

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.367

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДЛЯ ЙОДИДА ПРОПИДИЯ И РАЗРУШЕНИЕ ЯДЕР КЛЕТОК В ЭПИДЕРМИСЕ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА: ДЕЙСТВИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ И ДЕТЕРГЕНТОВ**Д.Б. Киселевский*, В.Д. Самуилов**

*Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: dkiselevs@mail.ru

Исследовали повреждение плазматической мембраны (ПМ) клеток в эпидермисе листьев гороха, определяемое по ее проницаемости для йодида пропидия (propidium iodide, PI), связывающегося с ДНК клеточных ядер, и программируемую клеточную смерть, регистрируемую по разрушению клеточных ядер. ПМ эпидермальных клеток в изолированном эпидермисе проницаема для PI (он окрашивал их ядра). ПМ устьичных клеток не пропускала PI. Индуктор программируемой клеточной смерти KCN вызывал разрушение ядер и эпидермальных, и устьичных клеток. KCN-индуцированный распад ядер устьичных клеток сопровождался проникновением PI в клетки. Поликатион хитозан в концентрации 0,1 мг/мл вызывал разрушение ядер эпидермальных клеток, а в концентрации 1 мг/мл приводил к возникновению проницаемости ПМ устьичных клеток для PI, окрашивающего их ядра. Другие поликатионы (цитохром с, полилизин, полиэтиленимин и протамин) тоже вызывали окрашивание ядер устьичных клеток PI. Полианионы (полиакриловая кислота, декстран и гепарин) инициировали разрушение клеточных ядер, которому сопутствовало проникновение PI в клетки. Детергенты тритон X-100 и лаурилдиметиламин-N-оксид индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI. KCN не вызывал разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе, обработанном детергентами. Обработка эпидермиса тритоном X-100 (в течение 2 ч с его последующей отмывкой) усиливала разрушение ядер устьичных клеток, вызванное KCN. Поликатионы полиэтиленимин и протамин предотвращали, а хитозан, цитохром с и полилизин, напротив, усиливали KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток. Результаты свидетельствуют о том, что разрушение клеточных ядер при индукции гибели клеток KCN или полианионами сопровождается повреждением ПМ (создающим ее проницаемость для PI). Повреждение ПМ, вызванное детергентами или поликатионами до обработки клеток KCN, может предотвращать или, напротив, усиливать разрушение клеточных ядер.

Ключевые слова: *программируемая клеточная смерть, плазматическая мембрана, детергенты, полиэлектролиты, хитозан, йодид пропидия*

Описаны две основные формы программируемой клеточной смерти (ПКС) у растений: 1) вакуолярная клеточная смерть, при которой наблюдается увеличение объема вакуоли и уменьшение объема цитоплазмы, и 2) некротическая клеточная смерть, которая сопровождается набуханием клеточных органелл и повреждением плазматической мембраны (ПМ) на ранних ее этапах [1]. При апоптозе, одной из форм ПКС у животных, целостность ПМ сохраняется даже после фрагментации клеточных ядер, вплоть до

финальной стадии процесса. Некроз, в отличие от апоптоза, ассоциирован с повреждением ПМ и последующей потерей внутриклеточного содержимого [2]. Нарушение ПМ, опосредованное специфическими порами и каналами, наблюдается при пироптозе и некроптозе — двух формах программируемого некроза, а также в ходе вторичного некроза на поздних стадиях апоптоза [3].

Представляет интерес вопрос о действии повреждения ПМ на гибель клеток растений:

можно ли инициировать ПКС в клетках с поврежденной ПМ? Механизм апоптоза у животных реализуется через активацию каспаз – специализированных цистеиновых протеаз, гидролизующих клеточные белки [4]. У растений есть принимающие участие в ПКС гидролитические ферменты, изолированные от цитоплазмы в клеточных компартментах. Среди них фитаспазы, которые синтезируются как неактивные белки-предшественники, созревая, выходят в апопласт и возвращаются в клетки при индукции ПКС [5]. Существуют и другие вовлеченные в ПКС у растений протеазы, локализованные в апопласте, вакуолях или эндоплазматическом ретикулуме – клеточных компартментах, отделенных от цитоплазмы мембраной [6]. Можно предположить, что повреждение клеточных мембран будет способствовать проникновению протеаз в цитоплазму и ПКС. С другой стороны, высвобождение клеточного содержимого через поврежденную ПМ, происходящее при непрограммируемом некрозе, может нарушить внутриклеточные процессы, включая ПКС.

