

УДК 615.015

ДЕЙСТВИЕ МЕТОТРЕКСАТА НА ПЕРВИЧНЫЙ РОСТ КОРНЕЙ *ALLIUM CEPA*

Буданцев А.Ю., Кутышенко В.П.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»,
Пушино, e-mail: budantsev@mail.ru

Показано, что метотрексат приводит к полной остановке роста корней лука (*Allium cepa*) при минимальной концентрации 10^{-8} – 10^{-9} М. Проводилось измерение динамики роста корней и состояние митотического аппарата клеток апикальной меристемы методом «давленных» препаратов. Действие метотрексата проявляется уже в течение первых 30 мин (концентрация метотрексата $2 \cdot 10^{-7}$ М) и сохраняется в течение нескольких дней. Изучен спектр поглощения (максимумы 222, 258, 303 и 371,5 нм) и ЯМР-спектр метотрексата (8,6; 8,2; 7,7; 6,9; 3,2 ppm и триплет линий в области 2,0–2,3 ppm). При инкубации с корнями в ЯМР-спектрах метотрексата наблюдаются изменения, по-видимому, свидетельствующие о метаболическом разрушении данного препарата во время инкубации. Показано, что под действием метотрексата клетки корневого апекса претерпевают сильные дегенеративные изменения.

Ключевые слова: метотрексат, ЯМР-спектры, апекс корня

THE ACTION OF METHOTREXATE ON THE GROWTH OF *ALLIUM CEPA* ROOTS

Budantsev A.Y., Kutysenko V.P.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Puschino, e-mail: budantsev@mail.ru

It is shown that methotrexate leads to a complete stop root growth of onion (*Allium cepa*) with a minimum concentration of 10^{-8} – 10^{-9} M. We measured the dynamics of root growth and the state of the mitotic cells of the apical meristem by «squash preparation». The action of the methotrexate is already apparent within the first 30 min (the concentration of methotrexate – $2 \cdot 10^{-7}$ M) and persists for several days. The absorption spectrum (maxima 222, 258, 303 and 371,5 nm) and NMR spectrum methotrexate (8.6; 8.2; 7.7; 6.9; 3.2 ppm and a triplet lines in the region 2.0–2.3 ppm) were studied. When incubated with roots in the NMR spectra of methotrexate changes are observed, apparently indicating the metabolic destruction of methotrexate during incubation. It is shown that under the action of the methotrexate root apex cells undergo severe degenerative changes.

Keywords: methotrexate, NMR-spectrum, root apical cells

Один из антагонистов фолиевой кислоты – метотрексат (аметоптерин) – способен блокировать биосинтез нуклеиновых кислот и митоз [8]. В экспериментальной биологии метотрексат (МТ) используется при тестировании клеточных штаммов на устойчивость к ядам, антиметаболитам, при отборе клеточных линий – продуцентов в клеточной биотехнологии. МТ является широко известным препаратом для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний [1, 3].

Имеются данные, что МТ блокирует первичный рост корней *Allium cepa* и цитостатическое действие этого препарата можно тестировать с помощью Allium-теста, который широко используется для анализа биологического действия антиметаболитов, в частности, цитостатиков [7, 9]. Ингибиторное действие МТ на рост корней связано с высокой митотической активностью клеток в зоне меристемы корневого апекса при морфогенезе тканей в корнях.

В последние годы получен ряд новых данных о молекулярных механизмах действия МТ [8], в частности, в связи с исследованием биологического действия цито-

статиков и проблемой программируемой клеточной смерти [1].

В данной работе приведены результаты изучения действия МТ на первичный рост корней *Allium cepa* и изменение микроморфологии клеток в апексе корня.

Материал и методы исследования

Объект исследования. Эксперименты проводились на луковицах *Allium cepa* первого года развития (сорт Штутгартер ризен) в водной культуре. Для измерения роста корней пророст корней ежедневно регистрировался цифровым фотоаппаратом. Длина корней измерялась на фотографиях при помощи программы PhotoM (вер. 1.21). Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы Statistica 6.0.

