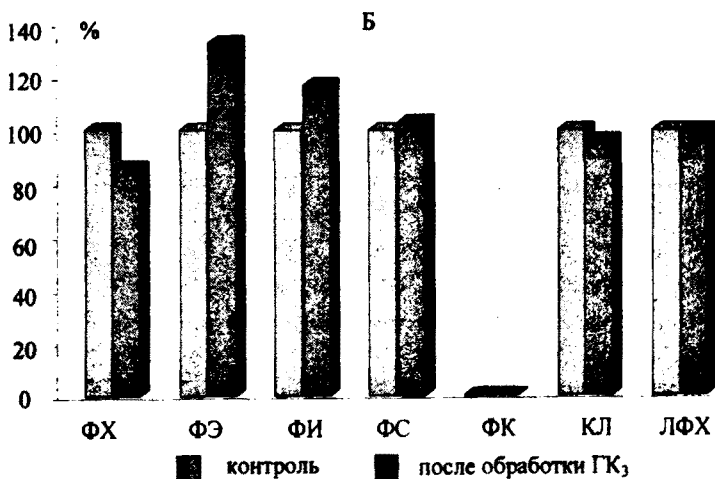
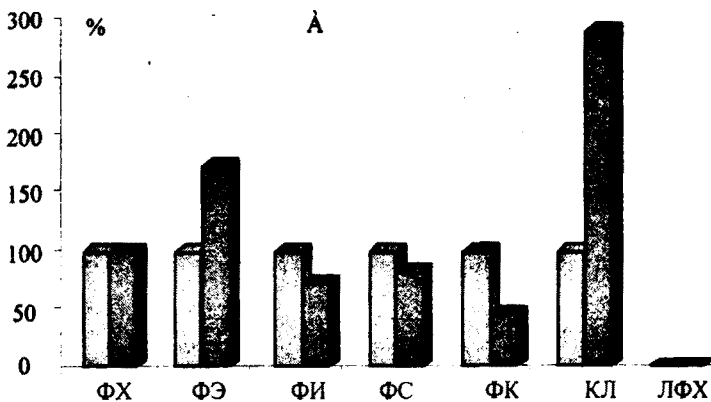
Таблица 2

Содержание отдельных групп фосфолипидов в препаратах хроматина контрольных, обработанных гиббереллином и облученных ММЭМВ с частотой 50,3ГГц проростков зародышевой семян пшеницы (1 – мкгФЛ/мг сухого веса, 2 – % от суммы фосфолипидов)

Фосфолипиды	Контрольные		Обработанные ГК ₃		Обработанные ММЭМВ	
	1	2	1	2	1	2
фосфатидилхолин	0,59 ± 0,02	33,82	*0,50 ± 0,02	28,16	**0,42 ± 0,03	17,94
фосфатидилэтанол-амин	0,33 ± 0,02	20,10	**0,44 ± 0,02	24,41	**0,48 ± 0,03	20,51
фосфатидилинозитол	0,17 ± 0,01	10,06	**0,20 ± 0,02	11,37	*0,67 ± 0,07	28,63
фосфатидилсерин	0,37 ± 0,02	21,20	0,38 ± 0,02	21,16	0,46 ± 0,09	19,66
фосфатидная кислота	н.о.	0	н.о.	0	0,31 ± 0,06	13,24
кардиолипин	0,14 ± 0,01	8,10	0,13 ± 0,02	7,50	н.о.	0
лизофосфатидилхолин	0,14 ± 0,02	7,80	0,13 ± 0,02	7,40	н.о.	0
суммарные фосфолипиды	1,73 ± 0,02	100	1,786 ± 0,03	100	*2,34 ± 0,06	100

С этой целью нами применен метод ТСХ, результаты которого представлены в таблицах 1 и 2. Исследуемые нами препараты ядерных субфракций отличаются как по составу, так и по количественному содержанию отдельных классов фосфолипидов. В препаратах ядерных мембран проростков семян пшеницы обнаружены шесть фракций фосфолипидов, в том числе ФХ, ФЭ, фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидная кислота (ФК) и КЛ (табл. 1). Фосфолипиды хроматина 3-дневных проростков зародышевой семян пшеницы также представлены шестью фракциями. Однако препараты ядерной мембраны и хроматина несколько отличаются по составу фосфолипидов (табл. 1, 2). Так, ФК, присутствующая в препаратах ядерных мембран, не обнаруживается среди фосфолипидов хроматина. Вместе с тем, в хроматине присутствует лизофосфатидилхолин (ЛФХ), который не обнаружен в ядерной мембране.