Ранее была исследована гибель эпидермальных и устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха. KCN вызывал ПКС, которая сопровождалась разрушением клеточных ядер, подавлялась антиоксидантами и анаэробнозом, усиливалась при воздействии H_2O_2 [7], была чувствительна к ингибиторам синтеза белков [8], зависела от энергообеспечения [9]. Для KCN-индуцированной ПКС характерны черты апоптоза: маргинация и конденсация ядерного хроматина [10], распад клеточных ядер на фрагменты [7, 11], межнуклеосомная фрагментация ДНК [9, 11].

Хитозан, поли(β -1,4)-N-ацетилглюкозамин, полученный путем неполного деацетилирования хитина из панциря ракообразных, вызывал гибель эпидермальных, но не устьичных клеток. Подобно KCN, хитозан индуцировал ПКС, сопровождаемую разрушением клеточных ядер и межнуклеосомной фрагментацией ДНК, она подавлялась антиоксидантами и анаэробнозом, была чувствительна к ингибиторам синтеза белков и энергетического обмена [12]. Как компонент клеточной стенки грибов хитозан относится к PAMP (pathogen-associated molecular patterns, ассоциированные с патогенами молекулярные структуры) и представляет собой элиситор, вызывающий гиперчувствительный ответ – гибель клеток растения, ограничивающую дальнейшее распространение патогенов. У растений хитиновые олигосахариды распознаются трансмембранными рецептор-подобными белками [13]. Наряду с гибелью клеток растений,

хитозан может вызывать повреждение ДНК, изменения ядерного хроматина, экспрессию ассоциированных с патогенозом генов PR (pathogenesis-related), синтез фитогормонов и фитоалексинов, активацию MAP-киназ (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемые протеинкиназы), образование активных форм кислорода [14].

Хитозан – поликатион. Поликатионы нейтрализуют отрицательный поверхностный заряд мембран, обусловленный диссоциацией кислотных групп липидов и белков. Поликатионы полилизин, полиэтиленмин и протамин стимулировали образование сериновой протеиназы клетками *Bacillus subtilis*. Полианионы гепарин, полиакриловая кислота и декстран не обладали подобным действием [15]. Оптимальные концентрации поликатионов находились в нано- и микромолярном диапазоне, хотя для одновалентных катионов (Na^+ , K^+ , холин), вызывающих такой же эффект, она составляла 100 мМ. Поликатионы, используемые при генной трансформации для доставки ДНК в клетки, повышают проницаемость ПМ [16]. Хитозан увеличивал проницаемость ПМ клеток растений: вызывал высвобождение электролитов и белков из культивируемых клеток сои. Такое же действие на клетки растений оказывали другие поликатионы: полилизин, диэтиламиноэтилдекстран, протамин [17]. Хитозан индуцировал проникновение красителя йодида пропидия (propidium iodide, PI) в устьичные клетки эпидермиса из листьев гороха (PI не проходит через неповрежденную плазматическую мембрану) [18]. Предполагается, что хитозан, находящийся на наружной поверхности клеточной стенки некоторых фитопатогенных грибов (*Fusarium solani* – возбудитель фузариоза гороха, *Puccinia striiformis* – возбудитель ржавчины пшеницы), способствует оттоку питательных веществ из клеток растений в клетки грибов и проникновению ферментов грибов в клетки растений [17]. Детергенты тоже повреждают ПМ: тритон X-100 вызывал гемолиз эритроцитов (высвобождение гемоглобина), а в более высокой концентрации – солюбилизацию липидов [19].

В настоящей работе исследовано действие хитозана, других полиэлектролитов и детергентов на проницаемость ПМ для PI и на KCN-индуцированное разрушение ядер клеток в эпидермисе из листьев гороха.