В опытах использовались 2 препарата метотрексата:
а) фирмы ООО «ЛЭНС-ФАРМ», г. Одинцово, Московской обл. (раствор с исходной концентрацией $1,1 \cdot 10^{-2}$ М);

б) фирмы «Эбеве», Австрия (раствор с исходной концентрацией $2,2 \cdot 10^{-2}$ М).

Гистологический анализ. Образцы корешков (апекс) фиксировались в фиксаторе Карнуа. Апикальная часть корней окрашивалась кислым кармином по методу Сноу, в модификации Сухаревой и Батурина [5].

«Давленные» препараты готовились по стандартной методике с использованием мацерации в 45 %

уксусной кислоте. Просмотр и фотографирование препаратов проводились на инвертированном микроскопе IX-71 с цифровым аппаратом Olympus-330.

Оптические спектры поглощения растворов МТ измерялись на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 РС.

ЯМР-спектры снимались на ЯМР-спектрометре «AVANCE 600» фирмы «BRUKER», с рабочей частотой 600,13 МГц.

Результаты исследования и их обсуждение

В течение пяти дней роста наблюдается нелинейное увеличение длины корней в 4–6 раз по сравнению с первым днем

(«нулевое время»). Скорость роста корней составляла 0,1–0,7 мм/ч. Раствор МТ в воде устойчив во времени при хранении при +4 °С в течение не менее десяти суток, что подтверждается постоянством положения пиков в спектре поглощения: 222, 258, 303 и 371,5 нм. ЯМР-спектры растворов двух использованных препаратов МТ практически идентичны.

В табл. 1. приведены данные одного из опытов, в котором определялась минимальная действующая концентрация МТ, блокирующая первичный рост корней.

Таблица 1

Влияние разных концентраций МТ на рост корней

ВР*	Контроль		МТ			
	1 (n = 5)	2 (n = 5)	$2,2 \cdot 10^{-6}$ (n = 5)	$2,2 \cdot 10^{-7}$ (n = 5)	$2,2 \cdot 10^{-8}$ (n = 5)	$2,2 \cdot 10^{-9}$ (n = 5)
0 час	13,2 ± 0,5**	15,1 ± 0,3	13,7 ± 0,7	11,8 ± 0,2	14,1 ± 0,2	16,1 ± 0,6
Через 28,5 ч	27,9 ± 1,7 +2,1***	27,9 ± 1,4 +1,8	13,5 ± 0,7 –	14,1 ± 0,3 –	16,9 ± 1,2 +1,2	30,7 ± 1,7 +1,9
Через 52,5 ч	37,6 ± 1,0 +2,8	34,2 ± 0,6 +2,3	13,6 ± 0,3 –	13,5 ± 0,6 –	18,9 ± 1,4 +1,3	41,3 ± 0,7 +2,6
Через 78 ч	52,8 ± 1,3 +4,0	51,0 ± 0,6 +3,4	11,6 ± 0,4 –	13,0 ± 0,5 –	19,5 ± 1,3 +1,4	51,8 ± 0,7 +3,2

Примечание. * – время от начала опыта; ** – длина корней в мм; *** – прирост корней относительно «нулевого» времени.

Видно, что минимальная действующая доза МТ на рост корней равна $2,2 \cdot 10^{-8}$ М. Рост корней при концентрации $2,2 \cdot 10^{-9}$ М в среде роста не отличается от нормального роста в контроле.