Известно, что самыми распространенными фосфолипидами в эукариотических клетках являются ФХ и ФЭ. Их количество может достигать соответственно до 50 и 25% всей фосфолипидной массы [14]. Результаты проведенных нами исследований показали, что ФХ и ФЭ представлены в обеих субфракциях ядра (табл. 1, 2). Интересно отметить, что другой холинсодержащий фосфолипид – сфингомиелин, который является основным компонентом внутриядерных структур клеток животных, не обнаружен ни в одном из исследуемых препаратов.



Диаграммы содержания фосфолипидов (%) ядерной мембраны (А) и хроматина (Б) 3-дневных проростков зародышей семян пшеницы под действием гиббереллина.

Детальная информация о содержании фосфолипидов в хроматине: Препараты ядерной мембраны и хроматина проростков зародышей семян пшеницы отличаются также по количественному содержанию выявленных классов фосфолипидов. Так, для ядерной мембраны мажорной является ФК (табл. 1), которая составляет примерно 44% всей массы фосфолипидов, а в препаратах хроматина высоким содержанием отличаются ФХ (33,8%) и ФС (21,2%) (табл. 2). В ядерной мембране доля фосфатидилсерина составляет всего 9,4% общего содержания фосфолипидов.

Обработка ГК₃ неоднозначно отражается на содержании отдельных классов фосфолипидов в исследуемых препаратах субфракций ядра проростков семян пшеницы (см. рис. А). Как следует из полученных результатов, в препаратах ядерных мембран наблюдается достоверное повышение содержания ФЭ примерно на 70% и КЛ – на 190%. Количество ФХ не меняется, в то время как содержание остальных фосфолипидов – ФИ, ФС и ФК – сокращается на 28, 17 и 55% соответственно. Особого внимания заслуживает почти

сфингомиелин, который является основным компонентом внутриядерных структур клеток животных, не обнаружен ни в одном из исследуемых препаратов. По всей вероятности, это связано со спецификой растительных клеток. Препараты ядерной мембраны и хроматина проростков зародышей семян пшеницы отличаются также по количественному содержанию выявленных классов фосфолипидов. Так, для ядерной мембраны мажорной является ФК (табл. 1), которая составля-

двукратное уменьшение содержания ФК, которая, как известно, является исходным материалом для синтеза остальных глицерофосфолипидов. Не исключено, что ГК₃ способен активировать утилизацию фосфатидной кислоты в процессах синтеза фосфолипидов, повышение содержания которых мы зарегистрировали [16].

Выявленные изменения в содержании отдельных классов фосфолипидов ядерных мембран после обработки семян ГК₃ сказываются также на их процентных долях (см. рис. А). Наблюдается повышение доли ФЭ (от 11 до 21,64%) в составе ядерной мембраны и почти 3-кратное повышение доли КЛ (от 8,44 до 25,06%). В результате резкого сокращения содержания ФК примерно в два раза уменьшается также доля данного фосфолипида (от 43,86 до 20,6%). Необходимо отметить, что, наряду с выявленными существенными изменениями в количественном содержании отдельных фосфолипидов в составе ядерной мембраны, их суммарное содержание также меняется (табл. 1).

Содержание отдельных фосфолипидов в хроматине зародышей семян пшеницы, проросших в присутствии ГК₃, также меняется. Однако, как свидетельствуют результаты, в отличие от ядерно-мембранной фракции, резких изменений не наблюдается (см. табл. 2 и рис. Б). Показано, что при обработке гиббереллином примерно на 30% повышается содержание ФЭ. Количество ФИ в хроматине также повышается на 18%, в отличие от препаратов ядерной мембраны, где наблюдалось сокращение содержания данного фосфолипида на 28% (табл. 1, 2, рис. А и Б).