Материалы и методы

Опыты проводили на пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев 7–15-суточных проростков гороха *Pisum sativum*

Л. сорта Альфа. Растения выращивали в условиях периодического освещения (свет/темнота — 16/8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ (250 Вт; Reflux, Россия) с интенсивностью 70–100 мкЕ/(м²·с) при 22–28°С. Пленки эпидермиса отделяли с нижней поверхности листьев пинцетом, помещали в бидистиллированную воду, после чего добавляли реагенты. Состав, последовательность добавок и дополнительные условия экспериментов представлены в подписях к рисункам.

Для определения состояния плазматической мембраны клеток использовали флуоресцирующий краситель PI, связывающийся с ДНК в клеточных ядрах и не проникающий через нативную мембрану [20]. Пленки эпидермиса окрашивали в течение 20 мин 2 мкМ PI (в вариантах с полиэтиленгликолем или протамином — 20 мкМ PI, поскольку при использовании 2 мкМ PI с этими соединениями выход флуоресценции мал). Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200M (Германия). Флуоресценцию PI возбуждали светом с длиной волны 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Определяли долю клеток с флуоресценцией PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер [7]. Эпидермис обрабатывали 5 мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1), промывали 10 мин этанолом и 5 мин водой для удаления фиксатора, окрашивали 20 мин гематоксилином Карazzi. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водопроводной водой и исследовали с помощью световой микроскопии. Определяли долю клеток с разрушенными ядрами и клеток, лишенных ядер.

В каждом варианте эксперимента исследовали 300–500 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. Эксперименты повторяли не менее 3 раз. Ниже приводятся данные типичных экспериментов, средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы. Гипотезу о значимых отличиях средних значений полученных выборок (контроля в сравнении с одним из вариантов опыта) проверяли с помощью t-критерия Стьюдента при уровне статистической значимости $p = 0,01$.

Для отмывки от детергентов пленки эпидермиса переносили в сосуд с 100 мл бидистилли-

рованной воды и, придерживая их пинцетом, отмывали 5 мин, снова переносили в сосуд с 100 мл бидистиллированной воды и отмывали 5 мин, затем переносили в бидистиллированную воду.

В экспериментах с полиэлектролитами использовали хитозан фирмы «Fluka», цитохром *c*, полилизин, полиэтиленмин, полиакриловую кислоту и декстран фирмы «Sigma-Aldrich», протамин ООО «Эллара», гепарин «Московского эндокринного завода». Молекулярные массы цитохрома *c*, полилизина, полиэтиленмина, протамин, полиакриловой кислоты, декстрана и гепарина — 12,4; 3; 5; 6; 1,2; 15 и 15 кДа, а их молярные концентрации при добавлении 1 мг/мл — 81, 333, 200, 167, 833, 67 и 67 мкМ, соответственно.

Результаты и обсуждение

В отделенных от листьев пленках эпидермиса PI флуоресцировал в ядрах эпидермальных, но не устьичных клеток (рис. 1). Инкубация пленок эпидермиса с детергентом тритоном X-100 вызывала флуоресценцию PI в ядрах