В серии опытов изучался вопрос об обратимости ингибирующего действия МТ на рост корней. Луковицы с растущими кор-

нями помещались в раствор МТ на 15 мин, 30 мин, 1 ч и 2 ч, затем корни трижды промывались водой и дальнейший рост проходил в воде. В другом варианте корни росли в растворе МТ в течение всего опыта. В контрольных сосудах корни постоянно росли в воде. Результаты одного из опыта этой серии приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние разного времени действия МТ на рост корней (концентрация метотрексата $2,2 \cdot 10^{-7}$ М, обозначения см. табл. 1)

ВР	Контроль		Метотрексат $2,2 \cdot 10^{-7}$ М			
	1	2	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч
0 ч	6,2 ± 0,4	6,5 ± 0,5	6,6 ± 0,3	6,5 ± 0,3	7,3 ± 0,1	7,5 ± 0,5
24 ч	18,1 ± 1,0 +3,0	14,7 ± 2,5 +2,7	12,2 ± 1,1 +1,8	8,9 ± 0,2 +1,4	8,3 ± 0,6 +1,1	8,2 ± 0,1 +1,1
48 ч	34,2 ± 0,5 +5,5	27,5 ± 1,9 +4,2	15,0 ± 1,5 +2,3	9,0 ± 0,3 +1,4	9,3 ± 0,4 +1,3	8,8 ± 0,5 +1,2
72 ч	41,2 ± 0,6 +6,6	29,6 ± 1,3 +4,5	17,0 ± 1,4 +2,6	9,8 ± 0,5 +1,5	10,0 ± 1,1 +1,4	9,1 ± 1,1 +1,2
96 ч	51,4 ± 0,6 +8,3	36,4 ± 2,0 +5,6	19,7 ± 0,9 +3,0	9,9 ± 0,5 +1,5	11,5 ± 1,2 +1,6	11,8 ± 1,4 +1,6
120 ч	53,8 ± 0,5 +8,7	42,4 ± 0,9 +6,5	21,6 ± 1,3 +3,3	10,6 ± 0,4 +1,6	15,6 ± 1,4 +2,1	13,3 ± 0,9 +1,8
168 ч	51,6 ± 0,2 +8,3	42,1 ± 1,8 +6,5	16,9 ± 2,2 +2,6	11,6 ± 0,8 +1,8	19,8 ± 0,4 +2,7	12,3 ± 1,2 +1,6

Видно, что обработка корней МТ в течение 15 мин приводит к необратимому ингибированию роста корней. В серии опытов, где использовалась концентрация МТ $2,2 \cdot 10^{-6}$ М этот эффект был выражен еще сильнее.

В ЯМР-спектре чистого МТ четко выявляются линии со значениями 8,6; 8,2; 7,7; 6,9; 3,2 ppm и триплет линий в области 2,0–2,3 ppm. При инкубации с корнями лука в течение 2 ч практически сохраняются основные линии в спектре МТ. Однако после 24 ч инкубации в спектре пропадают линии в области 6,9–8,6 ppm, что может указывать на метаболическое разрушение исходного МТ и появление метаболитов в области 1,0–4,5 ppm.

Морфологический анализ клеток апекса корня при действии МТ показал, что при действии МТ в препаратах полностью отсутствуют клетки в состоянии митоза. Многие клетки теряют четкие границы, приобретают сморщенный вид. Аналогично ядра более плотные, имеют пикнотический вид, ядрышки не выявляются. Вообще ткань более плотная и труднее подвергается мацерации и раздавливанию. Микроморфологический анализ препаратов показал, что площадь клеток и ядер в опыте уменьшается приблизительно в два раза (табл. 3). Форма клеток практически не изменяется (отношение длины к ширине, длина измерялась вдоль колонок клеток, а ширина поперек колонок).

Таблица 3

Микрометрические параметры клеток апекса корня в контроле и при действии МТ (*n* – число измеренных клеток)

Параметры	M ± m	n	M ± m	n
	Контроль		МТ	
Длина клеток, мкм	29,5 ± 0,7	54	24,5 ± 0,5	51
Ширина клеток, мкм	24,4 ± 0,4	54	17,1 ± 0,4	51
Площадь клеток, мкм ²	708,9 ± 21,9	53	417,5 ± 11,8	60
Площадь ядер, мкм ²	261,6 ± 7,5	54	95,1 ± 2,7	60

Примечание. Попарное сравнение параметров клеток в контроле и при действии МТ: разница достоверна ($P < 0,95$; критерий Стьюдента).

