

Блокирование энергообеспечения и отсутствие фрагментации ДНК при гибели клеток пчел

Ю. А. Протас, И. Г. Багрий

Институт пчеловодства им. П. И. Прокоповича ААН Украины
252145, Киев, ул. Академика Заболотного, 19

Показано, что гибель пчел не связана с фрагментацией ДНК. У пчел из слабых семей значительно снижена активность ферментов, обеспечивающих катаболизм глюкозы и фруктозы как в цитоплазме, так и в митохондриях. Активность некатаболических ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы) не изменяется. Показано также снижение уровня биосинтеза белка и некоторые нарушения в функции митохондрий. В частности, величина генерируемого трансмембранного потенциала одинакова как в присутствии АДФ, так и АТФ, тогда как в норме последнее весьма ограничено. Предполагается, что процесс деградации ДНК как механизм апоптоза возник на более поздних стадиях эволюции. Исходным механизмом апоптоза является специфическое подавление активности процессов катаболизма и энергообеспечения.

Введение. Гипотеза о существовании генетической программы гибели клеток (более известная под термином «апоптоз»), наступающей как в результате процессов дифференциации, так и под влиянием экзогенных повреждающих факторов [1], в настоящее время получила многочисленные экспериментальные подтверждения. Общепринято, что собственно смерть наступает после включения механизма самоликвидации генома вследствие гидролиза ДНКазами. Одно из важнейших значений этого явления — участие в эволюционном процессе. Следовательно, механизм деградации генома должен существовать и у организмов, находящихся на значительно более низких эволюционных уровнях.

Исследователям, работающим с пчелами, хорошо известно явление весенней гибели пчел. В норме зимующие пчелы доживают практически до мая, обеспечивая появление нового поколения. Однако довольно часто в так называемых слабых семьях происходит спонтанная массовая гибель пчел значительно раньше положенного срока. При этом гибель пчел не связана с недостатком корма или его качеством, а также инфекционными заболеваниями, инвазиями и т. п. Исследование биохимических причин и механизмов этого явления

представляет несомненный как практический, так и теоретический интерес в плане выяснения основных закономерностей и механизмов апоптоза. В связи с этим целью данной работы состояла в изучении обмена веществ у пчел из семей, в которых наблюдается массовая гибель, и определении возможных механизмов гибели пчел (теоретически это должна быть фрагментация ДНК).

Материалы и методы. Исследования выполняли на семьях пчел (*Apis mellifera*, Украинская раса), проживающих в контролируемых условиях на территории института. В качестве контрольной группы были взяты семьи, где уровень спонтанной гибели пчел был низок и не превышал обычных физиологических норм. Слабыми считали такие семьи, в которых к середине апреля живыми оставалось менее 20 % (использовали как живые особи, так и погибшие). Анализировали по 50 особей пчел из каждой группы. ДНК выделяли обычным методом депротенинизации, предварительно обработав DS-Na и проназой Р [2]. Электрофорез ДНК проводили в 1 %-м агарозном геле, буфер — 20 мМ трис-борная кислота, рН 8,3, 1 мМ ЭДТА в горизонтальном аппарате GNA100 («Pharmacia-LKB», Швеция). Препарат ДНК печени крыс, деградированный эндогенной Са, Mg-зависимой эндонуклеа-