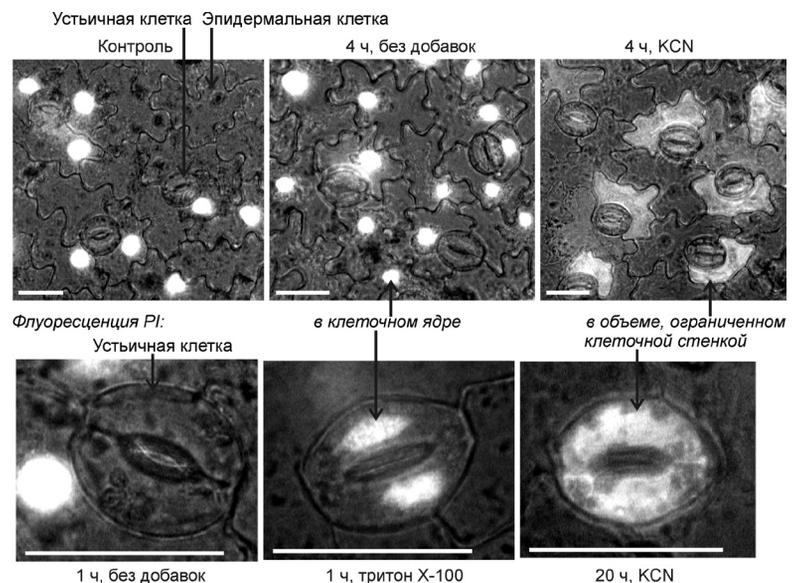


Рис. 1. Флуоресценция PI в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса сразу после отделения от листа (контроль) или после инкубации в бидистиллированной воде в течение 1, 4 или 20 ч (без добавок, с 2,5 мМ KCN или с 1 мМ тритона X-100) окрашивали PI (время инкубации и добавленные реагенты отмечены на рисунке). Масштабный отрезок — 20 мкм.

устьичных клеток. KCN после 4 ч воздействия разрушал ядра эпидермальных клеток, а после 20 ч — ядра устьичных клеток: флуоресценция PI в ядрах исчезала, появляясь в объеме, ограниченном клеточной стенкой. Разрушение ядер устьичных клеток сопровождалось проникновением PI в клетки (рис. 1). Эпидермальные клет-

ки сообщаются между собой и с клетками мезофилла с помощью плазмодесм, являясь частью симпласта листа. Устьичные клетки изолированы — связь через плазмодесмы имеется только между двумя соседними клетками, образующими устьице [21].

В изолированных пленках эпидермиса все устьичные клетки имеют ядра, но около 20–30% эпидермальных клеток лишены ядер

(рис. 2, А). Хитозан в концентрации 0,1 мг/мл индуцировал разрушение ядер эпидермальных, но не устьичных клеток (рис. 2, А), и не действовал на проницаемость их ПМ для PI (рис. 2, Б). Действуя как элиситор, хитозан вызывает гибель клеток растений [12, 22].

В концентрации 1 мг/мл хитозан не разрушал клеточных ядер (рис. 2, А), но вызывал проницаемость ПМ устьичных клеток для PI (рис. 2, Б). Другие поликатионы (цитохром с, полилизин, полиэтиленимин и протамин) оказывали сходное действие на клетки эпидермиса: не разрушали ядра (рис. 2, А), но индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI (рис. 2, Б). Полианионы (полиакриловая кислота, декстран и гепарин) индуцировали разрушение ядер эпидермальных и устьичных клеток (рис. 2, А), сопровождавшееся проникновением PI в устьичные клетки и его флуоресценцией в объеме, ограниченном клеточной стенкой (рис. 2, Б).

В эксперименте, данные которого представлены на рис. 3, пленки эпидермиса обрабатывали детергентами или поликатионами и убеждались в том, что эта обработка вызывает проницаемость ПМ устьичных клеток для PI, определяемую по его флуоресценции в клеточных ядрах. Оставшиеся неокрашенными PI пленки эпидермиса, содержащие клетки с ПМ, поврежденной детергентами или поликатионами, инкубировали с KCN и определяли разрушение ядер устьичных клеток. В контроле (без детергентов и поликатионов) KCN вызывал разрушение ядер в ~ 70% устьичных клеток. Детергенты тритон X-100 или лаурилдиметиламин-N-оксид (ЛДАО) индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI. KCN не вызывал разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе, обработанном детергентом (рис. 3). Однако в эпидермисе, обработанном тритоном X-100 в течение 2 ч, а затем отмытом от детергента, KCN вызывал разрушение ядер у 100%