Цитологический анализ клеток корневого апекса после действия МТ показал сильные дегенеративные изменения в клетках в области апикальной меристемы. Ранее отмечалось, что в клетках меристемы практически полностью исчезают митозы и клетки задерживаются в стадии S клеточного цикла. Для клеток животных такие данные получены во многих работах, проведенных на целых животных или в опытах с культурой клеток [1]. Полученные нами данные представляют интерес с точки зрения представлений об апоптозе или запрограммированной смерти клеток у растений, которые в настоящее время активно развиваются [4]. Для животных представления о дегенерации опухолевых клеток по типу апоптоза под действием МТ сейчас практически не вызывают сомнения [1, 8]. Можно ли отнести полученные нами результаты как цитологическое выражение программируемой клеточной смерти клеток меристемы корневого апекса при нарушении синтеза ДНК под действием МТ? Наверное, такой вывод преждевременен, хотя по всем морфологическим признакам наблюдаемые нами дегенеративные изменения соответствуют описаниям программируемой клеточной смерти (апоптоза) у растительных клеток [4].

Вопрос о механизме действия МТ на рост корней также требует дополнительных исследований. В настоящее время установлено, что для проявления ингибирующего действия на дигидрофолатредуктазу МТ должен превратиться в активную форму (метотрексатполиглутамат) под действием фолиополиглутаматсинтетазы [1, 8]. Для растительных клеток вопрос о такой «активации» МТ пока остается открытым.

Наконец, представляет интерес вопрос о судьбе МТ в процессе его действия на клетки меристемы в корневом апексе. Известно, что МТ, введенный в организм пациентов, метаболизируется с образованием одного из главных метаболитов – 7-гидроксиМТ, который определяется с помощью ферментного иммуноанализа и жидкостной хроматографии. С использованием ЯМР-спектроскопии нами показано, что в инкубационной среде в ходе роста корней на фоне МТ происходит выделение в среду ряда соединений, и исчезновение в ЯМР-спектрах линии в области 6,9–8,6 ppm, характерных для МТ. Эти данные показывают, что по крайней мере через 24 ч МТ разрушается в инкубационной среде, и наблюдаемое нами прекращение роста корней становится необратимым уже в первые часы действия МТ.

В настоящее время ЯМР-спектроскопия высокого разрешения активно используется при изучении метаболизма физиологически активных соединений природного происхождения [2]. Мы считаем, что использование ЯМР-спектроскопии в сочетании с прямыми биохимическими методами анализами представляется перспективным для исследования метаболизма в ткани меристемы корневого апекса под действием МТ и других антиметаболитов [6].

Концепция «аллиум-теста» для определения биологической активности цитостатиков и других антиметаболитов, сформулированная Г. Дейссоном больше полувека назад, с нашей точки зрения, сохраняет актуальность в настоящее время [7] в связи с расширением работ в области поиска новых цитостатиков для химиотерапии онкологических и аутоиммунных болезней [1, 3]. Однако требуется модификация этого теста на основе современных данных о молекулярном действии метотрексата на клеточный цикл [8].

Выводы

1. МТ приводит к полной остановке роста корней лука (*Allium cepa*). Минимальная действующая концентрация МТ лежит в области 10^{-8} – 10^{-9} М.

2. Ингибирующее действие МТ проявляется уже при действии в течение первых 30 мин действия на корни (концентрация МТ $2 \cdot 10^{-7}$ М) и сохраняется в течение нескольких дней после его отмывки.

3. Спектр поглощения МТ имеет 4 полосы поглощения в ультрафиолетовой области спектра (222, 258, 303 и 371,5 нм). ЯМР-спектры МТ содержат несколько пиков (8,6; 8,2; 7,7; 6,9; 3,2 ppm и триплет линий в области 2,0–2,3 ppm).

4. При инкубации с корнями в ЯМР-спектрах инкубационного раствора наблюдаются изменения, по-видимому, свидетельствующие о метаболическом разрушении МТ в процессе взаимодействия с корневой системой лука.