зой, был любезно предоставлен Т. Г. Мозжухиной (Институт геронтологии, Киев). Оносительное содержание ДНК на электрофореграммах определяли на денситометре Camag («Dopau», Швейцария) в режиме флюоресценции после окрашивания бромистым этидием. Уровень биосинтеза РНК и белка определяли в суспензии клеток эпителия кишечника по методу [3] в среде Игла. Клетки предварительно пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 300 мкм и два раза промывали центрифугированием (500 g) в течение 3 мин. Инкубационная смесь содержала [^{14}C]-оротовую кислоту или [^{14}C]-белковый гидролизат (40 кБк/мл). Клетки инкубировали в присутствии 5 %-го CO_2 , и 30 °С. Радиоактивность измеряли на счетчике Mark 3 на фильтрах в ЖС-106. В цитоплазматической фракции клеток кишечника регистрировали активность гексокиназы (ГК), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФДГ), фосфофруктокиназы (ФФК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сорбитолдегидрогеназы (СДГ), глутатионредуктазы (ГРД) по методам [4] с использованием соответствующих тестовых наборов фирм «Sigma» (США) и «Boehringer Mannheim» (Германия), супероксиддисмутазы (СОД) [5] и каталазы (КАТ) [6]. Митохондрии выделяли центрифугированием при 10000 g (15 мин) в сахарозной среде [7]. Трансмембранный потенциал митохондрий измеряли с помощью Сафранина Т [7] в присутствии различных субстратов. Все оптические измерения проводили на спектрофотометре DU-65 («Beckman», США). Результаты обрабатывали с использованием стандартных методов вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. В случае гибели пчел по классической схеме апоптоза в клетках погибших пчел присутствовали бы продукты деградации ДНК — либо низкомолекулярные, либо (как минимум) кратные по размеру нуклеосомной ДНК, аналогичные приведенным на рис. 1 (дорожка 1). Однако оказалось, что у погибших пчел ДНК остается совершенно интактной (см. рис. 1). По степени полимерности ДНК из погибших пчел не отличается от таковой живых. Электрофоретическая подвижность всех препаратов была такой же, как у коммерческого препарата высокополимерной ДНК из тимуса телят. Собственно факт высокой полимерности ДНК из погибших пчел был уже очевиден до проведения электрофореза, так как при растворении ткани в Ds-Na получали типичный вязкий раствор ДНК. ДНК из живых и погибших пчел выделяли в идентичных условиях, и для электрофоретического разделения наносили одинаковый объем полученных препаратов ДНК. При окраске бромистым этидием (общепринятый метод

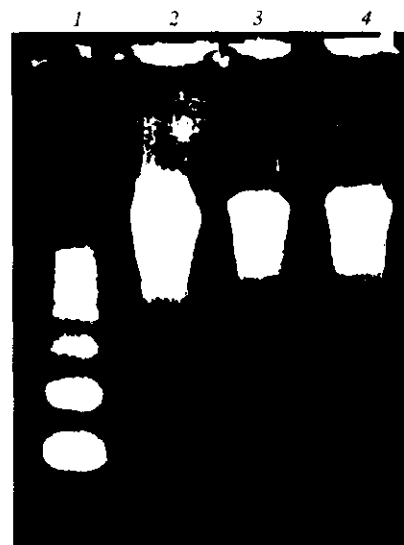


Рис. 1. Электрофорез ДНК: 1 — печени крыс после активации Са, Mg-зависимой эндонуклеазой, 2 — ДНК тимуса телят фирмы «Sigma» (США); 3, 4 — погибших и живых пчел

количественной оценки содержания ДНК) содержание ДНК в двух исследуемых препаратах достоверно не различалось, стандартное отклонение не превышало $\pm 4\%$. Следовательно, полимерной являлась вся ДНК клеток погибших пчел, отсутствовали даже следы ее деградации.

В связи с вышеизложенным в дальнейших исследованиях исходили из предположения о том, что альтернативным механизмом гибели пчел могут быть изменения на уровне обмена веществ, предшествующие, возможно, их ослаблению и гибели. Как следует из полученных результатов (рис. 2), у пчел из слабых семей наблюдается значительное снижение активности ферментов на всех этапах ее катаболизма — начальных (ГК), промежуточных (ФФК) и конечных (ЛДГ). При этом возможность метаболизма по пентозофосфатному пути сведена к минимуму — активность Г6ФДГ составляет всего около 5 % от нормы. Это значит, что в клетках практически остановлена регенерация НАДФ. Что же касается активности Г6ФДГ, то необходимо отметить следующее. В абсолютном выражении активность этого фермента составляла 58,5 нмоль НАДФ за 1 мин на 1 мг белка. Это довольно высокий показатель, поскольку у млекопитающих, в частности крыс, активность Г6ФДГ составляет 10—15 нмоль НАДФ за 1 мин на 1 мг белка [4]. Следовательно, Г6ФДГ имеет большое значение для нормального метаболизма пчел. В связи с этим значительное снижение активности

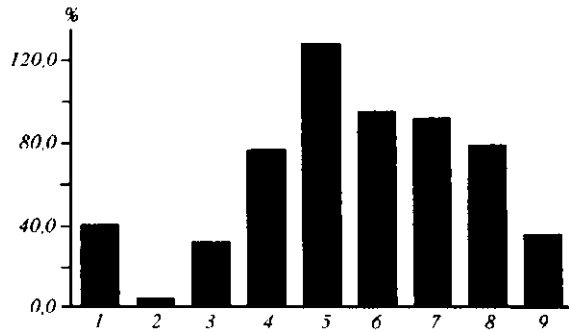


Рис. 2. Активность ГК (1), Г6ФДГ (2), ФФК (3), ЛДГ (4), СОД (5), КАТ (6), ГРД (7), уровень синтеза РНК (8) и белка (9) у слабых пчел в процентах от нормы; * $p > 0,05$, различия достоверны