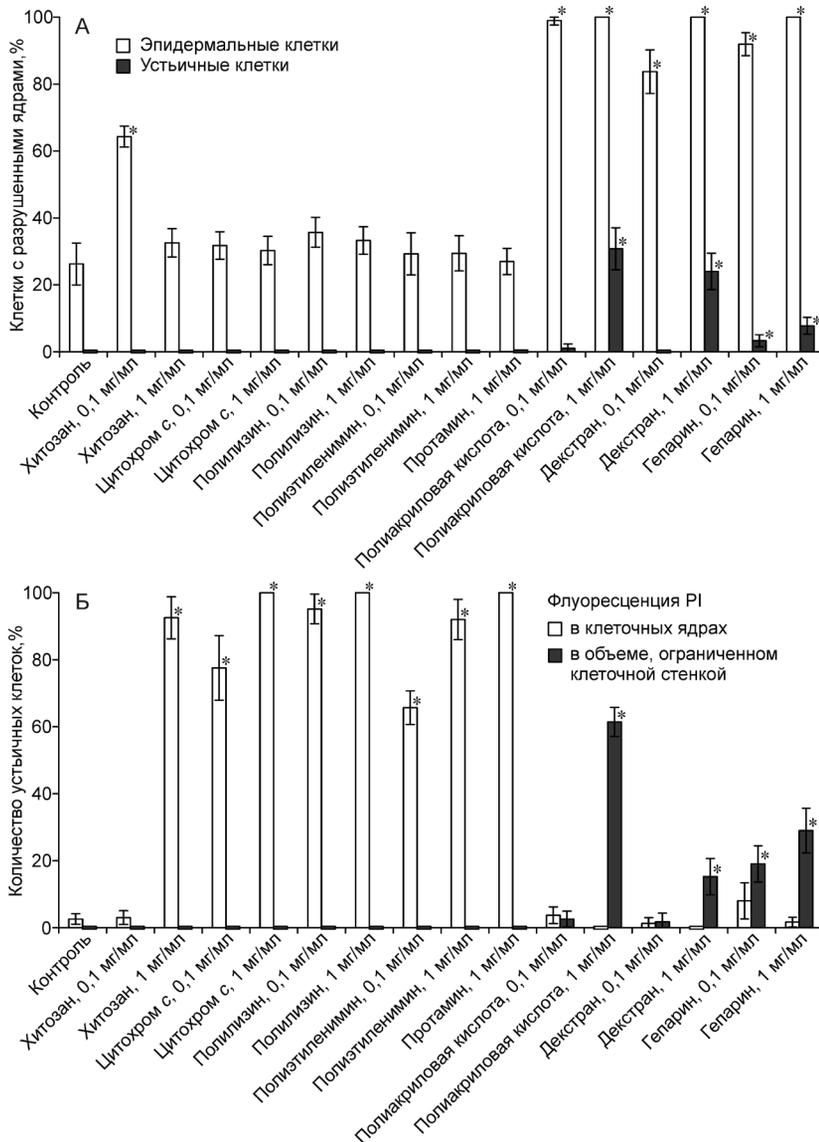


Рис. 2. Действие поликатионов и полианионов на состояние ядер эпидермальных и устьичных клеток (А) и на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI (Б) в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса инкубировали в бидистиллированной воде без добавок (контроль) или с полиэлектролитами при перемешивании на магнитной мешалке 30 мин и еще 3 ч без перемешивания. После инкубации у части пленок эпидермиса определяли количество клеток с разрушенными ядрами (А). Оставшиеся пленки эпидермиса окрашивали PI и регистрировали флуоресценцию PI в устьичных клетках (Б). Представлены средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы. * — варианты, имеющие значимые отличия от контроля ($p < 0,01$).