В отличие от ядерной мембраны, в препаратах хроматина наблюдается уменьшение содержания ФХ примерно на 14%. Однако при этом не обнаружено изменение количества ЛФХ, который является продуктом деацилирования ФХ. Следовательно, уменьшение содержания ФХ может быть результатом утилизации данного липида в процессах взаимопревращений фосфолипидов [16]. Количественный состав остальных фосфолипидов, обнаруженных в хроматине, а также их суммарное содержание не меняются при проращивании зародышей семян пшеницы в присутствии ГК₃ (табл. 2).

Нами также проведены эксперименты по изучению действия ММЭМВ на фосфолипидный состав ядерной мембраны и хроматина. В работе [15] показано, что воздействие внешних электростатических полей приводит к изменению липидных компонентов эритроцитарных мембран и значительно влияет на их функциональное состояние. Одним из регулирующих факторов многих свойств и соответственно функций мембран является микровязкость липидного матрикса. Липидная сбалансированность липопротеинового бислоя и его структурно-функциональное состояние обусловлены работой целого ряда мембранно-связанных липид-модифицирующих ферментных систем (деацилазы, реацилазы, диэстеразы, трансметилазы). Некоторые авторы предполагают, что одной из возможных причин биологической активности внешних полей является изменение активности мембранно-связанных липид-модифицирующих ферментов.

В экспериментах по исследованию влияния ММЭМВ на фосфолипидный состав ядерной мембраны и хроматина нами выявлены изменения состава

ва и количества фосфолипидов в препаратах обеих субфракций (табл. 1, 2). Примечательно, что в них отсутствует КЛ. После воздействия ММЭМВ в препаратах ядерных мембран количество ФК уменьшается примерно на 80%, одновременно наблюдается достоверное повышение содержания ФИ (на 21,8%). Изменение остальных фосфолипидов не достоверно. В результате наблюдается снижение суммарного содержания фосфолипидов на 33% (табл.1).

При воздействии ММЭМВ в препаратах хроматина уменьшается содержание ФХ на 29%. При этом особого внимания заслуживает почти трехкратное повышение содержания ФИ (табл. 2). Как в препаратах ядерной мембраны, так и в препаратах хроматина после облучения нами не выявлен кардиолипид. В результате обнаруженных изменений суммарное содержание фосфолипидов хроматина увеличивается на 35%. Такие резкие изменения фосфолипидного состава при воздействии некогерентного электромагнитного излучения могут привести к изменению микровязкости ядерной мембраны и, возможно, к конформационным перестройкам на уровне хроматина.

Таким образом, при прорастании зародышей семян пшеницы в присутствии экзогенного гиббереллина и под воздействием ММЭМВ наблюдаются значительные количественные сдвиги в содержании отдельных классов фосфолипидов в препаратах ядерных мембран и хроматина, что свидетельствует об изменении фосфолипидного обмена. Как можно предположить из полученных данных, воздействие факторов различной природы происходит по разным метаболическим путям. Перераспределение фосфолипидов ядерной мембраны и хроматина, в свою очередь, свидетельствует о возможном участии фосфолипидов в механизмах активации генетического аппарата.

Авторы выражают благодарность В.Р. Калантаряну за содействие в проведении экспериментов по облучению образцов.

Кафедра биофизики

Поступила 26.04.2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Gorlich D., Prehn S., Laskey R., Hartman E. – Cell, 1994, v. 79, p. 767–778.
2. Englemeler L., Olivo J.Ch., Mattay I.W. – Curt. Biology, 1999, v. 9, № 1, p. 30–41.
3. Capitani S., Bertagnalo V., Mazzoti M., Santi P., Previali M., Antonucci A., Manzoli F.A. – FEBS Letter, 1989, v. 254, № 1, p. 194–198.
4. Cocco L., Martelli A.M., Gilmour S.R., Ognibene A., Manzoli A.A., Ievine R.F. – Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1989, v.159, № 2, p.720–725.
5. Губский Ю.И., Левицкий Е.А., Примак Р.Г., Голубов М.И., Ножикова С.Н. – Укр. биохим. журнал, 1991, т. 63, № 2, с. 83.
6. Manzoli F.A., Capitani S., Maraldi N.M. – Minor components of the chromatin and their role in the release of template restriction. Cell Growth. Ed. Nicolini C. New York: Plenum, 1981, p. 463.
7. Vardevanyan P.O., Nerkararyan A.V., Parsadanyan M.A., Gevorkyan E.S. – International Conference «Unification and Optimization of Radiation monitoring on NPP», 2004, Yerevan, Proceedings, p.71–74.
8. Blobel G., Potter V.R. – Science, 1966, v. 154, p. 1662–1665.
9. Вардеванян П.О., Тирацунян С.Г., Вардеванян А.О., Бояджян Б.Г., Паносян Г.А. – Физиология растений, 1995, т. 42, № 2, с. 290–294.
10. Вардеванян П.О., Бояджян Б.Г., Тирацунян С.Г., Вардеванян А.О., Паносян Г.А. – Физиология растений, 1996, т. 43, № 4, с. 616–619.
11. Ames B.N. – Meth. Enzymol., 1966, v. 8, p. 115–118.

12. Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. – *New Phytologist*, 2003, v. 157, № 3, p. 423–428.
13. Maathuis F.J.M., Filatov V., Herzyk P. et al. – *The Plant Journal*, 2003, v. 35, № 6, p. 675–681.
14. Hanneberry A.L., Wright M.M., McMaster Ch.R. – *Mol. Biol. of the Cell*, 2002, Sept., 13(9), p. 3148–3161.
15. Арицунни Г.Г., Батикян Т.Б., Тадевосян Ю.В. – *Биохимия*, 1999, т. 64, вып. 11, с. 1514–1518.
16. Zuniga G.E., Fernandez J., Cristi R., Alberdi M., Corcuera L.J. – *Phytochemistry*, 1990, v. 29, № 10, p. 3087.

Պ. Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ, Մ. Ռ. ԴԱՐԲԻՆՅԱՆ, Ժ. Վ. ՅԱՎՐՈՅԱՆ, Լ. Ա. ՄԻՆԱՍԵԿՅԱՆ

**ՅՈՐԵՆԻ ԾՆՈՂ ՍԵՐՄԵՐԻ ԿՈՐԻՉԱԹԱՂԱՆԹԻ ԵՎ ԶՐՈՄԱՏԻՆԻ
ՖՈՍՖՈԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ՏԱՐԲԵՐ
ԲՆՈՒՅԹԻ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈ**

Ամփոփում

Հետազոտված է ցորենի ծղող սերմերի կորիզային քաղանթի և քրոմատինի ֆոսֆոլիպիդային կազմը: Յույց է տրված, որ կորիզային ենթաֆրակցիաները՝ կորիզաթաղանթը և քրոմատինը, տարբերվում են ֆոսֆոլիպիդների կազմով և պարունակությամբ: Սերմերը հիբերելինով (ԴԿ₃) մշակելու դեպքում նրանց կորիզային ենթաֆրակցիայում տեղի է ունենում ֆոսֆոլիպիդների վերաբաշխում ըստ պարունակության: Յույց է տրված, որ ցորենի ծղող սերմերը միլիմետրական ալիքներով ճառագայթելիս կորիզաթաղանթի և քրոմատինի ֆոսֆոլիպիդները տարբերվում են ոչ միայն ըստ կազմի, այլև ըստ նրանց պարունակության: Հետազոտված կորիզային սուբֆրակցիաներում տարբեր բնույթի գործոնների նկատմամբ զգայունություն ցուցաբերում են ֆոսֆոլիպիդների տարբեր դասեր:

P. O. VARDEVANYAN, M. R. DARBINYAN, Zh. V. YAVROYAN, L. A. MINASBEKYAN

**CHANGES IN THE PHOSPHOLIPID CONTENTS OF NUCLEAR
MEMBRANE AND CHROMATIN OF GERMINATING CEREAL SEEDS
UNDER INFLUENCE OF DIFFERENT FACTORS**

Summary

The contents of chromatin phospholipid and nuclear membrane of germination cereal seeds have been investigated. It is shown, that the investigated nuclear sub fractions of cereal seedlings – nuclear membrane and chromatin differ in content and composition of phospholipids. At treatment of seeds with gibberellin (GA₃) has occurred the redistribution of phospholipids in content and composition. It is shown that specimens of nuclear membranes and chromatin of germinating cereal seeds differ both in content and composition of phospholipids. In studied nuclear sub fractions the sensibility to influence of factors of different nature show different classes of phospholipids.