фермента может существенно отразиться на энергообеспечении клеток и организма в целом. У пчел из слабых семей снижена также активность СДГ. Практически единственным источником питания пчел является глюкоза и фруктоза, т. е. падение активности этих ферментов еще более снижает потенциальные возможности энергообеспечения организма как за счет глюкозы, так и фруктозы. В то же время активность ферментов, не имеющих прямого отношения к процессам катаболизма, — СОД, КАТ и ГРД остается не ниже нормы. Более того, активность СОД у слабых пчел была даже повышенной (см. рис. 2).

Для оценки эффективности работы митохондрий измеряли трансмембранный потенциал, генерируемый в присутствии различных субстратов. Известно, что митохондрии содержат собственную систему ферментов катаболизма глюкозы, начиная с гексокиназы [8]. При этом метаболизм в митохондриях насекомых имеет некоторые специфические черты. На митохондриях мухи показано [9] наличие обходного пути через глицерофосфат непосредственно на флавопротеин, минуя цикл трикарбоновых кислот. Учитывая это, в число тестовых субстратов был включен глюкозо-6-фосфат. Установлено, что в митохондриях слабых пчел функциональная способность в основном сохранена (рис. 3). Потенциал, генерируемый в присутствии сукцината и АДФ в обеих группах, одинаков. Однако возможность утилизации более «высоких» субстратов, в частности глюкозо-6-фосфата, за счет внутримитохондриальных процессов значительно ограничена. Поскольку активность цитоплазматиче-

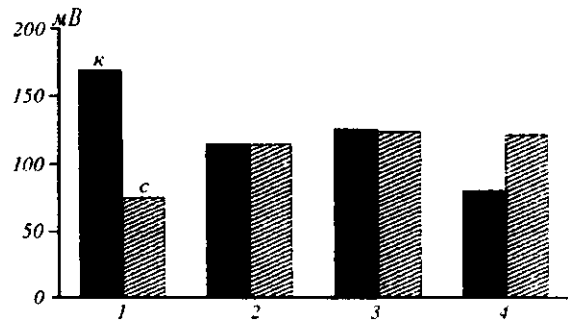


Рис. 3. Трансмембранный потенциал, генерируемый митохондриями в присутствии глюкозо-6-фосфата (1), сукцината (2), АДФ+Ф (3) и АТФ (4) (в мВ); К — контроль, С — слабые пчелы; * $p > 0,05$, различия достоверны

ческих ферментов катаболизма глюкозы снижена, потенциальные возможности митохондрий также будут меньшими. Причина этого заключается в снижении содержания субстратов — пирувата и глицерофосфата. Хорошо известно, что митохондрии в клетке функционируют в значительной степени самостоятельно. Показателен тот факт, что митохондрии из слабых пчел могут одинаково эффективно использовать в качестве субстрата АДФ и АТФ, тогда как в норме возможность использования АТФ значительно ограничена. Это предполагает наличие как в митохондриях, так и в клетке в целом весьма неблагоприятной ситуации с энергообеспечением. В таких условиях в митохондриях как автономных органеллах включается своеобразная система «спасения», когда они вместо производства АТФ сами становятся ее потребителями. Это обстоятельство позволяет утверждать, что первопричины нарушения метаболизма в клетках пчел, в частности, энергообеспечения за счет катаболизма глюкозы и фруктозы связаны с функцией ядерного генома, а не митохондриального.

Одновременно со снижением активности многих ферментов у слабых пчел наблюдается и снижение уровня биосинтеза белков (см. рис. 2) — скорость включения меченых аминокислот не превышала 40 % от нормы. Это в какой-то мере не согласуется с полученными данными по скорости синтеза РНК (см. рис. 2). В отличие от белка скорость включения ^{14}C -оротовой кислоты хотя и снижена, однако не в такой мере, как ^{14}C -аминокислот. Надо полагать, что у слабых пчел возникают существенные препятствия в процессах, имеющих отношение

к трансляции. Поскольку у слабых пчел избирательно снижена активность ферментов, можно предположить, что это осуществляется за счет специфического подавления биосинтеза и трансляции соответствующих генов этих ферментов.