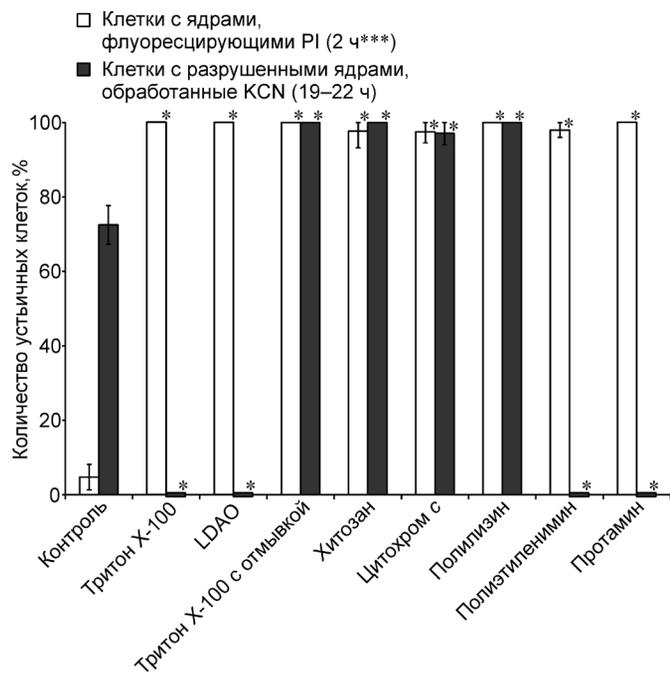


Рис. 3. Действие детергентов и поликатионов на проницаемость плазматической мембраны для PI и KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса инкубировали в бидистиллированной воде без добавок (контроль), с 1 мМ детергентами (третон X-100 или ЛДАО) или 1 мг/мл поликатионов (хитозан, цитохром с, полиэтиленимин или протамин) в течение 2 ч с перемешиванием на магнитной мешалке. *** – варианты без добавок (контроль) и с хитозаном инкубировали 4 ч. После инкубации часть пленок эпидермиса окрашивали PI и регистрировали флуоресценцию PI в ядрах устьичных клеток. Часть пленок отмывали от третона X-100 в бидистиллированной воде. К оставшимся неокрашенным пленкам эпидермиса добавляли 2,5 мМ KCN и инкубировали 19–22 ч на свету, затем определяли количество клеток с разрушенными ядрами. Представлены средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы. * – варианты, имеющие значимые отличия от контроля ($p < 0,01$).

устьичных клеток. Поликатионы хитозан, цитохром с и полилизин усиливали KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток, а полиэтиленимин и протамин подавляли его (рис. 3).

Поликатионы хитозан, цитохром с, полилизин, полиэтиленимин и протамин индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI, а полианионы (полиакриловая кислота, декстран и гепарин) вызывали разрушение ядер эпидермальных и устьичных клеток (рис. 2). Разрушение ядер клеток в эпидермисе гороха при индукции гибели клеток KCN или полианионами сопровождалось проникновением PI в клетки и его флуоресценцией в объеме, ограни-

ченном клеточной стенкой (рис. 1 и 2). Повреждение ПМ (ее проницаемость для PI), вызванное детергентами или поликатионами, может как предотвращать, так и усиливать KCN-индуцированное разрушение клеточных ядер (рис. 3).

Подавление KCN-зависимого разрушения ядер при повреждении ПМ может быть связано с частичной потерей клеточного содержимого и нарушением внутриклеточных процессов, в том числе процесса распада клеточных ядер. То же самое происходит при непрограммируемой некрозе [2]. Известно, что тип гибели клетки может зависеть от силы воздействия на нее: в ооцитах человека 50 мкМ H_2O_2 вызывал преимущественно апоптоз, а 1 мМ H_2O_2 – некроз, детектируемый с помощью PI [23]. Эффект детергента третона X-100 согласуется с этим: предотвращение разрушения ядер наблюдали при длительном воздействии детергента (рис. 3), но не при краткосрочном (с отмывкой).

Следует также учитывать, что поликатионы могут взаимодействовать с ядерной ДНК. Протамины – это семейство небольших белков, обогащенных остатками аргинина, которые связываются с ДНК, способствуя уплотнению генома и переводя его в неактивное состояние [24]. Полиэтиленимин используется для доставки ДНК в трансформируемые клетки. Как переносчик ДНК он эффективнее, чем полилизин. Полиэтиленимин вытесняет из ДНК связанный с ней бромистый этидий [25]. По-видимому, полиэтиленимин или протамин также мешают окрашиванию ядерной ДНК с помощью PI (см. раздел «Материалы и методы»). Не исключено, что эти поликатионы могут препятствовать действию нуклеаз и предотвращать распад клеточных ядер.