5. Цитологический анализ показал, что под действием МТ клетки меристемы корневого апекса претерпевают сильные дегенеративные изменения.

Работа поддержана грантом РФФИ, проект № 07-04-00510.

Список литературы

1. Владимирская Е.Б. Биологические основы противоопухолевой терапии. – М.: Агат-Мед., 2001. – С. 61–62
2. Кутышенко В.П., Степанов А.А., Сусликов А.В., Чайлахян Л.М. ЯМР-спектроскопия высокого разрешения как

метод исследования биологических жидкостей человека в норме и патологии // ДАН. – 2006. – т. 410. – № 4. – С. 556–559.

3. Насонов Е.Л. Метотрексат. Перспективы применения в ревматологии. – М.: Филоматис, 2005. – С. 196.

4. Самуилов В.Д. Программируемая клеточная смерть у растений // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – т. 10. – № 10. – Р. 12–17.

5. Сухарева Н.Б., Батурич С.О. Усовершенствование методики приготовления постоянных цитологических препаратов // Ботан. журнал. – 1994. – т. 79. – № 7. – Р. 131–133.

6. Budantsev A.Yu., Uversky V.N., Kuthischenko V.P. Analysis of the Metabolites in Apical Area of Allium Cepa Roots by High Resolution NMR Spectroscopy Method // Protein and Peptide Letter. – 2010. – Vol. 17. – № 1. – Р. 86–91.

7. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. – 1985. – Vol. 102. – Р. 99–112.

8. Nevozhaj D.V., Budzynskaya R., Kan'skaya U., Yagello M., Boratyn'skay Yu. Modern ideas about the mechanism of antineoplastic action of merhotrexate and resistance to it // Pacific Medical J. – 2006. – № 4. – Р. 12–16

9. Truchaut R., Deysson G. Sur les proprietes antimitotiques des antifoliques. Recherches a l'aide du tesy allium // Biochem. Pharmacol. – 1964. – Vol. 13. – Р. 1197.

References

1. Vladimirskaja E.B. Biologicheskie osnovy protivopuhoлеvoj terapii., M.: Agat-Med., 2001, pp. 61–62

2. Kutyschenko V.P., Stepanov A.A., Suslikov A.V., Chajlahjan L.M. JaMR-spektrskopija vysokogo razreshenija kak metod issledovanija biologicheskikh zhidkostej cheloveka v norme i patologii, DAN, 2006, t. 410, no. 4, pp. 556–559.

3. Nasonov E.L. Metotrexat. Perspektivy primeneniya v revmatologii. M., Filomatis, 2005, pp.196.

4. Samuilov V.D. Programmiruemaja kletochnaja smert' u rastenij // Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal, 2001, t.10, no. 10, pp. 12–17.

5. Suhareva N.B., Baturin S.O. Usovershenstvovanie metodik prigotovlenija postojannyh citologicheskikh preparatov, Botan.zhurnal., 1994, t.79, no. 7, pp. 131–133.

6. Budantsev A.Yu., Uversky V.N., Kuthischenko V.P. Analysis of the Metabolites in Apical Area of Allium Cepa Roots by High Resolution NMR Spectroscopy Method // Protein and Peptide Letter. 2010. Vol. 17. no. 1. pp. 86–91.

7. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. 1985. Vol. 102. pp. 99–112.

8. Nevozhaj D.V., Budzynskaya R., Kan'skaya U., Yagello M., Boratyn'skay Yu. Modern ideas about the mechanism of antineoplastic action of merhotrexate and resistance to it // Pacific Medical J. 2006. no. 4. pp. 12–16

9. Truchaut R., Deysson G. Sur les proprietes antimitotiques des antifoliques. Recherches a l'aide du tesy allium // Biochem. Pharmacol. 1964. Vol. 13. pp. 1197.

Рецензенты:

Брусков В.И., д.х.н., профессор, зав. лабораторией изотопных исследований, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино;

Рощина В.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микроспектрально-го исследования клеток, Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.