Таким образом, гибель клеток пчел не сопровождается фрагментацией ДНК. В то же время вполне вероятно существование программы гибели, заключающейся, с одной стороны, в специфическом подавлении процесса биосинтеза белка и с другой, — всей системы энергообеспечения клетки. В результате этого гибель, видимо, наступает за счет общей остановки обмена веществ. В пользу именно такого специфического механизма свидетельствует тот факт, что у слабых пчел снижения активности ферментов, не имеющих непосредственного отношения к утилизации энергии глюкозы (СОД, КАТ и ГРД), не наблюдалось.

Для пчел в зимнее время основной физиологической «задачей» обмена веществ есть поддержание температуры организма и семьи в целом на допустимом уровне. Снижение процессов энергообеспечения приводит к падению температуры и соответственно к необратимой остановке обмена веществ. В этих условиях отсутствие деградации ДНК вполне закономерно. Согласно известным законам термодинамики ферментативных реакций, их активность при таких температурах будет весьма низкой, и процесс ферментативной деградации ДНК будет неэффективным. С другой стороны, исследования на лейкоцитах [10] свидетельствуют о существовании прямой зависимости между содержанием в клетке НАД и НАДФ и включением программы гибели клеток. Авторы считают, что непрерывным условием, непосредственно предшествующим апоптозу, есть истощение их клеточного пула. Как следствие, можно предположить, что программа апоптоза первоначально возникла как система блокирования процессов энергообеспечения. По-видимому, этому способствовала сравнительно простая общая схема обмена веществ. Механизм деградации ДНК развился эволюционно несколько позже, когда обмен веществ был уже сильно разветвлен. Возможно, что это произошло только у теплокровных организмов.

Ю. О. Протас, И. Г. Багрий

Блокування енергозабезпечення і відсутність деградації ДНК при загибелі клітин бджіл

Резюме

Показано, що загибель бджіл не пов'язана з фрагментацією

ДНК. У бджіл із слабких сімей (незадовго до спонтанної смерті) значно знижена активність ферментів катаболізму глюкози як у цитоплазмі, так і в мітохондріях, спостерігається значне падіння біосинтезу білків. Виявлено несприятливі зміни функції мітохондрій, зокрема, величина трансмембранного потенціалу мітохондрій однакова як у присутності АДФ, так і АТФ, тоді як за норми останнє є значно обмеженим. Зроблено припущення стосовно того, що процес деградації ДНК як механізм апоптозу виник на пізніших стадіях еволюції. Первинним механізмом апоптозу є (а для простіших організмів і лишається) специфічне блокування системи катаболізму.

Yu. A. Protas, I. G. Bagriy

Blocking of metabolism and absence of DNA fragmentation at bee cell death

Summary

It has been shown, that death of bees from weak families was not connected by DNA fragmentation with DNAses. On the other hand, in weak bees the activity of glucose catabolism enzymes in cytoplasm and mitochondria was decreased, just as protein synthesis. Some disorders of mitochondria function were observed also. It may be supposed that DNA fragmentation as a mechanism of apoptosis is involved on the later stages of evolution.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Уманский С. Р. Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения // Усп. соврем. биологии.—1982.—93, № 1.—С. 139—146.
2. Volpe P. «Cookbook» guide to molecular biology.—Rome: Univ. of Rome «La Sapienza», 1988.—55 p.
3. Протас А. Ф. Влияние низких доз облучения на синтез ДНК, РНК и белков в клетках коры головного мозга // Укр. биохим. журн.—1995.—67, № 5.—С. 105—109.
4. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой.—Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982.—272 с.
5. Misra H. P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase // J. Biol. Chem.—1972.—247, N 10.—P. 3170—3175.
6. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.—1988.—№ 1.—С. 16—19.
7. Akerman K. E. O., Wikstrom M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential // FEBS Lett.—1976.—68, N 2.—P. 191—197.
8. Этингоф Р. Н., Шуколюков С. А., Жучихина Ф. Ф. и др. Гексокиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа митохондрий сетчатки // Митохондрии. Структура и функции в норме и патологии.—М.: Наука.—1971.—С. 155—160.
9. Сопрунов Ф. Ф. Особенности митохондрий беспозвоночных и влияние экологической адаптации // Митохондрии. Структура и функции.—М.: Наука, 1966.—С. 51—60.
10. Carson D. A., Seto Sh., Wasson B. D., Carrera C. J. DNA strand breaks, NAD metabolism, and programmed cell death // Exp. Cell Res.—1986.—164, N 2.—P. 273—281.

УДК 577.7+577.11

Поступила в редакцию 10.10.96