Стимуляция KCN-индуцированного разрушения ядер детергентом или поликатионами (рис. 3) предположительно обусловлена тем, что повреждение ПМ и других клеточных мембран обеспечивает доступ протеаз, подобных фитаспазам [5, 6], к цитоплазме и способствует гибели клетки. Будет ли происходить усиление или подавление разрушения ядер – это зависит от химического агента и условий обработки им клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке из средств федерального бюджета (регистрационный номер научно-исследовательской работы в ЦИТИС: АААА-А16-116021660081-0). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.L., et al.* Morphological classification of plant cell deaths // *Cell Death Differ.* 2011. Vol. 18. N 8. P. 1241–1246.
2. *Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell Death Differ.* 2009. Vol. 16. N 1. P. 3–11.
3. *Zhang Y., Chen X., Gueydan C., Han J.* Plasma membrane changes during programmed cell deaths // *Cell Research.* 2018. Vol. 28. N 1. P. 9–21.
4. *Julien O., Wells J.A.* Caspases and their substrates // *Cell Death Differ.* 2017. Vol. 24. N 8. P. 1380–1389.
5. *Chichkova N.V., Tuzhikov A.I., Taliansky M., Vartapetian A.B.* Plant phytoapoptases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity // *Physiol. Plant.* 2012. Vol. 145. N 1. P. 77–84.
6. *Thomas E.L., van der Hoorn R.A.L.* Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. N 2: 639.
7. *Samuilov V.D., Lagunova E.M., Kiselevsky D.B., Dzyubinskaya E.V., Makarova Ya.V., Gusev M.V.* Participation of chloroplasts in plant apoptosis // *Biosci. Rep.* 2003. Vol. 23. N 2–3. P. 103–117.
8. *Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Bakeeva L.E., Samuilov V.D.* Programmed cell death in plants: effect of protein synthesis inhibitors and structural changes in pea guard cells // *Biochemistry (Mosc.).* 2006. Vol. 71. N 4. P. 395–405.
9. *Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Shestak A.A., Samuilov V.D.* Death of stoma guard cells in leaf epidermis under disturbance of energy provision // *Biochemistry (Mosc.).* 2006. Vol. 71. N 10. P. 1120–1127.
10. *Bakeeva L.E., Dzyubinskaya E.V., Samuilov V.D.* Programmed cell death in plants: ultrastructural changes in pea guard cells // *Biochemistry (Mosc.).* 2005. Vol. 70. N 9. P. 972–979.
11. *Kiselevsky D.B., Kuznetsova Y.E., Vasil'ev L.A., Lobysheva N.V., Zinovkin R.A., Nesov A.V., Shestak A.A., Samuilov V.D.* Effect of Ca²⁺ on programmed death of guard and epidermal cells of pea leaves // *Biochemistry (Mosc.).* 2010. Vol. 75. N 5. P. 614–622.
12. *Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Zinovkin R.A., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Samuilov V.D.* Chitosan-induced programmed cell death in plants // *Biochemistry (Mosc.).* 2009. Vol. 74. N 9. P. 1035–1043.
13. *Liu B., Li J.-F., Ao Y., Qu J., Li Z., Su J., Zhang Y., Liu J., Feng D., Qi K., He Y., Wang J., Wang H.-B.* Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity // *Plant Cell.* 2012. Vol. 24. N 8. P. 3406–3419.
14. *Hadwiger L.A.* Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype // *Plant Sci.* 2013. Vol. 208. P. 42–49.
15. *Artemov A.V., Samuilov V.D.* Effect of polyelectrolytes on serine proteinase secretion by *Bacillus subtilis* // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 262. N 1. P. 33–35.
16. *Prevette L.E., Mullen D.G., Banaszak Holl M.M.* Polycation-induced cell membrane permeability does not enhance cellular uptake or expression efficiency of delivered DNA // *Mol. Pharm.* 2010. Vol. 7. N 3. P. 870–883.
17. *Young D.H., Kühle H., Kauss H.* Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris cells // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70. N 5. P. 1449–1454.
18. *Kiselevsky D.B., Frolova O.Y., Solovyev A.G., Dorokhov Y.L., Morozov S.Y., Samuilov V.D.* Plant cell death caused by fungal, bacterial, and viral elicitors: protective effect of mitochondria-targeted quinones // *Biochemistry (Mosc.).* 2014. Vol. 79. N 12. P. 1322–1332.
19. *Rodi P.M., Bocco Gianello M.D., Corregido M.C., Gennaro A.M.* Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1838. N 3. P. 859–866.
20. *Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // *Cytometry.* 1992. Vol. 13. N 8. P. 795–808.
21. *Luttge U., Higinbotham N.* Transport in plants. N.Y.: Springer Verlag, 1979. 468 pp.
22. *Iriti M., Sironi M., Gomarasca S., Casazza A.P., Soave C., Faoro F.* Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco // *Plant Physiol. Biochem.* 2006. Vol. 44. N 11–12. P. 893–900.
23. *Zhang X., Li X.H., Ma X., Wang Z.H., Lu S., Guo Y.L.* Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2006. Vol. 13. N 6. P. 451–458.
24. *Balhorn R.* The protamine family of sperm nuclear proteins // *Genome Biol.* 2007. Vol. 8. N 9: 227.

25. Vuorimaa-Laukkanen E., Lisitsyna E.S., Ketola T.M., Morin-Pickardat E., Liang H., Hanzlíková M., Yliperttula M. core-shell dynamics of polyethyleneimine and poly(l-lysine) DNA polyplexes // Eur. J. Pharm. Sci. 2017. Vol. 103. P. 122–127.

Поступила в редакцию 28.02.2019 г.

После доработки 31.05.2019 г.

Принята в печать 20.06.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

PERMEABILITY OF THE PLASMA MEMBRANE FOR PROPIDIUM IODIDE AND DESTRUCTION OF CELL NUCLEI IN THE EPIDERMIS OF PEA LEAVES: THE EFFECT OF POLYELECTROLYTES AND DETERGENTS

D.B. Kiselevsky*, V.D. Samuilov

*Department of Immunology, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: dkiselevs@mail.ru

Damage to the plasma membrane (PM) of cells in pea leaf epidermis, determined by its permeability to propidium iodide (PI), which binds to DNA of cell nuclei, and programmed cell death (PCD) detected by the destruction of cell nuclei was investigated. PM of the epidermal cells in the isolated epidermis was permeable to PI (it stained their nuclei). PM of the guard cells did not allow PI to pass through. KCN, an inducer of PCD, caused the destruction of the both epidermal and guard cell nuclei. KCN-Induced destruction of guard cell nuclei was accompanied by the penetration of PI into the cells. The polycation chitosan at a concentration of 0.1 mg/ml caused the destruction of the epidermal cell nuclei, but at a concentration of 1 mg/ml, the permeability of the guard cell PM for PI staining their nuclei was induced. Other polycations (cytochrome *c*, polylysine, polyethylenimine and protamine) also caused staining of the guard cell nuclei by PI. Polyanions (polyacrylic acid, dextran and heparin) initiated the destruction of cell nuclei, which was accompanied by the penetration of PI into cells. Detergents Triton X-100 and lauryldimethylamine-N-oxide produced the permeability of the guard cell PM for PI and prevented the destruction of the nuclei that was induced by KCN. Treatment of the epidermis with Triton X-100 (for 2 h with its subsequent washing) increased the destruction of the guard cell nuclei that was caused by KCN. Polycations polyethyleneimine and protamine were prevented, while chitosan, cytochrome *c*, and polylysine, on the contrary, enhanced KCN-induced destruction of the guard cell nuclei. The data obtained shows that the destruction of cell nuclei upon induction of cell death with KCN or polyanions is accompanied by damage to PM (producing its permeability for PI). Damage to PM caused by detergents or polycations prior to cell treatment by KCN, can prevent or, on the contrary, intensify the destruction of cell nuclei.

Keywords: *programmed cell death, plasma membrane, detergents, polyelectrolytes, chitosan, propidium iodide*

Сведения об авторах

Киселевский Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru

Самуилов Виталий Дмитриевич — докт. биол. наук, проф., гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru