

На правах рукописи



Грабельных Ольга Ивановна

**МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ЭНЕРГОРАССЕИВАЮЩИЕ СИСТЕМЫ
РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Иркутск – 2014

Работа выполнена в лаборатории физиологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор **Войников Виктор Кириллович**

Официальные оппоненты:

Тимофеева Ольга Арнольдовна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», зав. кафедрой физиологии и биохимии растений Института фундаментальной медицины и биологии

Илли Иван Экидиусович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия», профессор кафедры агроэкологии, агрохимии, физиологии и защиты растений

Власов Борис Яковлевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии репродукции

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», кафедра генетики, цитологии и биоинженерии

Защита диссертации состоится «05» февраля 2014 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

Факс (3952) 510754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

Официальный сайт СИФИБР СО РАН: <http://www.sifibr.irk.ru/>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 003.047.01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Низкие температуры (низкие положительные и отрицательные) являются одним из важных физических факторов внешней среды, ограничивающих рост, продуктивность и географическое распространение растений, особенно в условиях резко континентального климата, когда в своем онтогенезе растения могут подвергаться значительным перепадам температур, заморозкам и морозам. Энергорассеивающие системы митохондрий снижают энергетическую эффективность окислительного фосфорилирования путем рассеивания в виде тепла части энергии, генерируемой электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) митохондрий, как до (*несопряженное дыхание*), так и после преобразования ее в энергию трансмембранного градиента (*разобщенное дыхание*) [Скулачев, 1989]. В связи с этим их функция может быть важна при низкотемпературном стрессе. У растений среди систем, которые регулируют степень сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделяются антимицин А- и цианидрезистентная альтернативная оксидаза (АО) [Millenaar, Lambers, 2003; Vanlerberghe, 2013], «внешние» и «внутренние» альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы (НАД(Ф)Н-ДГ II типа) [Rasmusson et al., 2004, 2008], свободные жирные кислоты (СЖК) [Войников, 1987, 2011] и связанные с ними разобщающие белки (plant Uncoupling proteins, pUCPs) [Hourton-Cabassa et al., 2004; Vercesi et al., 2006], подобные UCP животных, и АТФ/АДФ-антипортер [Popov et al., 2002]. Термогенез в генеративных тканях представителей некоторых семейств растений (*Araceae*, *Nelumbonaceae* и др.), обусловленный активностью АО, делает процесс цветения независимым от температуры окружающей среды [Seymour, 2001]. Проростки озимых злаков при низкотемпературном стрессе также способны генерировать тепло [Войников, 1987], однако термогенная функция энергорассеивающих систем митохондрий в «нетермогенных» растениях до сих пор является предметом научной дискуссии. АО и pUCPs вовлечены в регуляцию образования активных форм кислорода (АФК) в клетках растений [Purvis et al., 1995; Popov et al., 1997; Brandalise et al., 2003; Smith et al., 2004; Sugie et al., 2006; Begcy et al., 2011] и представляют собой первую линию защиты от генерации АФК [Wagner, Moore, 1997; Møller, Kristensen, 2004]. Активация АО и pUCPs, экспрессия генов, кодирующих эти белки, и увеличение их содержания при действии низких закаливающих температур показаны на различных растительных объектах (в этиолированных и зеленых тканях, суспензионной культуре клеток), однако их связь с холодо- и морозоустойчивостью до сих пор не установлена, так же как и их функциональная роль в этих условиях. В нефотосинтезирующих частях растений митохондрии вносят основной вклад в продукцию АФК в клетках [Møller, 2001]. Образование АФК повышается при действии низких температур на растения [Xu et al., 2013], при этом в низких концентрациях АФК запускают экспрессию ряда холодо-регулируемых генов (cold-regulated, COR-генов) и участвуют в защитных реакциях [Suzuki, Mittler, 2006], а в высоких - приводят к ухудшению энергетического метаболизма, дисфункции митохондрий и гибели клеток [Weir et al., 2003]. Передача сигнала из митохондрий в ядро и индукция ядерных генов под

действием митохондриального сигнального пути, по-видимому, позволяют растениям поддерживать клеточный гомеостаз в изменившихся внешних условиях [Rhoads et al., 2006]. Предотвращение генерации АФК при низкотемпературном воздействии на растения может быть одной из функций энергорассеивающих систем митохондрий [Purvis, Shewfelt, 1993; Popov, 2003; Sugie et al., 2006]. Очень мало работ посвящено изучению функционирования в митохондриях растений при низкой температуре НАД(Ф)Н-ДГ II типа и АТФ/АДФ-антипортера. Возможно, что их функции являются сходными с АО и рUCP. Функционируя совместно с АО, НАД(Ф)Н-ДГ II типа образуют дыхательную цепь, способную окислять цитозольный или матриксный НАД(Ф)Н, что может быть жизненно необходимо при высоком соотношении $[\text{НАД(Ф)Н}]/[\text{НАД(Ф)}^+]$ [Michalecka et al., 2003]. У животных АТФ/АДФ-антипортер участвует в образовании высокопроницаемой митохондриальной поры (Permeability Transition Pore, РТР) [Tikhonova et al., 1994], открытие которой вызывается СЖК и ионами Ca^{2+} [Zoratti, Szabo, 1995; Rasola, Bernardi, 2011]. Для растений такие данные отсутствуют, хотя существование РТР у них установлено [Arpagaus et al., 2002]. Не решен вопрос и о регуляции многообразия энергорассеивающих систем в митохондриях растений при действии низких температур. Есть основания полагать, что в механизмах регуляции задействованы АФК, СЖК и ионы Ca^{2+} , которые являются непосредственными участниками в ответных реакциях на низкотемпературный стресс. Повышение уровня цитозольного Ca^{2+} в начальный период действия низкой температуры индуцирует экспрессию COR-генов у растений [Whalley et al., 2011]. Поскольку активация АО и рUCP у растений может происходить при холодовом закаливании, с помощью которого повышается холодо- и морозоустойчивость растений, то изучение функционирования энергорассеивающих систем митохондрий представляется особенно важным для сельскохозяйственных культур, таких как озимые злаки. Для биологии озимых культур характерно, что они проходят закалывание в природных условиях при низких положительных и неповреждающих отрицательных температурах и развивают высокую морозоустойчивость [Туманов, 1979; Трунова, 2007]. Комплекс адаптивных реакций формируется и у этиолированных проростков озимых злаков при закаливании в лабораторных условиях [Туманов, 1979].

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении функционирования энергорассеивающих систем в митохондриях этиолированных проростков растений и определении их функциональной роли в адаптации к низким температурам. В задачи исследования входило: 1) оценить роль митохондрий как возможных источников генерации АФК у растений при низкотемпературном стрессе; 2) выявить роль свободных жирных кислот в функциональной активности митохондрий и морозоустойчивости озимой пшеницы, а также определить взаимосвязь между изменениями жирнокислотного состава митохондрий, интактностью их мембран и митохондриальной продукцией АФК; 3) изучить изменение экспрессии генов, кодирующих энергорассеивающие системы митохондрий (альтернативные пути транспорта электронов, рUCP и

АТФ/АДФ-антипортер) при холодовом закаливании этиолированных проростков озимой пшеницы; 3) изучить способность альтернативной оксидазы к транспорту электронов по дыхательной цепи митохондрий этиолированных проростков растений, зависимость ее функционирования от субстрата окисления, содержания свободных жирных кислот и действия низких температур; 4) определить активность альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы в процессе низкотемпературной адаптации; 5) выяснить роль рУСР и АТФ/АДФ-антипортера в разобщении окислительного фосфорилирования свободными жирными кислотами в митохондриях озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе; 6) изучить функционирование в митохондриях злаков неспецифической митохондриальной поры, чувствительной к циклоспорину А, ионам Ca^{2+} и свободным жирным кислотам, и изменение ее свойств в проростках озимой пшеницы при действии низких температур; 7) охарактеризовать механизм разобщающего действия белкового комплекса с мол. массой 310 кДа в митохондриях растений; 8) определить термогенную и антиоксидантную функции изученных энергорассеивающих систем митохондрий при действии низких температур и возможные механизмы их регуляции.

Положения, выносимые на защиту

1. Интактность мембран и функциональная активность митохондрий в этиолированных тканях растений при низкотемпературном стрессе зависят от содержания активных форм кислорода и активности процесса перекисного окисления липидов и определяются составом жирных кислот, среди которых важную роль играет α -линоленовая кислота.

2. Снижение степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях растений осуществляется посредством различных механизмов, среди которых механизмы универсальные для клеток животных и растений - свободные жирные кислоты и индуцируемые ими разобщающие белки, АТФ/АДФ-антипортер, неспецифическая митохондриальная пора; и характерные для растений - альтернативная оксидаза, ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы, белковый комплекс с мол. массой 310 кДа. Митохондриальные энергорассеивающие системы играют важную роль в защитно-приспособительных реакциях растений при низкотемпературном стрессе.

3. Механизмы разобщения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях растений насыщенными и ненасыщенными свободными жирными кислотами различаются. Разобщение насыщенными жирными кислотами обеспечивается в основном за счет АТФ/АДФ-антипортера, в то время как в разобщении ненасыщенными жирными кислотами большая роль принадлежит УСР-подобному белку. В митохондриях этиолированных побегов злаков насыщенные жирные кислоты и ионы Ca^{2+} приводят к открытию циклоспорин А-чувствительной высокопроницаемой поры, изменение свойств которой происходит при низкотемпературном стрессе.

Научная новизна. Изучено функционирование у растений систем, снижающих степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, определены возможные механизмы их взаимодействия, пути регуляции и функциональная роль при действии низких температур.

Подтверждено, что митохондрии являются основным источником генерации АФК в тканях этиолированных проростков озимых злаков при низкотемпературном стрессе, при этом показано, что уровень АФК определяет содержание в митохондриях продуктов ПОЛ, жирнокислотный состав митохондрий, интактность их мембран, окислительную и фосфорилирующую активность органелл, а весь комплекс этих параметров влияет на морозоустойчивость растений.

Впервые установлено, что в начальный период действия закаливающей низкой положительной температуры в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы происходит увеличение транскриптов *AOX1c*, *NAD7* и *ATP6* и увеличение содержания в митохондриях альтернативной оксидазы. Индукция синтеза альтернативной оксидазы и сохранение ее способности к транспорту электронов по дыхательной цепи в начальный период действия закаливающей температуры позволяет сохранять высокий уровень синтеза АТФ при окислении митохондриями малата, а также снижать генерацию АФК митохондриями при последующем холодовом шоке.

Впервые в митохондриях из проростков озимой пшеницы показаны различия в активности альтернативных «внешних» и «внутренних» НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, при этом в период действия закаливающих температур высокая активность «внешней» НАДН-дегидрогеназы, возможно, компенсирует снижение скоростей окисления малата и сукцината, а также позволяет сохранить необходимый уровень НАД⁺ в цитоплазме.

Впервые показано, что разобщающий эффект насыщенных жирных кислот в митохондриях растений обусловлен, главным образом, функционированием АТФ/АДФ-антипортера, а ненасыщенных - активностью UCP-подобных белков. Выявлено, что высокая концентрация свободных жирных кислот обуславливает их использование в качестве субстрата окисления для митохондрий, а наличие ионов Ca²⁺ - их участие в открытии высокопроницаемой митохондриальной поры.

Впервые показано, что активация АТФ/АДФ-антипортера и UCP-подобных белков в митохондриях происходит при кратковременном холодовом стрессе, не снижающем выживаемость растений. В то же время холодовый шок, сопровождающийся частичной или полной гибелью проростков, вызывает повреждение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, опосредованное накоплением АФК и снижением содержания цитохрома *c* в митохондриях.

Впервые выявлено участие митохондрий в процессе программируемой клеточной гибели колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы в ходе естественного старения и после обработки экзогенной перекисью водорода. Для митохондрий этиолированных побегов злаков характерна регулируемая модель открытия неспецифической поры, зависимой от ионов Ca²⁺ и свободных

жирных кислот (пальмитиновой) и чувствительной к циклоспориноу А, ингибитору митохондриальной поры животных. Функциональным компонентом поры, вероятно, является АТФ/АДФ-антипортер, активация которого вызывается пальмитиновой кислотой. Показано, что холодовое закаливание проростков успешно предотвращает развитие окислительного стресса и тормозит программу клеточной гибели в колеоптиле злаков.

Установлен механизм разобщающего действия белкового комплекса с мол. массой 310 кДа, который заключается в переносе электронов по дыхательной цепи в обход убихинона и комплекса III через комплекс I на ассоциированный с наружной мембраной митохондрий БХШ 310 и далее на цитохром *c* и комплекс IV. Такой *би-транс*-мембранный перенос электронов активируется в митохондриях злаков при кратковременном холодовом стрессе.

Показано, что термогенез и антиокислительная защита клетки могут быть функциями систем, снижающих энергетическую эффективность дыхания митохондрий в тканях растений с гетеротрофным метаболизмом при действии низких температур.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют и углубляют современные представления о механизмах функционирования и регуляции нефосфорилирующих путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий растений и роли митохондрий в процессах адаптации и гибели растительных клеток при низких температурах. Полученные результаты о возможности холодового закаливания предотвращать развитие программируемой клеточной гибели у растений открывают перспективы для дальнейших исследований в области изучения механизмов клеточной гибели растений.

Новизна механизма разобщающего действия белкового комплекса с мол. массой 310 кДа и способа его получения подтверждены патентом РФ на изобретение «Способ получения биологически активного вещества для регуляции энергетического баланса» № RUS 2257907 от 30.09.2003.

Материалы работы используются в учебном процессе на биолого-почвенном факультете ФГБОУ ВПО «Иркутского государственного университета». Основные результаты исследований вошли в курс лекций по «Биохимии дыхания». Методические подходы к изучению митохондрий растений включены в монографию «Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез» (М.: «Промэкобезопасность», 2004) и используются при проведении практических занятий в рамках курсов «Молекулярно-генетические методы исследования» и «Большой практикум», а также в научно-исследовательской практике студентов и аспирантов, специализирующихся в области физиологии и биохимии растений. Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по экологии, физиологии и биохимии растений, использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования проводились в рамках тематических планов НИР лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН в период с 2000 по 2013 гг.

Автор являлся руководителем проектов РФФИ (№ 02-04-46096-мас и № 05-04-97231-р_байкал_а), гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и их научных руководителей МК-1876.2007.4 (2007-2008), грантов СО РАН для молодых ученых (2003-2004, 2006-2007), а также исполнителем проектов РФФИ (№ 00-04-48093-а, № 01-04-48953-а, № 03-04-48151_а, № 05-04-48966-а, № 07-04-01055-а, № 08-04-01037-а, № 10-04-00921-а), гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ НШ-4812.2006.4 (2006-2007), междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 45 (2009-2011), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (№ 2012-1.1-12-000-2008-023) (2012-2013), при поддержке которых выполнялась данная работа.

Личное участие автора. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с коллегами лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, в статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и обсуждались на российских и международных съездах и конференциях, в том числе: международных симпозиумах «Signalling systems of plant cells» (Москва, 2001) и «Plant under environmental stress» (Москва, 2001), Гордоновской конференции «Temperature stress in plants» (California, 2001), международной конференции «International Conference in Plant Mitochondria Biology» (Obernai, France, 2005), FEBS Congress «Mechanisms in Biology» (St. Petersburg, 2013), Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), IV, V и VII Съездах Всероссийского общества физиологов растений (Москва, 1999; Пенза, 2003; Нижний Новгород, 2011), III, IV и V конференциях молодых ученых, посвященных М.А. Лаврентьеву (Новосибирск, 2003, 2004, 2007), Всероссийских научных конференциях «Стрессовые белки растений» (Иркутск, 2004), «Структура и экспрессия митохондриального генома растений» (Иркутск, 2006), «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2008), «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009), «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013), а также научных сессиях СИФИБР СО РАН (Иркутск, 2000, 2002, 2004, 2006, 2008, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано более 120 научных работ, в том числе 34 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты докторских диссертаций, две монографии и один патент на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Список цитированной литературы включает 797 работ, из них 160 отечественных. Работа изложена на 483 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 90 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В работе использовали растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сортов Заларинка и Иркутская), озимой ржи (*Secale cereale* L., сорта Чулпан), кукурузы (*Zea mays* L., гибрида ВИР 36 и сорта Российская 1), гороха (*Pisum sativum* L., сорта Марат). Проростки выращивали гидропонным способом в темноте при температуре 25 ± 1 °С до возраста 2,5 или 3-х сут (озимая пшеница), 3-х сут (кукуруза и озимая рожь) и 6-ти сут (горох). Также использовали гетеротрофную суспензионную культуру клеток озимой пшеницы *Triticum aestivum* (L.), которую выращивали при 26 °С на МС-среде [Murashige, Scoog, 1962], содержащей сахарозу (3%), тиамин (1,0 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновую кислоту (0,5 мг/л), 2,4-Д (2,5 мг/л), инозитол (0,01%) и дитиокарбамат натрия (0,0005 %).

Методы. Закаливание проростков озимой пшеницы проводили при 3 ± 1 °С в течение 7 сут (Хол. зак. 1 этап) и последующей обработке -2 - -3 °С в течение 2 сут (Хол. зак. 2 этапа). Отрицательными температурами (-4 °С, 1 ч или -8 °С, 1 - 6 ч) воздействовали на 3-х сут проростки озимой пшеницы или закаленные. Закаливание суспензионной культуры клеток проводили на 8-е сут культивирования при 8 °С (7 сут), а обработку отрицательной температурой на 15-е сут культивирования при -8 °С (6 ч).

Морозоустойчивость проростков определяли по их отрастанию после промораживания. Выживаемость клеток суспензионной культуры определяли с помощью Эванса голубого сразу и через 3, 6 или 10 сут после воздействия. Количество окрашенных клеток подсчитывали в 5 полях, содержащих не менее 50 клеток в 3-х повторностях с помощью светового микроскопа Axiostar plus ("Carl Zeiss", Германия). Выживаемость клеток колеоптилей определяли с помощью Эванса голубого [Baker, Mock, 1994] или 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) [Еникеев и др., 1995].

Водорастворимые углеводы определяли с антроновым реактивом [Дише, 1967], используя абсолютно сухой растительный материал. Общее содержание SH-групп определяли в гомогенате ткани с помощью реактива Элмана (5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты) [Ellman, 1959], содержание рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием восстановленного глутатиона, принимая, что 1 мкМ глутатиона соответствует 1 мкМ SH-групп.

Температуру тканей побегов проростков (3 г) регистрировали с помощью термопары медь-константан, подключенной к входу дифференциального микровольтметра по модифицированному методу Войникова и Корзуна [1984]. О термогенерации судили по разнице температур между живыми и «убитыми» с помощью нагревания образцами ткани (Δt , °С).

Общее содержание АФК в интактных побегах и изолированных митохондриях определяли с помощью 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF-DA$) на спектрофлуорофотометре RF-5301 PC ("Shimadzu", Япония) [Грабельных и др., 2011]. В качестве контроля специфичности действия $H_2DCF-DA$ оценивали изменение его флуоресценции в ответ на добавление H_2O_2 или аскорбиновой кислоты. Содержание пероксида водорода определяли

спектрофотометрически с помощью 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) по методике [Tarasenko et al., 2012] в нашей модификации [Корсукова и др., 2013a].

Уровень ПОЛ в суспензии митохондрий оценивали по флуоресценции его продуктов по методу [Fletcher et al., 1973] в модификации И.В. Жигачевой с соавт. [2008]. Определение флуоресценции проводили при длине возбуждения 360 нм и длине испускания 440 нм.

Выделение митохондрий из этиолированных побегов проводили методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности 23/35% (объем/объем) перколла по методике [Грабельных и др., 2011]. Для оценки полученной фракции митохондрий использовали критерии, как в работах [Звягильская, Котельникова, 1991; Шугаев, 2003].

Целостность наружной мембраны митохондрий определяли полярографически по скорости поглощения кислорода митохондриями при окислении аскорбата в присутствии экзогенного цитохрома *c* в отсутствие и в присутствии 0,04% Тритона X-100 [Davy de Virville et al., 1994]. Активность гидроксипируватредуктазы (маркер пероксисом) оценивали по окислению НАДН при 340 нм [Schwitzgubel, Siegenthaler, 1984]. Активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (маркер пластид и цитоплазмы) оценивали по восстановлению НАДФ⁺ при 340 нм по методу [Muto, Uritani, 1974]. Активность «внешних» НАД(Ф)Н-ДГ в суспензии митохондрий оценивали по окислению экзогенных НАДН и НАДФН при 340 нм по методу [Svensson, Rasmusson, 2001]. Активность «внутренней» ротенон-нечувствительной НАДН-ДГ оценивали по окислению НАДН при 340 нм после пермеабилзации мембран митохондрий с помощью осмотического шока [Svensson, Rasmusson, 2001]. Коэффициент экстинкции для НАДН принимали равным $6,22 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [Bergmeyer, 1965].

Интенсивность дыхания культуры клеток, интактных побегов и изолированных из них митохондрий регистрировали полярографически с платиновым электродом закрытого типа (электрод Кларка) [Трушанов, 1973] в ячейке объемом 1,4 мл при 26 °С на полярографе ОН-105 (Венгрия). Субстратами для дыхания митохондрий служили: 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата, 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата, 1 мМ НАДН, 1 мМ НАДФН. Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. Для активации «внешней» ротенон-нечувствительной НАД(Ф)Н-ДГ в среду инкубации включали 0,06 мМ CaCl₂ [Moller et al., 1981], для активации сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – 200 мкМ АТФ. Скорости поглощения кислорода, коэффициенты дыхательного контроля (ДК) и отношения АДФ/О рассчитывали по методу [Chance, Williams, 1956]. Для связывания СЖК в реакционную среду включали 0,1-0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от жирных кислот. Для ингибирования комплекса I ЭТЦ использовали 3 мкМ ротенона или 50 мкМ реина, комплекса III ЭТЦ – 20 мкМ антимицина А, комплекса IV ЭТЦ – 0,4 мМ KCN, АТФ-синтазы – 2,5 мкг/мг белка олигомицина, АТФ/АДФ-антипортера – 1 – 2 мкМ карбоксиатрактилозида (Катр), неспецифической поры митохондрий – 1 мкМ циклоспорина А (цикА), УСР-подобных разобщающих белков – 0,5 – 2,0 мМ ГТФ, ГДФ, АТФ и АДФ. Максимальную скорость

окисления субстратов измеряли в присутствии 50 – 200 мкМ АДФ (состояние 3) или 0,5 мкМ карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразона (КЦХФ). Потенциальную активность АО в митохондриях оценивали как часть дыхания в состоянии 3 или 4, ингибируемого бензгидроксамовой кислотой (БГК) (0,5 – 3,0 мМ) в присутствии KCN (0,4 – 1,2 мМ), в культуре клеток и побегах как часть дыхания, ингибируемого БГК или СГК (салицилгидроксамовая кислота) (2 мМ) в присутствии KCN (0,8 мМ). Максимальную активность АО в митохондриях оценивали в присутствии 1 мМ пирувата и 5 мМ дитиотрептола (ДТТ). Для определения разобщающей активности экзогенные СЖК добавляли к митохондриям в состоянии 4. Карнитиновый цикл и митохондриальное β -окисление активировали добавлением 0,5 мМ L-карнитина, 0,2 мМ АТФ, 10 мкМ CoA, 0,1 мМ MgCl₂ и 10 мМ малата. KCN и БГК использовали для оценки способности СЖК служить субстратом окисления для митохондрий [Dieuaide et al., 1993; Masterson, Wood, 2001]. В работе использовали C12:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, 16:1(Δ^9), 18:1(Δ^9) *цис*- и *транс*-изомеры, 18:2($\Delta^{9,12}$), 18:3($\Delta^{9,12,15}$), 20:1(Δ^{11}), 22:1(Δ^{13}) и 24:1(Δ^{15}) кислоты в концентрациях от 0,056 до 1 мМ.

Мембранный потенциал в изолированных митохондриях ($\Delta\psi_{\text{мит}}$) определяли с помощью 2,5 мкМ сафранина O [Pastore et al., 1999] на спектрофлуориметре RF-5301 (“Shimadzu”, Япония).

Набухание митохондрий измеряли спектрофотометрически при 540 нм в среде, содержащей 200 мМ KCl и 20 мМ MOPS-KOH (pH 7,4). Данные рассчитывали в виде разницы оптической плотности ($\Delta\text{ОП}_{540}$), равной $(\text{ОП}_{t_0} - \text{ОП}_{t_1}) * 100$, где ОП_{t_0} -начальная оптическая плотность, ОП_{t_1} -оптическая плотность через определенное время.

Общую фракцию липидов митохондрий экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1) [Bligh, Dyer, 1959]. Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS (“Agilent Technologies”, США), а их идентификацию с помощью расчета эквивалентной длины алифатической цепи (ECL). Относительное содержание жирных кислот определяли в вес. процентах от общего их содержания в исследуемом образце.

Тотальную клеточную РНК выделяли с помощью набора “SV Total RNA Isolation System” (“Promega”, США). Построение первой цепи осуществляли с помощью набора «РЕВЕРТА» (АмплиСенс, ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) согласно рекомендациям фирмы производителя с некоторыми модификациями. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборе CFX96 (“BioRad”, США), используя SYBR Green I (“Sigma”, США) и реактивы фирмы “Fermentas” (“ThermoScientific”, Литва). В работе использовали ген-специфичные праймеры к генам *COR14*, *NAD7*, *COB*, *COX2*, *ATP6*, *UCP1a*, *UCP1b*, *AOX1a*, *AOX1c*, *ANT1*, *NDA2*, *NDB2*, *Ta2291* и *Ta2776* (представлены в диссертации). Подбор праймеров к пшеничным генам, гомологичным по последовательности генам *ANT1*, *NDA2* и *NDB2* арабидопсиса, осуществляли на основе сборных транскриптов (TA – transcript assembly) из базы данных

Института геномных исследований (TIGR, США) [Childs et al., 2007]. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Vector NTI v.5.1 (InforMax™Invitrogen™Life Science Software, США). В качестве референсных генов использовали *Ta2291* (фактор рибозилирования АДФ) и *Ta2776* (белок, подобный ингибитору рибонуклеазы L) [Paolacci et al., 2009]. Значение порогового цикла реакции (Ct - threshold cycle) определяли автоматически с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager, версия 1.6.541.1028 (Bio-Rad, США). Данные представлены как Q_N – нормализованный уровень экспрессии гена в опытном образце ткани относительно контрольного образца (до закаливания).

Общую белковую фракцию выделяли из побегов проростков по методу [Побежимова и др., 2004]. Митохондриальную и цитоплазматическую фракции выделяли из гомогенатов ткани с помощью дифференциального центрифугирования. Белковый комплекс с мол. массой 310 кДа (БХШ 310) выделяли из 3-х дневных побегов озимой ржи, не подвергнутых и подвергнутых обработке $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 ч), согласно методу [Колесниченко и др., 1996]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [Lowry et al., 1951].

Электрофорез белков в ПААГе с ДДС-Na проводили в модифицированной системе Лэммли [Laemmli, 1970], используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell (Bio-Rad, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (“Amersham”, США) и обработку антителами проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. В работе использовали вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Порин был использован как внутренний контроль. Для определения мол. масс полипептидов использовали в качестве стандартов наборы белков (NS8320 и NM3913, Sigma, США).

Проводили не менее 3-х независимых экспериментов, в каждом из которых повторность была 2-6 кратной. Для статистической обработки количественных данных пользовались общепринятыми методами: рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение или ошибку средней [Лакин, 1973]. В работе обсуждаются статистически значимые различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Физиолого-биохимические показатели, характеризующие холодное закаливание этиолированных проростков озимой пшеницы и изолированных из них митохондрий

В этиолированных проростках дыхание является основным процессом, обеспечивающим клетки энергией. Общий характер развития проростков злаков и изменение интенсивности их дыхания известны давно, при этом показано, что в течение первых 2-3 дней зародыш потребляет запасные вещества из собственных запасов, а затем использует запасы эндосперма [Джеймс, 1956]. Первая фаза (или первый этап) холодного закаливания озимых злаков может протекать в темноте при условии, если находящиеся на холоде растения обеспечиваются в качестве источника энергии сахарами или если они не исчерпали запасные вещества эндосперма [Трунова, 1963; Туманов, 1979]. Основываясь на этих фактах,

закаливанию подвергали этиолированные проростки озимой пшеницы морозоустойчивого сорта «Иркутская» в возрасте 2,5 или 3-х сут, а температурами первой фазы закаливания служили температуры +2 - +4 °С (7 сут), температурами второй фазы закаливания -2 - -3 °С (2 сут). Выбор температур обоснован тем, что в диапазоне температур 0-5 °С при продолжительности обработки 7 сут проростками озимой пшеницы достигается максимальная холодо- и морозоустойчивость [Титов и др., 2006], а последующее прохождение проростками закаливания при -3 °С в течение 1-3 дней обеспечивает дополнительный прирост морозоустойчивости на 2-5 °С [Herman et al., 2006].

Для проростков озимой пшеницы под действием закаливающих температур было характерно значительное ингибирование удлинения побегов (на 94±2%) и биомассы (на 88±3%), повышение содержания сухого вещества (на 29-39%) и некоторое увеличение содержания водорастворимых углеводов (на 10-20%). Торможение ростовых процессов сопровождалось повышением морозоустойчивости проростков (рис. 1, а). В отличие от контрольных проростков, которые имели слабую морозоустойчивость ($LT_{50}=-3$ °С), закаливание проростков при 2 °С приводило к повышению морозоустойчивости до $LT_{50}=-8,2$ °С, а последующее закаливание при температуре -2 °С сопровождалось дальнейшим повышением морозоустойчивости до $LT_{50}=-9,8$ °С (рис. 1, а). Повышение морозоустойчивости проростков озимой пшеницы сопровождалось синтезом дегидринов, о чем свидетельствуют результаты иммуноблоттинга белков из побегов проростков с антителами К-сегмента дегидринов (рис. 1, б).

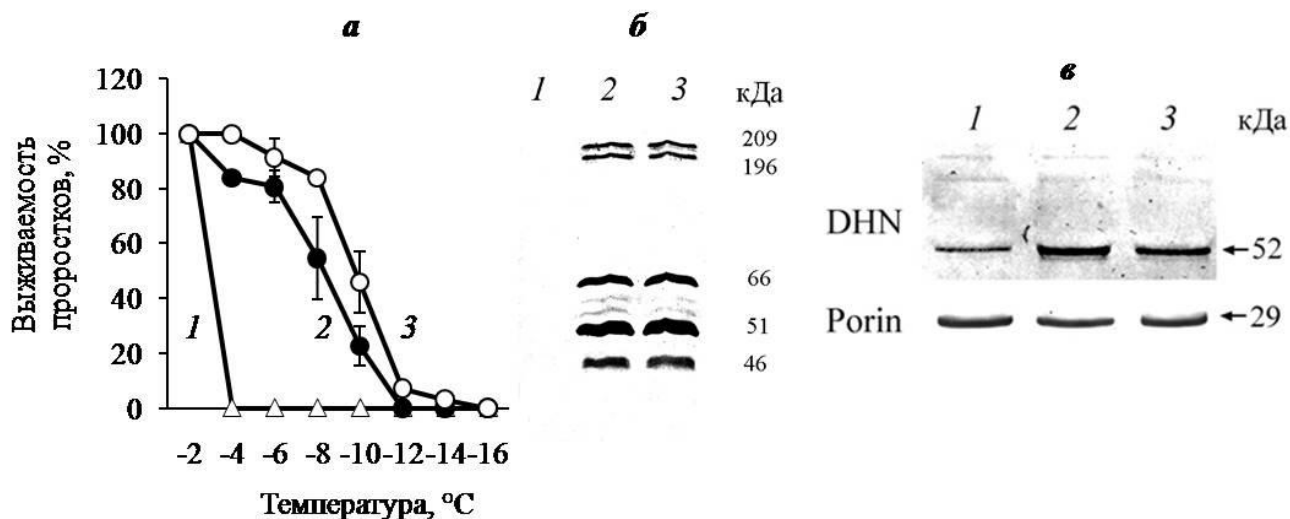


Рис. 1. Морозоустойчивость контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы (а) и содержание дегидринов в побегах проростков (б) и изолированных из них митохондриях (в).

Выживаемость проростков анализировали через 7 сут после промораживания (24 ч обработка).

Обозначения: 1 – контроль, 2 – хол. зак. 1 этап, 3 – хол. зак. 2 этапа, кДа – мол. массы изучаемых белков, DHN – дегидрины, Porin – порин. Использованы поликлональные антитела против К-сегмента дегидринов фирмы StressGen (США). M±S.D., n=3.

Благодаря высокой гидрофильности белковой молекулы дегидрины во время обезвоживания препятствуют потере клеткой воды и стабилизируют клеточные

белки [Sahran, Perras, 1987; Guy et al., 1992; Close, 1996], а также выполняют криопротекторную функцию и защищают липиды мембран от перекисного окисления [Rorat, 2006; Hara, 2010; Kosová et al., 2010; Hanin et al., 2011]. Дегидрины могут принимать участие в стабилизации мембранных структур митохондрий озимых злаков во время холодового закаливания [Романенко и др., 2010; Borovskii et al., 2002]. В митохондриях из побегов закаленных проростков озимой пшеницы нами выявлена индукция синтеза белка с мол. массой около 52 кДа (рис. 1, в), что согласуется с ранее полученными Г.В. Borovskii с соавт. [2002] данными о значительном увеличении содержания в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании дегидрина со сходной мол. массой.

Несмотря на достижения последних лет в области изучения механизмов низкотемпературной адаптации у растений, обзор которых проведен в работе Т.И. Труновой [2007], связь между развитием окислительного стресса, жирнокислотным составом, функциональной активностью митохондрий и их энергоассимилирующих систем при действии закаливающих и повреждающих низких температур на растения до конца не изучена. В связи с этим нами был проведен анализ этих параметров у митохондрий, изолированных из контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы, подвергнутых действию отрицательной температуры $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, при которой различия в морозоустойчивости контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы были хорошо выражены (рис. 2, а). Продолжительность воздействия температурой $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 ч была летальной для незакаленных проростков, в то время как закаленные проростки успешно противостояли губительному действию отрицательной температуры (рис. 2, а). Двумя методами (с помощью $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ и ДАБ) показано, что закаливание проростков озимой пшеницы, сопровождающееся повышением морозоустойчивости, при последующем холодовом шоке предотвращало развитие в тканях побегов окислительного стресса (рис. 2, б). Содержание АФК (рис. 2, в) и уровень флуоресценции продуктов ПОЛ (рис. 2, г) в митохондриях из закаленных проростков озимой пшеницы, подвергнутых холодовому шоку, были меньше, чем в митохондриях незакаленных проростков. Анализ жирнокислотного состава выявил наибольшее содержание в митохондриях озимой пшеницы пальмитиновой (14,6%), линолевой (46%) и α -линоленовой (26,1%) кислот (данные представлены в диссертации). Такое распределение в содержании жирных кислот является характерным свойством растительных митохондрий [Lyons et al., 1963; Edman, Ericson, 1987; Cantrel et al., 2000; Stupnikova et al., 2006; Matos et al., 2007, 2009]. При этом содержание α -линоленовой кислоты сохранялось на высоком уровне в митохондриях из закаленных проростков, подвергнутых холодовому шоку, в то время как снижалось в митохондриях незакаленных проростков после холодового шока (рис. 2, д). Более высокому содержанию α -линоленовой кислоты в митохондриях соответствовала более высокая интактность внешней мембраны (рис. 2, е). Из полученных данных следует, что содержание α -линоленовой кислоты является критическим фактором для сохранения криорезистентности мембран. Согласно данным А.Г. Верещагина [2007] меньший расход α -линоленовой кислоты в

проростках пшеницы к концу яровизации, по сравнению с другими жирными кислотами (например, линолевой), свидетельствует, что липиды, включающие α -линоленовую кислоту, имеют жизненно важное значение для поддержания нормальной структуры мембран и дальнейшего ускоренного развития проростков.

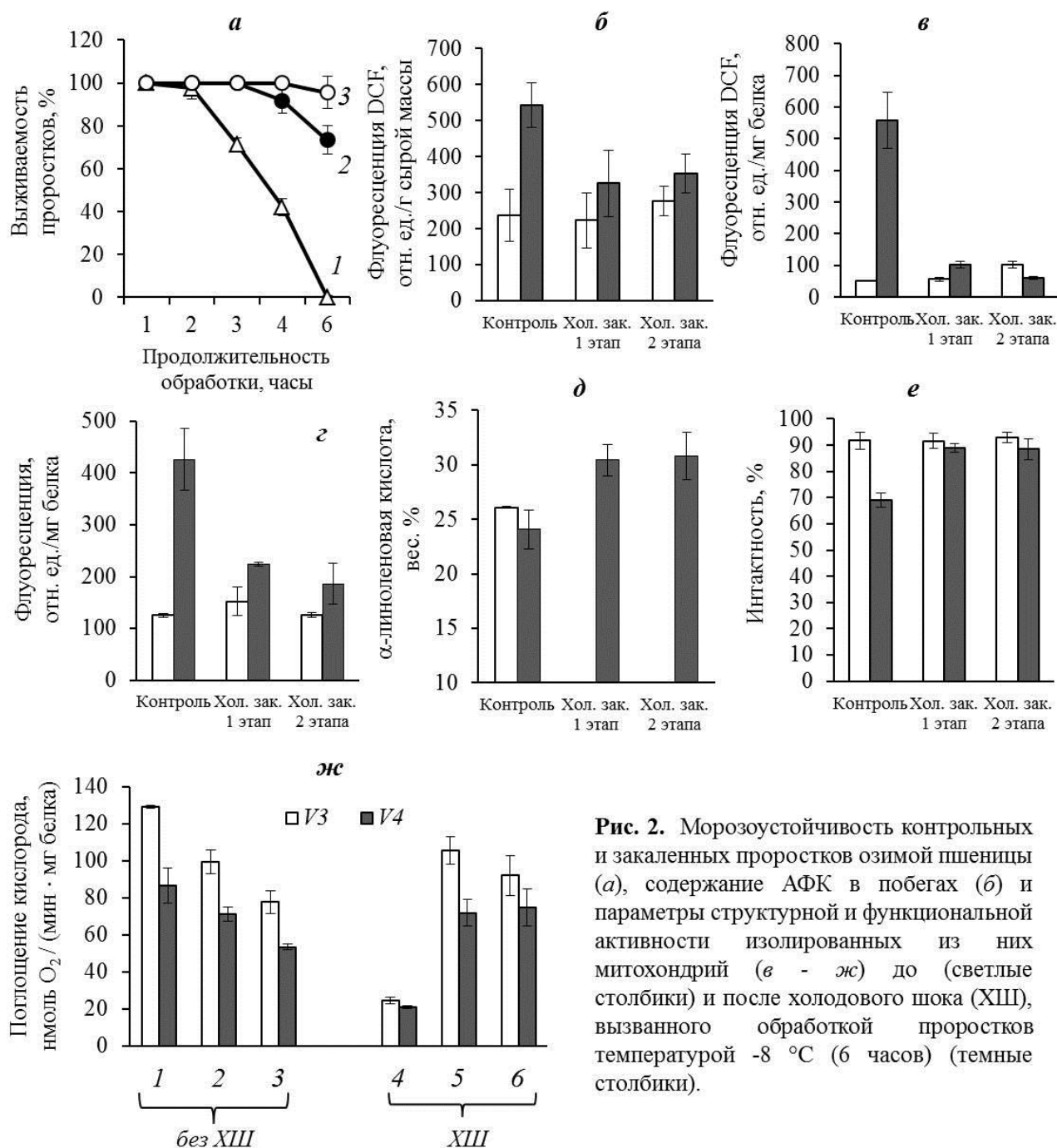


Рис. 2. Морозоустойчивость контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы (а), содержание АФК в побегах (б) и параметры структурной и функциональной активности изолированных из них митохондрий (в - ж) до (светлые столбики) и после холодового шока (XIII), вызванного обработкой проростков температурой $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 часов) (темные столбики).

а – выживаемость проростков при температуре $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 – контроль, 2 – хол. зак. 1 этап, 3 – хол. зак. 2 этапа), б – содержание АФК в побегах проростков, в – содержание АФК в митохондриях при окислении сукцината, г – уровень флуоресценции продуктов ПОЛ, д – содержание α -линоленовой кислоты в митохондриях, е – интактность наружной мембраны митохондрий, ж – скорость окисления сукцината митохондриями в присутствии АДФ (V3) и в его отсутствие (V4) (1, 4 – контроль, 2, 5 – хол. зак. 1 этап, 3, 6 – хол. зак. 2 этапа). М±S.D., n=3-10.

Снижение продукции АФК митохондриями, возможно, защищает их мембраны от развития ПОЛ и способствует сохранению их интактности, что, должно обеспечивать возможность протекания процесса окислительного

фосфорилирования во внутренней мембране митохондрий. Действительно, если действие отрицательной температуры на незакаленные проростки приводило к значительному снижению окислительной и фосфорилирующей активности в изолированных из них митохондриях, то скорости дыхания и энергетическая активность в митохондриях закаленных проростков, подвергнутых холодовому шоку, оставались стабильными (рис. 2, ж). Следует отметить, что закаливание проростков озимой пшеницы сопровождалось снижением скоростей дыхания митохондрий, но не снижением степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (рис. 2, ж), что согласуется с работами [Нарийчук, Бабенко, 1981; Хохлова и др., 1993]. Снижение скоростей поглощения кислорода митохондриями холодоустойчивых сортов озимой пшеницы в процессе закаливания, наряду с сохранением энергетической эффективности дыхания, придает большую стабильность митохондриям и позволяет обеспечивать синтетические процессы в клетке при закаливании [Нарийчук, Бабенко, 1981]. Такая стратегия реализуется при длительном действии закаливающих к холоду температур, что наблюдается в природных условиях в осенний период, когда озимые злаки приобретают обратимую морозоустойчивость. Что будет происходить при резком снижении температуры окружающей среды, имитирующей заморозки? В этом случае повышение скорости дыхания за счет активации энергорассеивающих систем приведет к термогенезу. С использованием этиолированных проростков различных злаков (озимая пшеница, озимая рожь, кукуруза) и двудольных растений (горох) нами показано, что термогенез является одним из способов защиты растений при низкотемпературном стрессе [Войников и др., 2001а, б; Grabelnych et al., 2003; Kolesnichenko et al., 2003а; Tourchaninova et al., 2005]. При этом установлено, что термогенез более выражен при действии отрицательной температуры на незакаленные проростки растений, чем на закаленные (рис. 3) [Войников и др., 2001а; Kolesnichenko et al., 2003а].

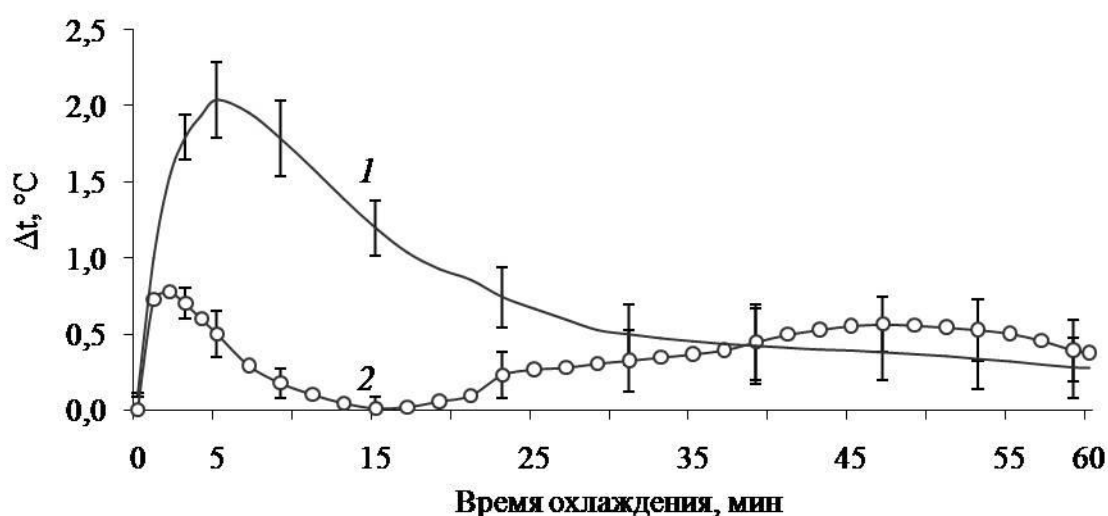


Рис. 3. Разница температур между живыми и «субитыми» незакаленными (1) и закаленными (2) побегами этиолированных проростков озимой пшеницы при 4 °C в течение 7 суток (2) побегами этиолированных проростков озимой пшеницы при действии отрицательной температуры -4 °C. $M \pm S.D.$, $n=3$.

Так, при холодовом стрессе, индуцируемом помещением проростков в камеру с температурой $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, наблюдали более существенное увеличение разницы температур между живыми и «убитыми» незакаленными проростками, чем закаленными (рис. 3). Полученные данные позволили нам предположить, что в закаленных проростках озимых злаков функции систем, обеспечивающих снижение степени сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях, другие, в частности, они могут быть связаны с участием в антиокислительной защите клетки. Снижение скоростей дыхания при действии низкой температуры может приводить к повышению генерации АФК, связанному с перевосстановлением пула убихинона, при этом переключение на нефосфорилирующие пути дыхания может предотвращать такую ситуацию.

2. Механизмы и функции энергорассеивающих систем в митохондриях растений и роль митохондрий в процессах адаптации и гибели растительных клеток при низких температурах

Методом иммуноблоттинга нами показано присутствие в белковом спектре митохондрий озимой пшеницы белков, ответственных за альтернативные пути транспорта электронов и нефосфорилирующее дыхание: АО, UCP1/2, NDA («внутренняя» ротенон-нечувствительная НАД(Ф)Н-ДГ), NDB («внешняя» ротенон-нечувствительная НАД(Ф)Н-ДГ). АО представлена в митохондриях озимой пшеницы белками с мол. массой 31 и 32 кДа, UCP1/2 одиночным белком с мол. массой около 32 кДа, NDA белками с мол. массами 63 и 56 кДа, а NDB белком с мол. массой 64 кДа (рис. 5, в). Учитывая присутствие в митохондриях озимой пшеницы NDA, NDB и АО, возможно, по меньшей мере, восемь различных путей транспорта электронов по дыхательной цепи: NDA – убихинон – комплекс III – комплекс IV; NDB – убихинон – комплекс III – комплекс IV; NDA – убихинон – АО; NDB – убихинон – АО; комплекс I – убихинон – комплекс III – комплекс IV; комплекс I – убихинон – АО; комплекс II – убихинон – комплекс III – комплекс IV; комплекс II – убихинон – АО. Альтернативные ферменты растений не являются протон-транслоцирующими и, следовательно, не способны к трансмембранной транслокации протонов, что позволяет им избежать лимитирования скорости переноса электронов генерируемым протонным потенциалом, т.е. эффекта дыхательного контроля [цит. по: Скулачев и др., 2010]. Кроме того, нами была показана ассоциация с митохондриями злаков цитоплазматического белка с мол. массой 310 кДа [Kolesnichenko et al., 2000; 2002]. Данный белок вызывает интерес в связи с его участием в регуляции степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в растительных митохондриях при низких температурах [Побежимова и др., 1996], однако механизм его разобщающего действия не известен. Изучение функционирования АО и БХШ 310, а также выяснение роли СЖК в энергетическом метаболизме проростков озимой пшеницы проводили в состоянии 4 (скорость дыхания в отсутствие АДФ), поскольку уровень дыхания в состоянии 4 отражает утечку протонов, и в этом состоянии пул убихинона наиболее восстановлен [James et al., 2004].

2.1. Функционирование в митохондриях озимой пшеницы альтернативной цианидрезистентной оксидазы

Альтернативная оксидаза была первой из обнаруженных у растений систем диссипации энергии в митохондриях. Хотя существует большое число работ относительно индукции альтернативного пути (АП) дыхания в растениях низкими температурами [Mc Nulti, Cummins, 1987; Stewart et al., 1990; Ribas-Carbo et al., 2000; Atkin et al., 2002; Calegario et al., 2003; Kurimoto et al., 2004; Fiorani et al., 2005; Sugie et al., 2006; Covey-Crump et al., 2007; Matos et al., 2007; Armstrong et al., 2008; Mizuno et al., 2008; Aken et al., 2009; Macfarland et al., 2009] однозначного ответа на вопрос о связи АП с холодоустойчивостью растений нет. Наряду с данными о важной роли АО при адаптации к холоду [Calegario et al., 2003; Matos et al., 2007; Mizuno et al., 2008] показано отсутствие положительной корреляции между активностью АО и холодоустойчивостью растений [Stewart et al., 1990; Ribas-Carbo et al., 2000]. После действия закаливающих температур на проростки озимой пшеницы наблюдали некоторое снижение интенсивности дыхания в тканях побегов (рис. 4, а), а с увеличением длительности охлаждения (на 3-7 сут) возрастало цианидрезистентное (ЦРД) дыхание, чувствительное к БГК, которое снижалось при последующем действии закаливающей отрицательной температуры (рис. 4, б). Механизм активации АО на посттрансляционном уровне связан с переходом неактивной формы фермента, существующей у растений в виде гомодимера, у которого мономеры ковалентно связаны дисульфидным мостиком, в активную, у которой дисульфидная связь восстановлена, а также во взаимодействии с α -кетокислотами, особенно пируватом [Millenaar, Lambers, 2003].

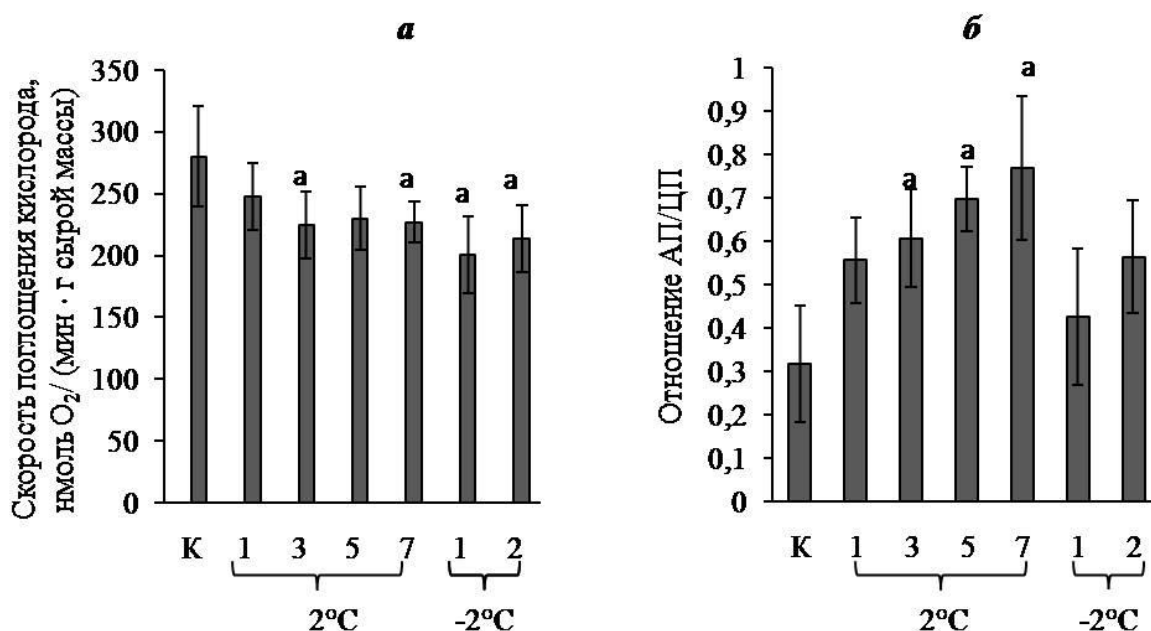


Рис. 4. Интенсивность дыхания (а) и отношение альтернативного пути (АП) дыхания к цитохромному (ЦП) (б) в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы до и после холодового закаливания.

Обозначения: К (контроль) - 3 сут этиолированные проростки, выращенные при 25±1 °С.

По оси абсцисс – сутки закаливания при соответствующих температурах.

а - различия между контрольными и закаленными проростками значимы. M±S.D., n=3.

В то же время *in vivo* активность АО очень сильно зависит от содержания белка альтернативной оксидазы, а, следовательно, и степени экспрессии его гена, а также от концентрации его субстрата – восстановленного убихинона [Siedow, Umbach, 2000; Millenaar et al., 2003]. У озимой пшеницы АО кодируется двумя генами *AOX1a* и *AOX1c* [Takumi et al., 2002], экспрессия которых возрастает после обработки низкой положительной температурой [Takumi et al., 2002; Mizuno et al., 2008]. В наших экспериментах в этиолированных проростках озимой пшеницы в начальный период закаливания наблюдали накопление транскриптов гена *AOX1c* (рис. 5, а) и увеличение содержания белка АО в митохондриях (рис. 5, в). Наряду с *AOX1c* индуцировалась экспрессия генов *NAD7* и *ATP6* (рис. 5, б).

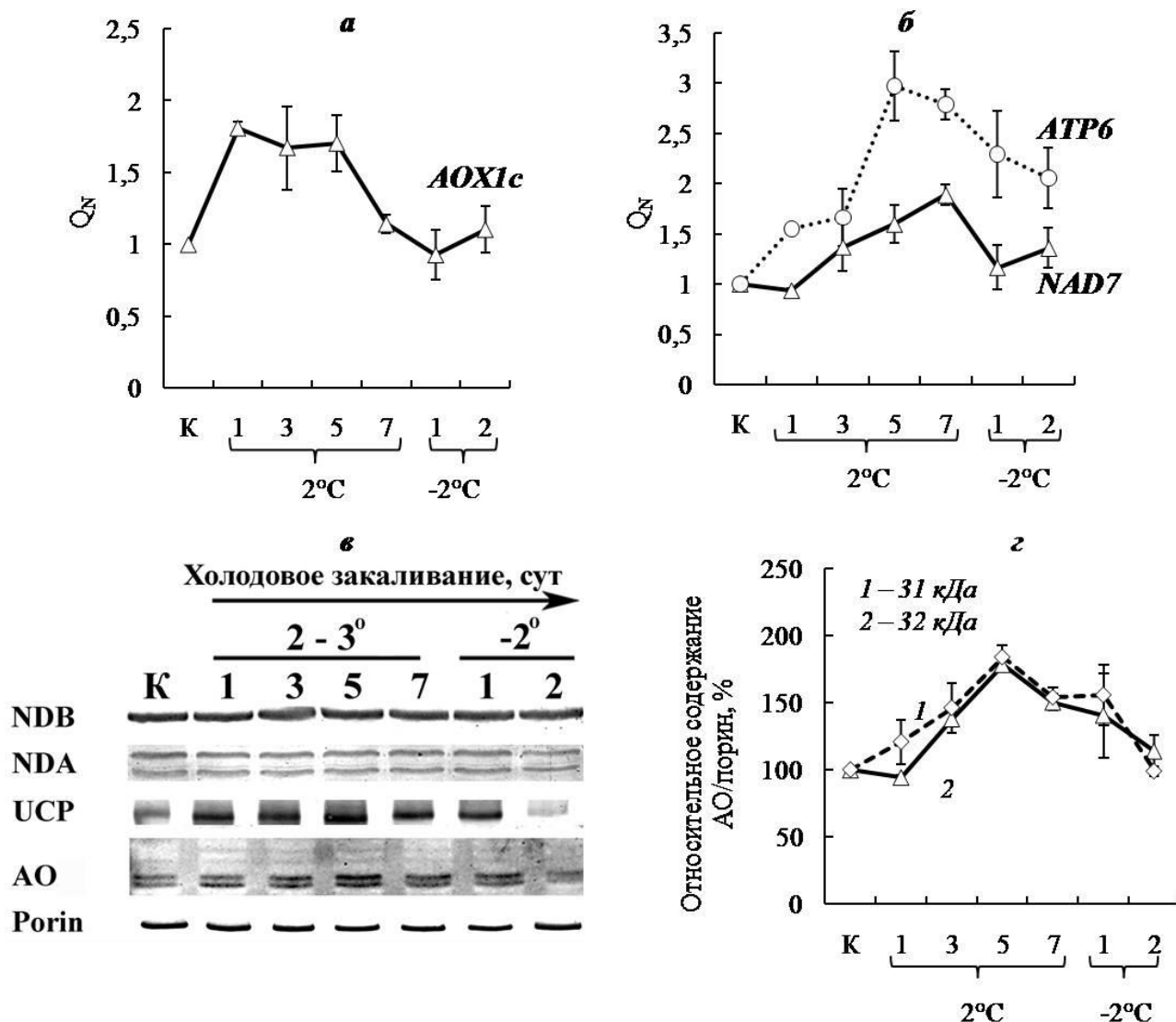


Рис. 5. Изменение экспрессии генов (а, б) и содержания митохондриальных белков (в, г) в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы до и после холододового закаливания.

Обозначения: К (контроль) - 3 сут этиолированные проростки, выращенные при 25±1 °С. По оси абсцисс – сутки закаливания при соответствующих температурах. M±S.D., n=3-6. Антитела на NDA и NDB (от Prof. A. Rasmusson, Lund University, Швеция), UCP (AS12 1850, Agrisera, Швеция), АО (AS10 699, Agrisera, Швеция), Porin (порин, от Prof. T. Elthon, University of Nebraska, США).

Как показано на митохондриях, изолированных из мягкой и твердой пшеницы, функционирование АО при окислении малата позволяет поддерживать потенциал на внутренней митохондриальной мембране за счет первого пункта

сопряжения в дыхательной цепи [Абдрахимова и др., 2011; Pastore et al., 2001]. Эти данные могут объяснить наблюдаемый нами скоординированный характер экспрессии генов *AOX1c*, *NAD7*, *ATP6* в начальный период закаливания, поскольку при согласованной работе комплекса I, АТФ-синтазы и АО сохраняется возможность генерации $\Delta\mu_{H^+}$ в первом пункте сопряжения и возможность синтеза АТФ, необходимого для эффективного закаливания. В дальнейшем мы провели изучение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий озимой пшеницы и оценили способность АО к транспорту электронов при окислении малата, сукцината и НАДН. При изучении окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий, изолированных из контрольных проростков озимой пшеницы оказалось, что наиболее активно митохондрии окисляют малат, с большей скоростью сукцинат и самая высокая скорость поглощения кислорода характерна для митохондрий, окисляющих экзогенный НАДН (рис. 6). При этом обнаружилась сильная зависимость скорости окисления малата, по сравнению с сукцинатом и НАДН, от присутствия БСА в средах (рис. 6), что может свидетельствовать о большем родстве комплекса I к СЖК. В присутствии БСА во всех средах, отношение АДФ/О при окислении малата и сукцината было близким к теоретически возможному (около 3 для малата и 2 для сукцината), а коэффициент ДК был равен не менее 3,50 для малата и 1,60 для сукцината.

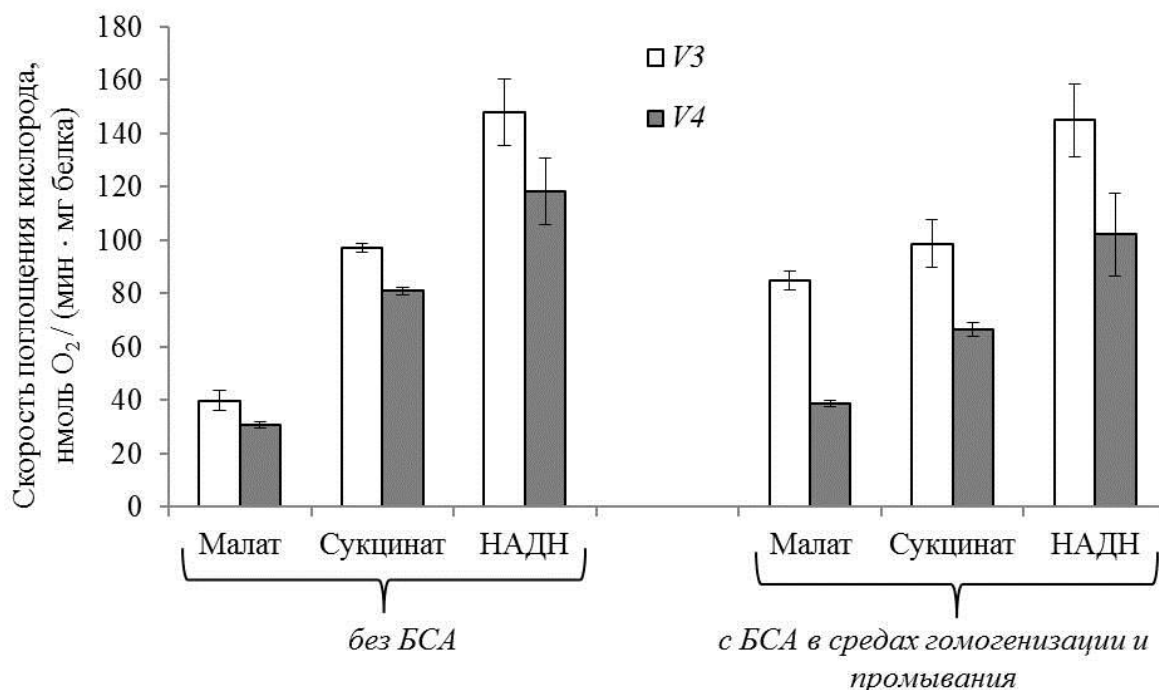


Рис. 6. Окислительная активность митохондрий озимой пшеницы, изолированных в средах без БСА и присутствии БСА в средах гомогенизации и промывания. Концентрация БСА составляла 0,1% в среде гомогенизации и 0,2% в среде промывания. $M \pm S.D.$, $n=3-4$.

Поскольку существуют данные об ингибировании альтернативной оксидазы свободными жирными кислотам [Sluse et al., 1998; Almeida et al., 1999], с использованием малата как субстрата окисления мы провели изучение влияния БСА на способность АО к транспорту электронов. Митохондрии, выделенные в

отсутствие БСА, не обладали активностью АО, дыхание в состоянии 4 было полностью цианид-чувствительным, а добавление БСА в среду инкубации вызывало активацию ЦРД (данные представлены в диссертации). Данное обстоятельство, возможно, связано с тем, что СЖК, высвобождающиеся при разрушении ткани в процессе гомогенизации, ингибируют активность АО. Способность АО к транспорту электронов в изолированных митохондриях зависела от субстрата окисления: была максимальной при окислении малата (около 47%) и наименьшей при окислении НАДН (около 14%) (рис. 7). После первой фазы холодого закаливания в митохондриях проростков озимой пшеницы наблюдалось снижение скорости потока электронов по цитохромному пути, в то время как сохранялся транспорт электронов по альтернативному пути (рис. 7). Эти изменения были характерны для митохондрий озимой пшеницы при окислении ими малата, сукцината и НАДН в отсутствие активаторов АО. Сохранение способности АО к переносу электронов в митохондриях озимой пшеницы на первом этапе холодого закаливания, как было показано, сопровождается накоплением транскриптов *AOX1c* и увеличением содержания белка АО (рис. 5).

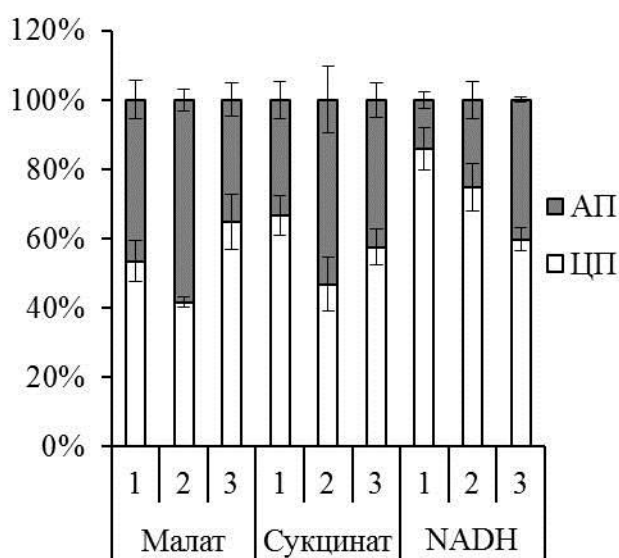


Рис. 7. Вклад ЦП и АП в дыхание при окислении различных субстратов митохондриями из контрольных (1) и закаленных (2, 3) проростков.

Митохондрии выделяли в присутствии БСА в среде гомогенизации (0,1%) и промывания (0,2%), дыхание определяли в отсутствие пирувата и ДТТ. $M \pm S.D.$, $n=3$.

Обозначения: 1 – Контроль, 2 – Хол. зак. 1 этап, 3 – Хол. зак. 2 этапа. За 100% принята скорость дыхания митохондрий в состоянии 4.

Поскольку термогенерация тканями закаленных проростков озимой пшеницы незначительна (рис. 3), возможно, основное назначение АО в период низкотемпературной адаптации заключается в поддержании синтеза АТФ, обеспечении синтетических процессов в клетке и предотвращении развития окислительного стресса. Для проверки способности компонентов ЭТЦ митохондрий озимой пшеницы к образованию АФК и выявления антиоксидантной способности АО оценивали изменения в уровнях АФК в митохондриях в присутствии различных ингибиторов ЦП и АП (рис. 8) [Грабельных и др., 2011]. При этом использовали подход, который был применен другими исследователями при изучении способности АО регулировать образование АФК в митохондриях [Попов и др., 2003]. Согласно данным ингибиторного анализа ротенон не вызывал достоверных изменений уровня АФК,

тогда как антимицин А и БГК усиливали генерацию АФК в митохондриях из контрольных проростков (рис. 8, а). В отличие от антимицина А и БГК, КСН подавлял образование АФК митохондриями (на 41%), а КЦХФ не влиял на уровень продукции АФК (рис. 8, а). В то же время антимицин А не усиливал образование АФК в митохондриях из побегов проростков, прошедших первый этап холодого закаливания, по сравнению с митохондриями незакаленных проростков, инкубация с БГК еще больше повышала содержание в них АФК, а добавление КСН и КЦХФ приводило к снижению продукции АФК (рис. 8, б). Такие изменения в содержании АФК в ответ на добавление митохондриальных ингибиторов указывают на то, что основным сайтом генерации АФК в митохондриях в данных условиях является Q-цикл, а функционирование АО позволяет предотвращать генерацию АФК.

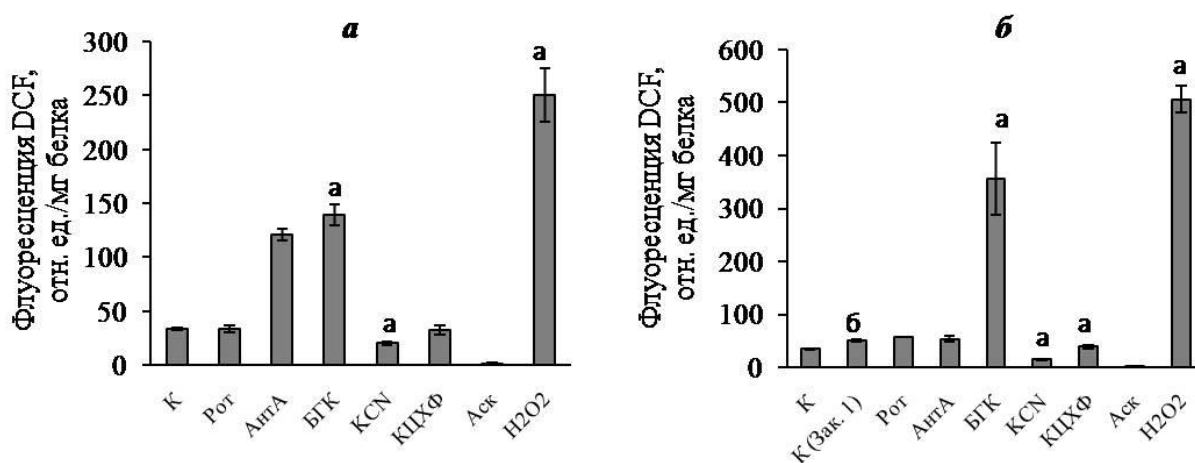


Рис. 8. Влияние ингибиторов дыхания на содержание АФК в митохондриях озимой пшеницы из контрольных (а) и закаленных (б) проростков.

Обозначения: К (контроль) и К (Зак. 1) – митохондрии из побегов контрольных проростков и проростков после первого этапа закаливания, соответственно, в отсутствие ингибиторов. Rot – 3 мкМ ротенон, AntA – 20 мкМ антимицин А, БГК – 1 мМ бензгидроксисамовая кислота, КСН – 0,4 мМ КСН, КЦХФ – 1 мкМ карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон, Аск – 60 мМ аскорбиновая кислота, H₂O₂ – 1 мМ перекись водорода. а - различия между вариантами в отсутствие и присутствии ингибиторов значимы, б - различия между митохондриями контрольных и закаленных проростков значимы. М±S.E., n=3–8.

При кратковременном низкотемпературном стрессе АО может вносить вклад в термогенез проростков озимой пшеницы, что показано нами в экспериментах с использованием ингибитора АО - БГК и ингибитора ЦО - КСН (рис. 9) [Grabelnych et al., 2003]. Установлено, что инфильтрация проростков озимой пшеницы БГК снижает интенсивность поглощения кислорода тканями побегов на 30% по отношению к контролю, в то время как одновременная инфильтрация проростков КСН и БГК снижает скорость поглощения кислорода побегами проростков на 76%. Инфильтрация проростков БГК снижала разницу температур живых и «убитых» побегов проростков примерно на один градус по сравнению с контролем в первые 15-20 мин холодого воздействия (рис. 9). Одновременная инкубация проростков КСН и БГК снижала генерацию тепла проростков более значительно, в первые 15 мин холодого стресса разница между живыми и «убитыми» побегами составляла менее 0,5 °С, а затем уменьшалась практически до 0 °С (рис. 9) [Grabelnych et al., 2003]. Чтобы выяснить участие АО в

антиокислительной защите клеток растений при холодовом стрессе в другой серии экспериментов было изучено влияние БГК и активатора АО – пирувата на содержание диеновых конъюгатов в побегах проростков озимой пшеницы при холодовом стрессе (-4 °С, 1 ч) и показано, что образование диеновых конъюгатов снижалось на 30% под действием пирувата, и увеличивалось на 30% под действием БГК [Kolesnichenko et al., 2001c].

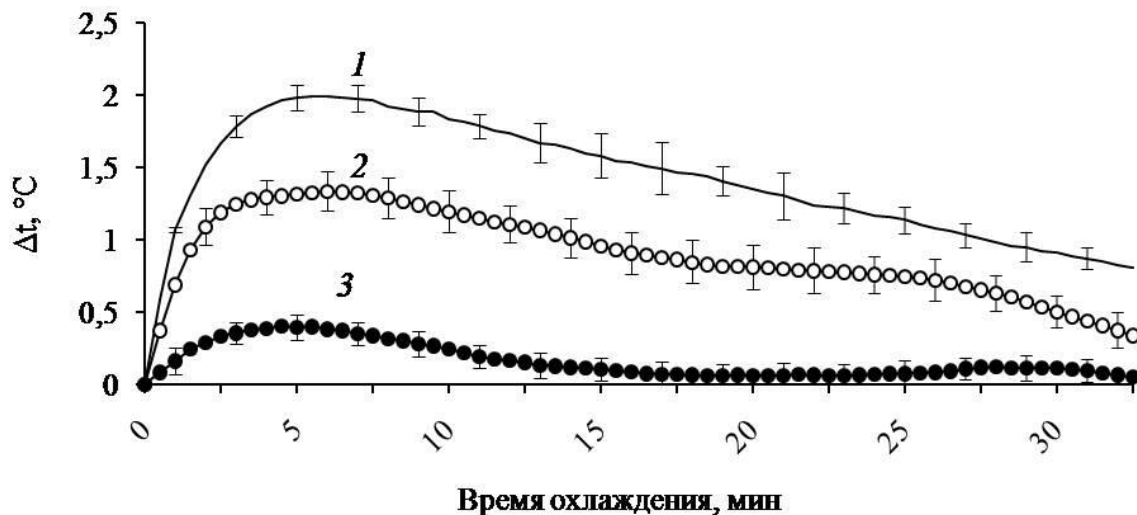


Рис. 9. Разница температур между инфильтрованными водой и «убитыми» (1), инфильтрованными БГК и «убитыми» (2), инфильтрованными БГК+КСН и «убитыми» (3) побегами этиолированных проростков озимой пшеницы при действии отрицательной температуры -4 °С. M±S.D., n=3.

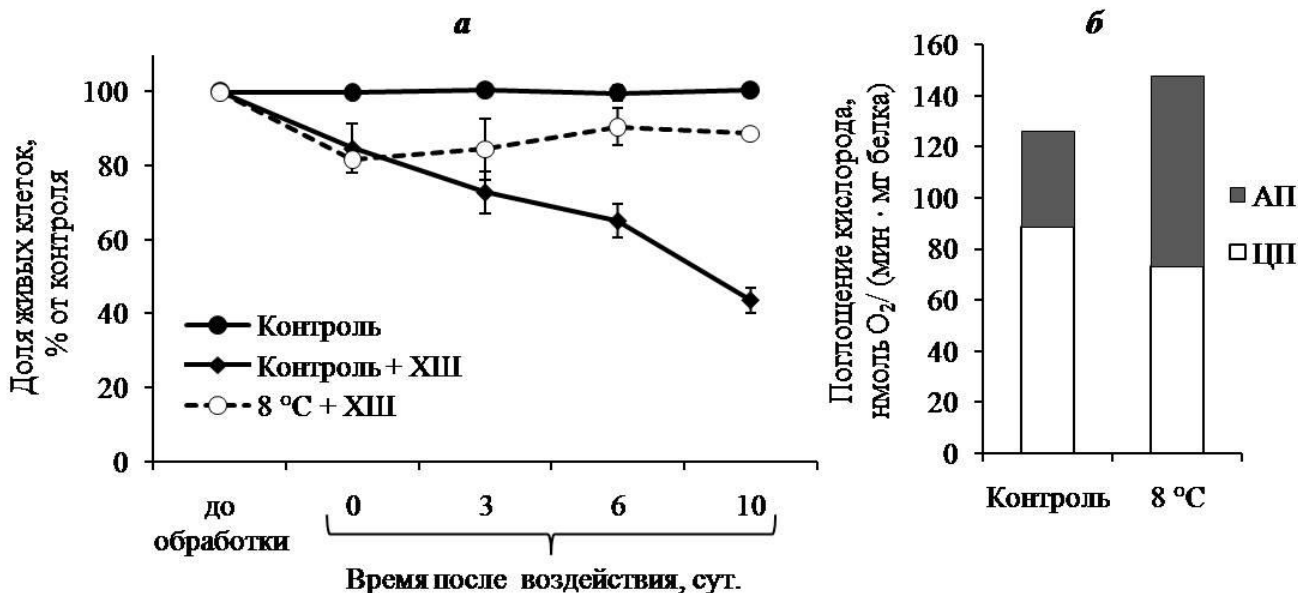


Рис. 10. Морозоустойчивость клеток контрольной и закаленной суспензионной культуры озимой пшеницы (а) и вклад в дыхание альтернативного (АП) и цитохромного (ЦП) путей транспорта электронов (б).

Обозначения: Контроль - культура клеток, выращенная при температуре 26 °С; 8 °С - культура клеток после экспозиции при 8 °С в течение 7 суток; XIII - холодовой шок (-8 °С, 6 часов). M±S.D., n=3-10.

Альтернативный путь дыхания, связанный с функционированием АО, может быть одним из механизмов, защищающих клетки суспензионной культуры

озимой пшеницы от гибели при действии повреждающих отрицательных температур (рис. 10). Из рис. 10 видно, что отрицательная температура $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 ч) вызывает развитие клеточной гибели в суспензионной культуре озимой пшеницы, а предварительное холодное закаливание предотвращает этот процесс, при этом при холодном закаливании активируется альтернативный путь дыхания [Любушкина и др., 2010; Lyubushkina et al., in press]. Таким образом, альтернативная оксидаза принимает участие в процессе адаптации клеток растений к низким температурам.

2.2. Альтернативные rotenon-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы в митохондриях озимой пшеницы

В отличие от животных, растения способны окислять цитоплазматический НАДН, а также матриксный НАДН в обход комплекса I дыхательной цепи [Møller, 2001; Rasmusson et al., 2004, 2008]. В митохондриях этиолированных проростков озимой пшеницы присутствуют NDB и NDA, содержание которых при холодном закаливании значительно не изменяется (рис. 5, в). Чтобы выявить участие альтернативных НАД(Ф)Н-ДГ при адаптации к холоду, мы изучили активность «внутренней» и «внешней» rotenon-нечувствительных НАД(Ф)Н-ДГ в митохондриях озимой пшеницы и изменение их активности при закаливании. Наиболее высокой в митохондриях озимой пшеницы из контрольных проростков была активность «внешней» НАДН-ДГ, которая возрастала при действии низкой положительной температуры на проростки и сохранялась на уровне контрольных митохондрий при действии закаливающей отрицательной температуры (рис. 11). Активность «внешней» НАДФН-ДГ была ниже и снижалась при действии низких температур (рис. 11). Эти результаты подтверждаются данными полярографического анализа (представлены в диссертации) и свидетельствуют, что на наружной стороне внутренней митохондриальной мембраны митохондрий озимой пшеницы локализованы, по меньшей мере, две различные «внешние» дегидрогеназы, одна специфичная для НАДН, другая для НАДФН, первая из них наиболее стабильна при действии низких температур.

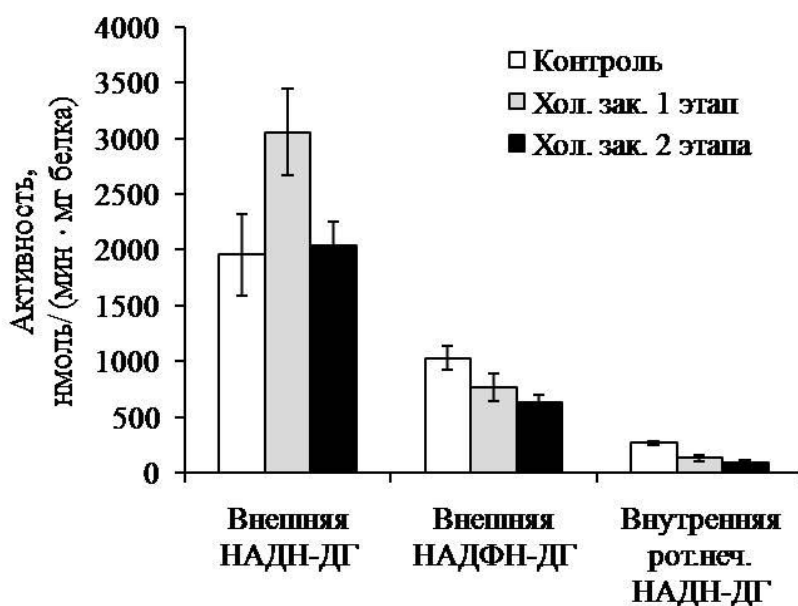


Рис. 11. Влияние закаливающих температур на активность альтернативных «внешних» и «внутренней» НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы. $M \pm S.D.$, $n=3$.

Что касается активности внутренней rotenon-нечувствительной НАДН-ДГ, то она была очень низкой по сравнению с окислением экзогенного НАДН и снижалась при действии закаливающих температур (рис. 11). Высокая активность «внешней» НАДН-дегидрогеназы в митохондриях из закаленных проростков озимой пшеницы, вероятно, связана с необходимостью компенсировать снижение скоростей окисления малата и сукцината, сохранить необходимый уровень НАД⁺ в цитоплазме, чтобы не допустить торможение работы гликолиза и цикла Кребса.

2.3. Роль свободных жирных кислот в энергетическом метаболизме митохондрий растений: разобщители окислительного фосфорилирования и субстраты окисления

Свободные (не-этерифицированные) жирные кислоты в энергетическом метаболизме животных выполняют двойную роль: с одной стороны, СЖК вызывают рассеивание энергии, выступая в качестве разобщителей окислительного фосфорилирования, с другой – СЖК являются источником энергии (субстратом дыхания митохондрий) [Скулачев, 1989; Schulz, 2002]. В классическом понимании путей катаболизма ЖК β -окисление у животных протекает как в митохондриях, так и пероксисомах, а у растений только в пероксисомах [Schulz, 2002]. Однако существуют доказательства, что у растений митохондрии также участвуют в деградации СЖК посредством β -окисления [Masterson and Wood, 2000; Salon et al., 1988; Raymond et al., 1992; Theologis, Larties, 1980]. На основании результатов исследований о значительном увеличении содержания СЖК (как насыщенных, так и ненасыщенных) в митохондриях растений в стрессовых условиях [Vojnikov et al., 1983; Войников, 1987; Laus et al., 2011] мы предположили, что СЖК в митохондриях проростков озимых злаков могут выступать как в качестве разобщителей, так и в качестве субстратов окисления. Чистота митохондриальной фракции оценивалась с использованием фермента маркера пероксисом гидроксипируватредуктазы и была очень низкой после очистки митохондрий в градиенте перколла (не более 8-10% от активности фермента в грубой фракции). С использованием ряда насыщенных и ненасыщенных ЖК в данной работе показано, что наибольшим разобщающим действием в митохондриях озимой пшеницы обладают лауриновая (12:0), пальмитиновая (16:0), линолевая (18:2($\Delta^{9,12}$)) и линоленовая (18:3($\Delta^{9,12,15}$)) кислоты [Грабельных и др., 2009], разобщающий эффект некоторых из них представлен на рис. 12. Ингибиторный анализ показал, что увеличение скорости поглощения кислорода, вызванное СЖК, блокируется ингибиторами цитохромного и альтернативного цианидрезистентного путей переноса электронов, не связано с активностью липоксигеназы и АТФ-чувствительного K⁺-зависимого канала, а обусловлено функционированием АТФ/АДФ-антипортера и УСР-подобных белков [Грабельных и др., 2009] (данные представлены в диссертации). При этом обнаружилось, что в разобщении насыщенными ЖК кислотами в основном принимает участие АТФ/АДФ-антипортер, а ненасыщенными – УСР-подобные белки. Эти переносчики принимают участие в механизмах «мягкого» разобщения [Скулачев, 1994; Скулачев и др., 2010]. Индукция карнитинового механизма и использование ингибитора карнитин *O*-пальмитоилтрансферазы I – этомоксира

позволили нам выявить, что СЖК могут выступать субстратами окисления для митохондрий озимой пшеницы (рис. 13).

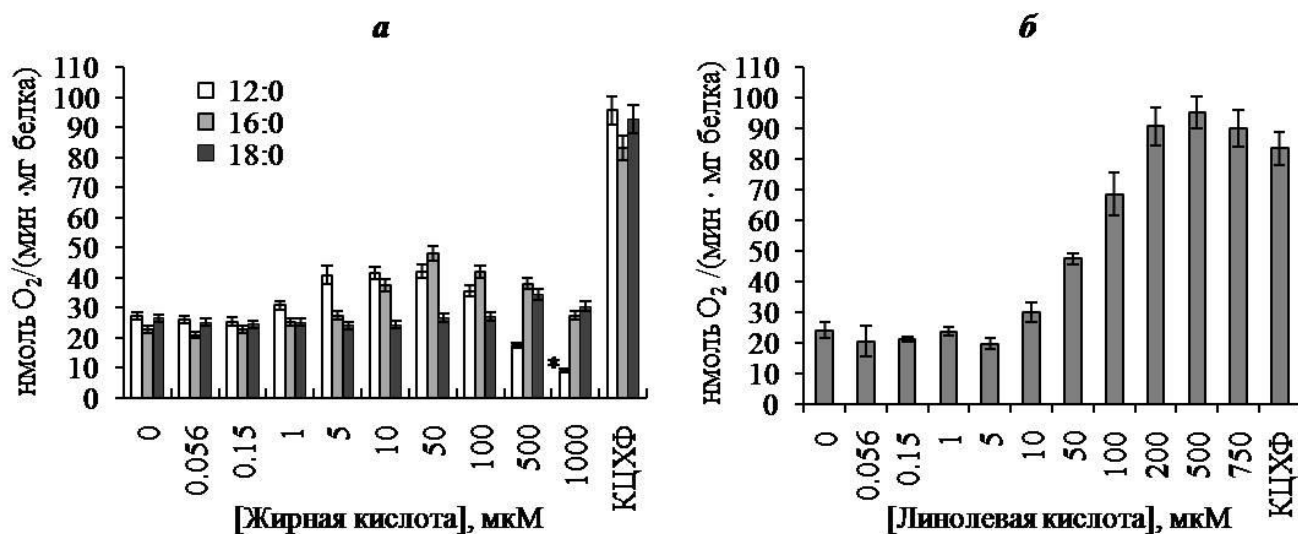


Рис. 12. Влияние насыщенных жирных кислот (а) и ненасыщенной линолевой кислоты (б) на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 у митохондрий озимой пшеницы, окисляющих малат. $M \pm S.D.$, $n=3-4$.

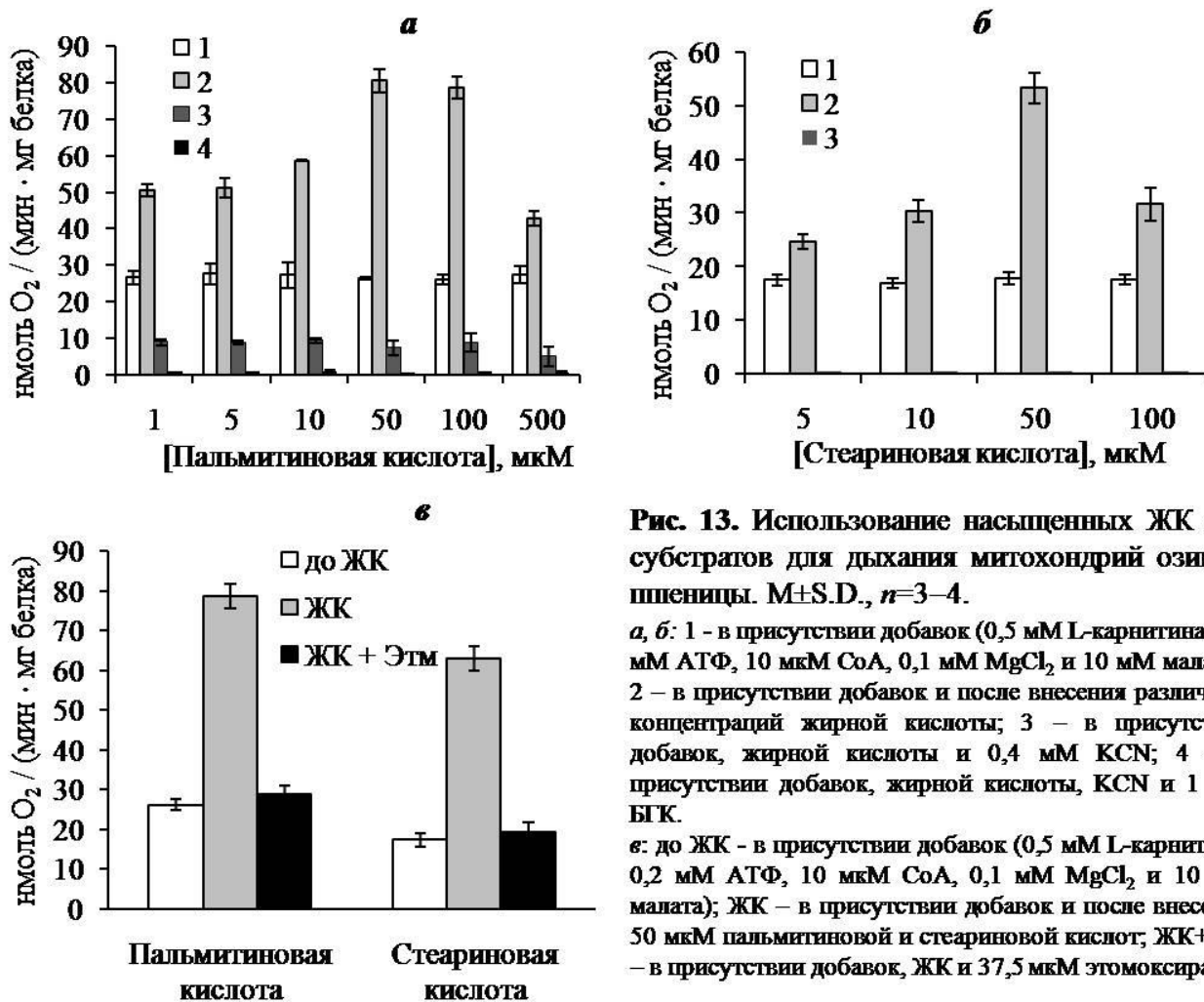


Рис. 13. Использование насыщенных ЖК как субстратов для дыхания митохондрий озимой пшеницы. $M \pm S.D.$, $n=3-4$.

а, б: 1 - в присутствии добавок (0,5 мМ L-карнитина, 0,2 мМ АТФ, 10 мкМ СоА, 0,1 мМ MgCl₂ и 10 мМ малата); 2 - в присутствии добавок и после внесения различных концентраций жирной кислоты; 3 - в присутствии добавок, жирной кислоты и 0,4 мМ KCN; 4 - в присутствии добавок, жирной кислоты, KCN и 1 мМ БГК.

в: до ЖК - в присутствии добавок (0,5 мМ L-карнитина, 0,2 мМ АТФ, 10 мкМ СоА, 0,1 мМ MgCl₂ и 10 мМ малата); ЖК - в присутствии добавок и после внесения 50 мкМ пальмитиновой и стеариновой кислот; ЖК+Этм - в присутствии добавок, ЖК и 37,5 мкМ этанооксира.

Нами показано, что СЖК и активируемые ими системы разобщения участвуют в адаптации к кратковременному холодovому стрессу и длительной

низкотемпературной адаптации [Грабельных и др., 2013]. С помощью антител против UCP1/2 показано некоторое повышение содержания UCP в митохондриях озимой пшеницы после 1 ч обработки проростков температурой -8°C , которое сопровождалось увеличением скоростей дыхания в состояниях 3 и 4 у митохондрий, выделенных из побегов этих проростков, и стимуляцией скорости нефосфорилирующего дыхания линолевой кислотой, что было связано с возрастанием активности как АТФ/АДФ антипортера, так и рUCP (рис. 14). В то же время холодовой шок, вызванный обработкой проростков температурой -8°C в течение 3 и 6 ч, которая приводила к частичной (3-х часовое воздействие) (30%) или полной (6-ти часовое воздействие) гибели проростков, вызывал повреждение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий, опосредованное действием АФК, которое сопровождалось снижением содержания цитохрома с в митохондриях (рис. 14).

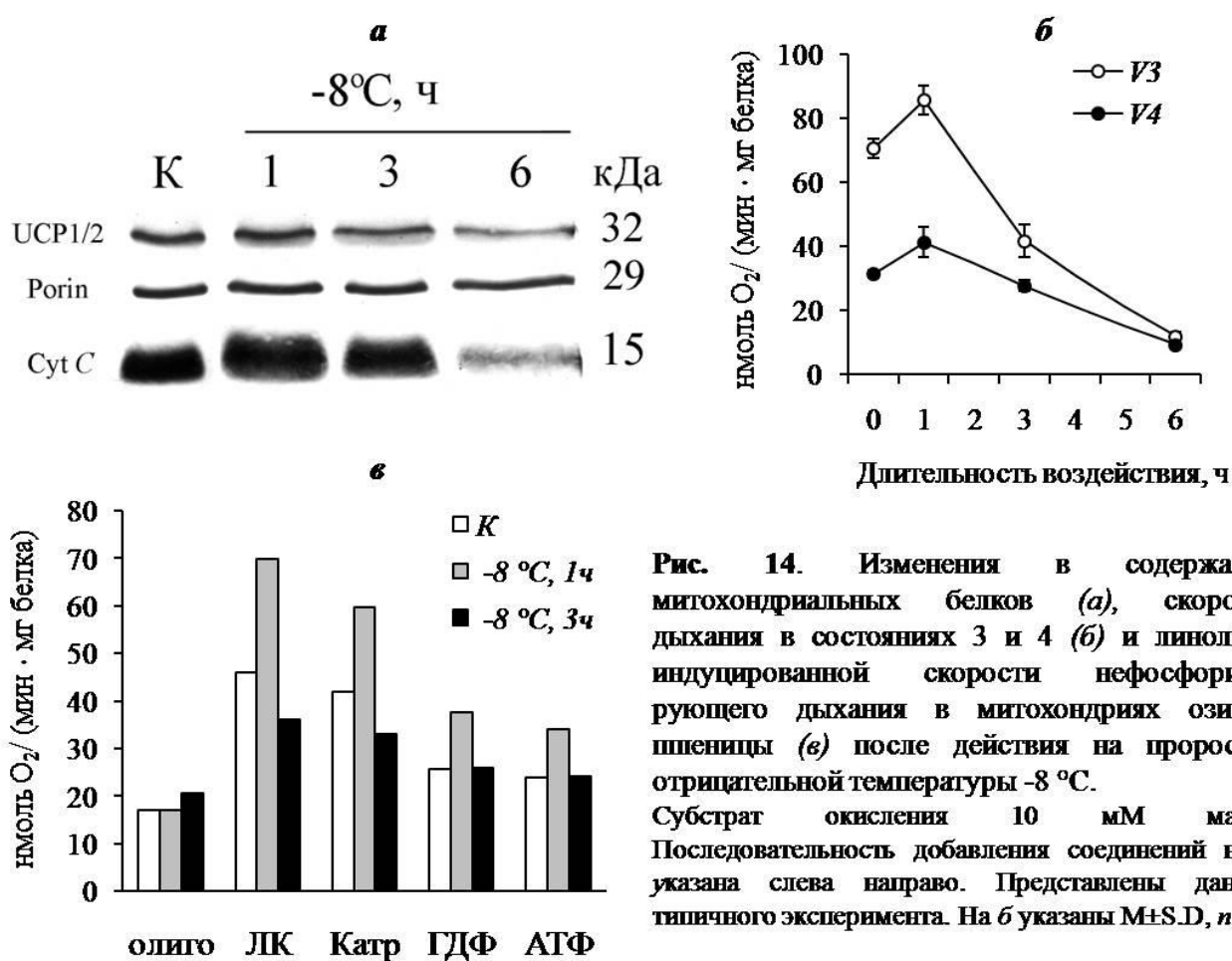


Рис. 14. Изменения в содержании митохондриальных белков (а), скорости дыхания в состояниях 3 и 4 (б) и линолеатиндуцированной скорости нефосфорилирующего дыхания в митохондриях озимой пшеницы (в) после действия на проростки отрицательной температуры -8°C . Субстрат окисления 10 мМ малат. Последовательность добавления соединений на в указана слева направо. Представлены данные типичного эксперимента. На б указаны $M \pm S.D$, $n=3$.

Обозначения: К (контроль) – до воздействия отрицательной температурой, олиго - олигомицин (2.5 мкг/мг белка митохондрий), ЛК – линолевая кислота (10 мкМ), Катр – карбоксиатрактылозид (2 мкМ), ГДФ, АТФ – 2 мМ ГДФ или 2 мМ АТФ. Антитела на UCP1/2 (AS12 1850, Agriscera, Швеция), Porin (порин, от Prof. T. Elthon, University of Nebraska, США), Cyt C (цитохром с, 7H8.2C12, Pharmingen, США).

Таким образом, стимуляция дыхания ненасыщенными СЖК может представлять собой защитный механизм, обеспечивающий выживание растений на начальном этапе действия отрицательной температуры. При действии отрицательной температуры на незакаленные проростки показано участие СЖК в

термогенерации [Grabelnych et al., 2003] и снижении образования диеновых конъюгатов в проростках растений [Kolesnichenko et al., 2001c]. Участие СЖК в термогенерации доказано в экспериментах с прокаинном (ингибитором фосфолипазы A_2 в митохондриях животных) и KCN [Войников и др., 2001a; Grabelnych et al., 2003]. Установлено, что при холодовом стрессе живые проростки озимой пшеницы поддерживали температуру на 2 °С выше, по сравнению с «убитыми» проростками, инфильтрация проростков прокаинном уменьшала генерацию тепла проростками с 2 до 1,5 °С, а инфильтрация KCN - с 2 до 1 °С в 15 – 20 мин с начала холодной обработки (рис. 15).

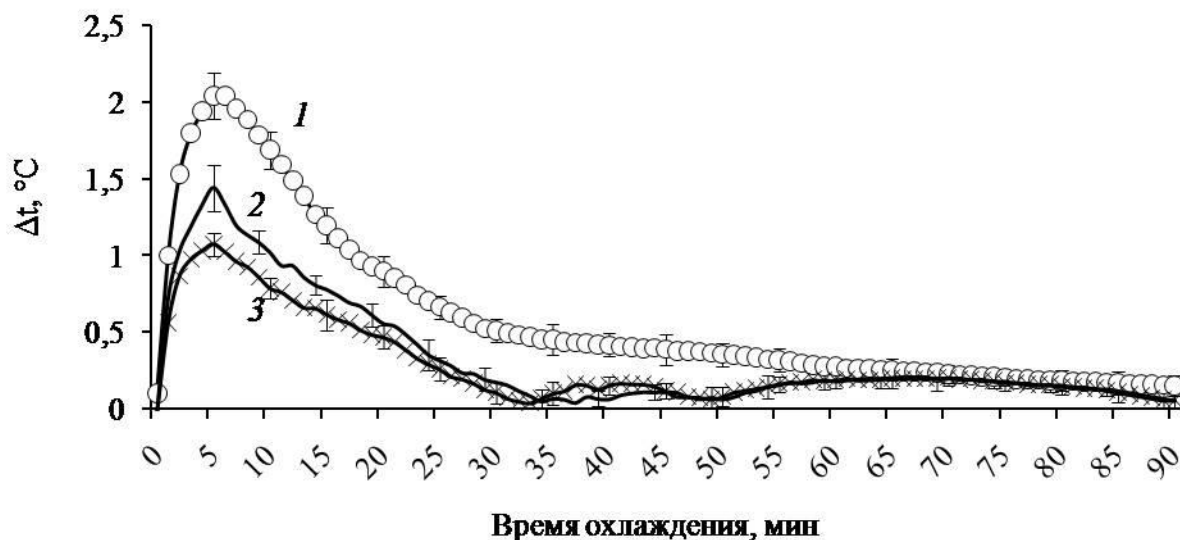


Рис. 15. Разница температур между инфильтрованными водой живыми и «убитыми» (1), инфильтрованными прокаинном живыми и «убитыми» (2), инфильтрованными KCN живыми и «убитыми» (3) проростками озимой пшеницы при действии отрицательной температуры -4 °С. $M \pm S.D.$, $n=6$.

Снижение посредством инфильтрации прокаинном генерации тепла проростками указывает на участие в термогенерации разобщающих систем, связанных с СЖК. На основании данных о сниженном содержании диеновых конъюгатов в проростках озимой пшеницы при холодовом стрессе после действия линолевой кислоты [Kolesnichenko et al., 2001c] сделано заключение, что механизмы разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях растений посредством СЖК участвуют в антиокислительной защите клетки при холодовом стрессе. Одним из механизмов снижения АФК в митохондриях, в который могут быть вовлечены СЖК, в том числе у растений, является открытие неспецифической митохондриальной поры.

2.4. Функционирование высокопроницаемой митохондриальной поры в проростках злаков и участие митохондрий в развитии программируемой клеточной гибели в колеоптиле

Из литературных данных известно, что «мягкое» разобщение является эффективным механизмом системы антиоксидантной защиты клеток [Скулачев, 1995; Скулачев и др., 2010]. Если система утечки протонов и механизм «мягкого» разобщения оказываются недостаточными для снижения образования АФК в

митохондриях, то происходит открытие высокопроницаемых митохондриальных пор (РТР), рассеивание $\Delta\mu_{H^+}$ и увеличение скорости дыхания до максимальных величин, которые лимитируются только активностью дыхательных ферментов [Скулачев, 1994; Pora et al., 1997]. Когда концентрация кислорода падает, и скорость накопления АФК уменьшается, пора закрывается [Скулачев, 1994; Pora et al., 1997]. Таким образом, открытие и закрытие РТР, по-видимому, носит флуктуирующий характер и может быть физиологическим механизмом защиты клетки от окислительного стресса. О функционировании РТР в побегах этиолированных проростков злаков неизвестно. У 3-х суточных этиолированных проростков озимой пшеницы, используемых в данной работе, основную массу побега занимает колеоптиль (около 76%) и 24% листья. Колеоптиль и первый лист побегов проростков озимой пшеницы подлежат запрограммированной в онтогенезе клеточной гибели [Ванюшин, 2001; Vanyushin et al., 2004], поэтому возможно ожидать наличие РТР в этих органах. Чтобы изучить функционирование митохондриальной поры, мы использовали ингибитор РТР животных циклоспорин А (цикА) и индукторы открытия РТР ионы Ca^{2+} , пальмитиновую (16:0) и линолевую кислоты (18:2($\Delta^{9,12}$)).

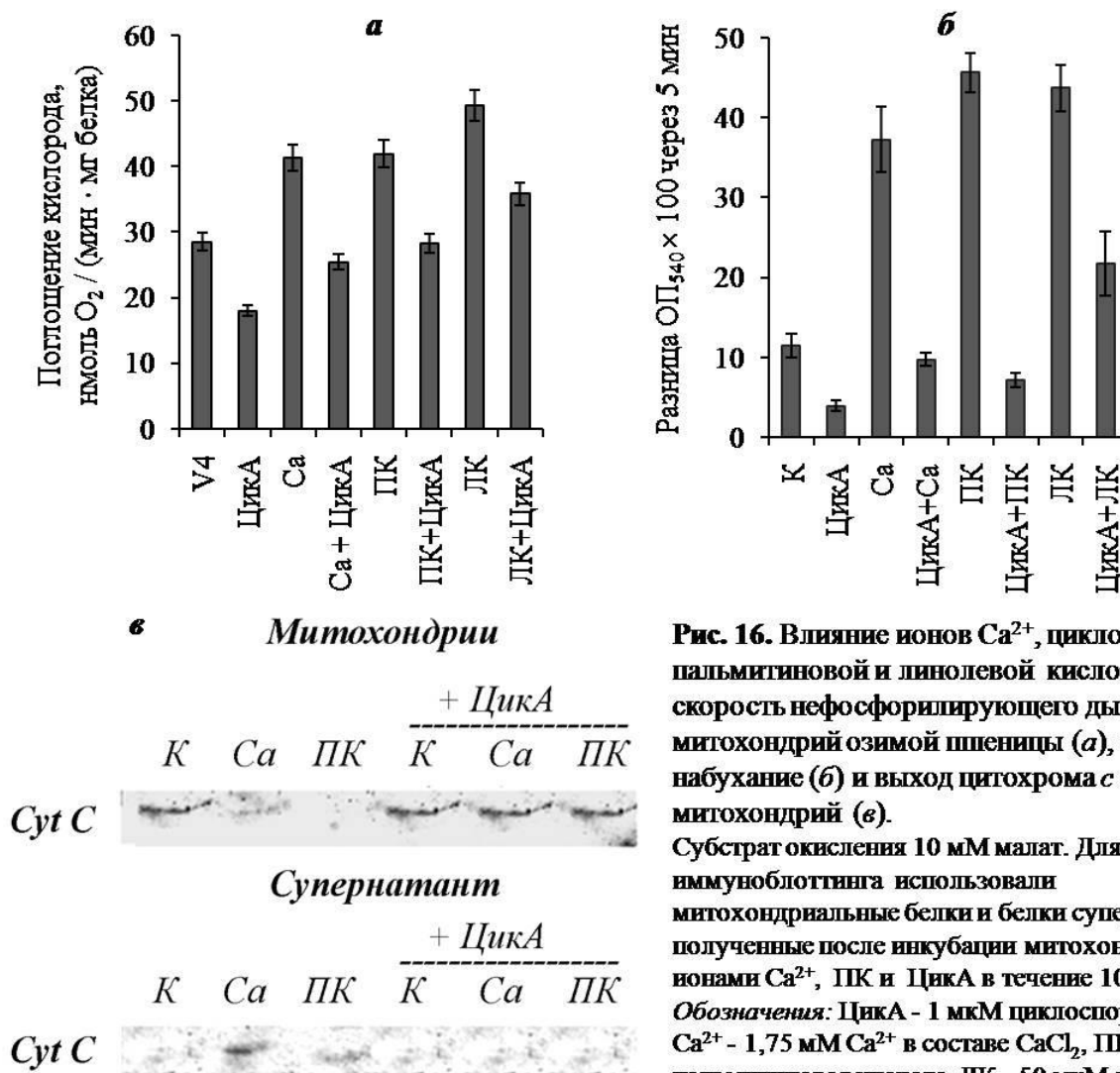


Рис. 16. Влияние ионов Ca^{2+} , циклоспорина А, пальмитиновой и линолевой кислот на скорость нефосфорилирующего дыхания митохондрий озимой пшеницы (а), их набухание (б) и выход цитохрома с из митохондрий (в).

Субстрат окисления 10 мМ малат. Для иммуноблоттинга использовали митохондриальные белки и белки супернатанта, полученные после инкубации митохондрий с ионами Ca^{2+} , ПК и ЦикА в течение 10 мин. Обозначения: ЦикА - 1 мкМ циклоспорин А, Ca^{2+} - 1,75 мМ Ca^{2+} в составе $CaCl_2$, ПК - 50 мкМ пальмитиновая кислота, ЛК - 50 мкМ линолевая кислота.

Как оказалось, цика в присутствии ЭДТА в среде инкубации не влияет на дыхание митохондрий из этиолированных проростков злаков (кукурузы, озимой пшеницы и озимой ржи), однако без хелаторов Ca^{2+} в реакционной среде или в присутствии экзогенно добавленных ионов кальция, цика снижает скорость нефосфорилирующего дыхания [Грабельных и др., 2004]. Как известно, переход митохондрий в состояние высокой проницаемости характеризуется набуханием митохондрий и потерей мембранного потенциала, при этом ведущую роль в этих процессах играют ионы Ca^{2+} и СЖК [Arpagaus et al., 2002; Fortes et al., 2002; Virolainen et al., 2002]. В связи с этим, были проведены эксперименты по изучению влияния ионов Ca^{2+} , пальмитиновой и линолевой кислот на дыхание и набухание митохондрий озимой пшеницы. Ионы Ca^{2+} и пальмитиновая кислота стимулировали нефосфорилирующее дыхание и индуцировали высокоамплитудное набухание митохондрий озимой пшеницы, которое почти полностью ингибировалось предварительной инкубацией митохондрий с цика (рис. 16, а, б) [Грабельных и др., 2007; Павловская и др., 2007, 2010]. Индукция дыхания и набухания митохондрий озимой пшеницы происходила и в присутствии полиненасыщенной линолевой кислоты, однако цика в меньшей степени влиял на процесс дыхания и набухания митохондрий (рис. 16, а, б) [Грабельных и др., 2007; Павловская и др., 2010]. Разобщение окислительного фосфорилирования и набухание митохондрий в присутствии ионов Ca^{2+} и пальмитиновой кислоты сопровождалось выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму и эти события предотвращались предварительной инкубацией митохондрий с цика (рис. 16, в). Влияние цика на функционирование РТР описывается как «десенсбилизация» [Bernardi, 2013] митохондриальной РТР к ионам Ca^{2+} и Φ_n , т.е. в присутствии данного ингибитора митохондрии становятся резистентными к индукторам РТР. Полученные нами данные указывают на функционирование в митохондриях проростков озимой пшеницы цика-чувствительной, Ca^{2+} /пальмитат-зависимой митохондриальной поры. Поскольку колеоптиль занимает основную часть побега у изучаемых нами проростков, то представлялось важным выяснить участие митохондрий в процессе естественного старения колеоптилей озимой пшеницы. Полученные результаты показали, что снижение жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы сопровождается увеличением содержания АФК в митохондриях, снижением степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (снижение коэффициента ДК), снижением интактности митохондрий и выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму (рис. 17) [Грабельных и др., 2009; Корсукова и др., 2013а]. Частичный выход цитохрома *c* указывает, что часть митохондрий при развитии ПКГ в колеоптилях озимой пшеницы оставалась неповрежденной, что позволяло осуществлять синтез АТФ и обеспечивать энергией процесс клеточной гибели (рис. 17, з). Окислительный стресс, вызываемый обработкой проростков 10 мМ H_2O_2 (в течение 4 ч), ускорял развитие клеточной гибели в колеоптиле, а холодное закаливание задерживало этот процесс (рис. 18) [Грабельных и др., 2009; Корсукова и др., 2013а].

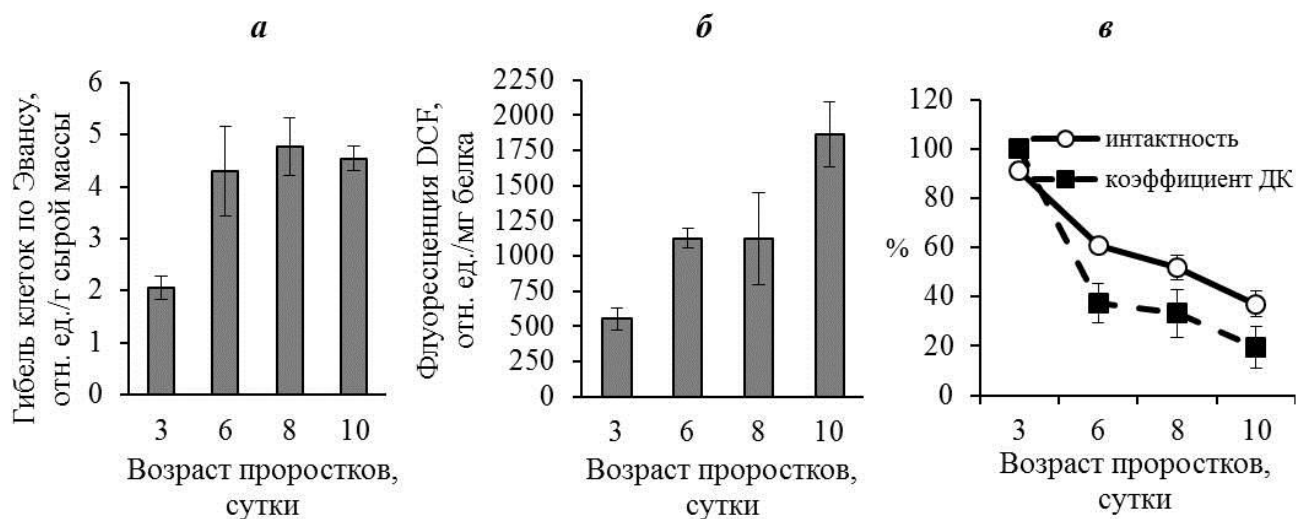
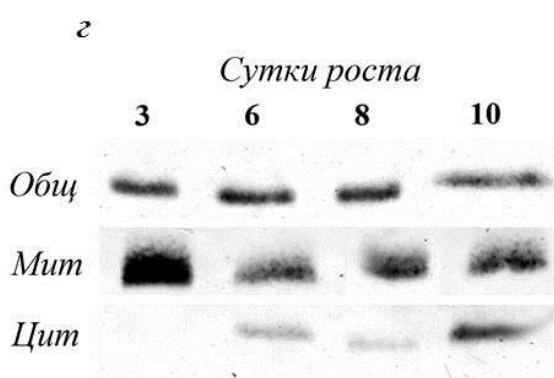


Рис. 17. Изменение жизнеспособности клеток coleoptилей озимой пшеницы с возрастом (а) и параметры функциональной активности изолированных из них митохондрий (б–г). М±S.D.



а – жизнеспособность клеток coleoptилей по Эвансу ($n=18$); б – содержание АФК в митохондриях ($n=8-10$); в – коэффициент ДК митохондрий из coleoptилей 3-х суточных проростков $6,33 \pm 1,13$ принят за 100% ($n=3-7$); г – вестерн-блоттинг общего (Общ), митохондриального (Mit) и цитоплазматического (Цит) белков из клеток coleoptилей этилированных проростков озимой пшеницы разного возраста с антителами против цитохрома *c*, представлен типичный иммуноблотт, ($n=3$).

Окислительный стресс, вызванный обработкой проростков перекисью водорода, приводил к более значительному снижению коэффициента ДК в изолированных из coleoptилей митохондриях по сравнению с митохондриями контрольных проростков (рис. 18, б). Снижение коэффициента ДК в митохондриях из coleoptилей проростков сопровождалось частичным высвобождением цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму сразу же после обработки проростков перекисью водорода (рис. 18, д). Способность холодового закаливания предотвращать развитие клеточной гибели в coleoptилях кукурузы, вызванной обработкой проростков перекисью водорода, была обусловлена снижением содержания АФК и отсутствием фрагментации тотальной ДНК [Корсукова и др., 2013б]. Полученные нами результаты показывают, что генерация АФК регулирует функционирование митохондриальной РТР в клетках растений и запуск программы клеточной гибели.

Закаливание проростков озимой пшеницы и мягкий холодовой стресс приводили к отсутствию чувствительности набухания изолированных из них митохондрий к цикА (рис. 19). Ингибирование набухания митохондрий из стрессированных и закаленных проростков озимой пшеницы к цикА проявлялось только в присутствии пальмитиновой кислоты (рис. 19) [Павловская и др., 2007, 2010], что могло быть связано с временной деполяризацией внутренней митохондриальной мембраны из-за кратковременного открытия РТР [Vianello et al., 2012], вызванного повышением концентрации пальмитиновой кислоты.

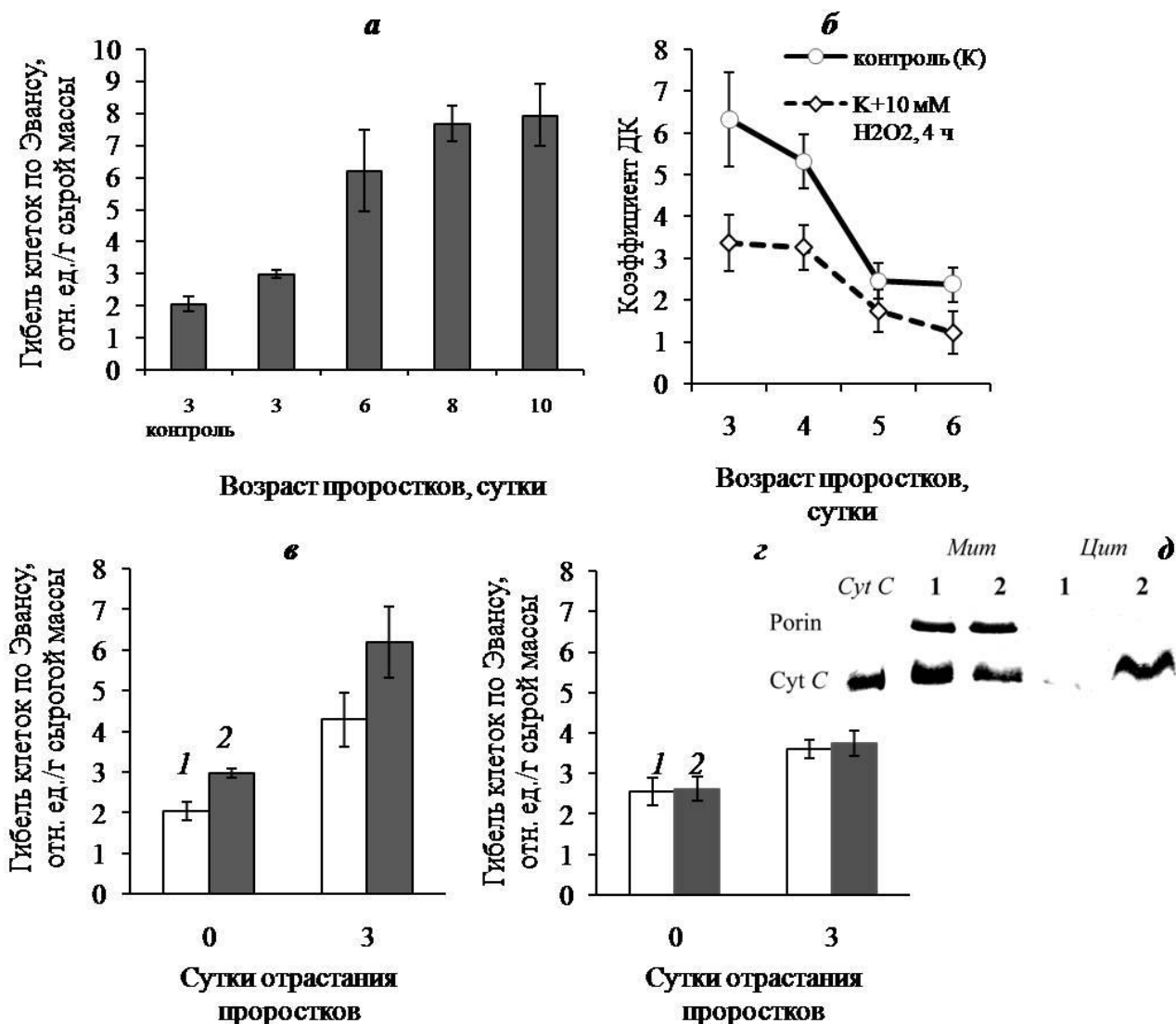


Рис. 18. Влияние обработки перекисью водорода (10 мМ, 4 ч) на жизнеспособность клеток coleoptилей этилированных незакаленных (*а, в*) и закаленных (*г*) проростков озимой пшеницы, коэффициент ДК в изолированных из контрольных проростков митохондриях (*б*) и распределение цитохрома *с* в митохондриальной и цитоплазматической фракциях белков coleoptилей (*д*). $M \pm S.D.$

а – $n=6-18$; *в* – изменение коэффициента ДК по Чансу и Вильямсу ($n=3-4$); *г, з* – ($n=8$).

Обозначения: 1 – жизнеспособность клеток coleoptилей без обработки перекисью водорода,

2 – жизнеспособность клеток coleoptилей после обработки 10 мМ H₂O₂ в течение 4 ч.

На этилированных проростках пшеницы было установлено, что цика значительно ингибирует рост проростков во время развития, при этом он снижает продукцию супероксида как в первом листе, так и в coleoptиле и ингибирует фрагментацию ДНК в апикальных частях первого листа 6-ти суточных проростков [Shkute, Savicka, 2009]. Эти данные подтверждают, что цика может предотвращать развитие клеточной гибели, блокируя открытие РТР и выход цитохрома *с* из митохондрий.

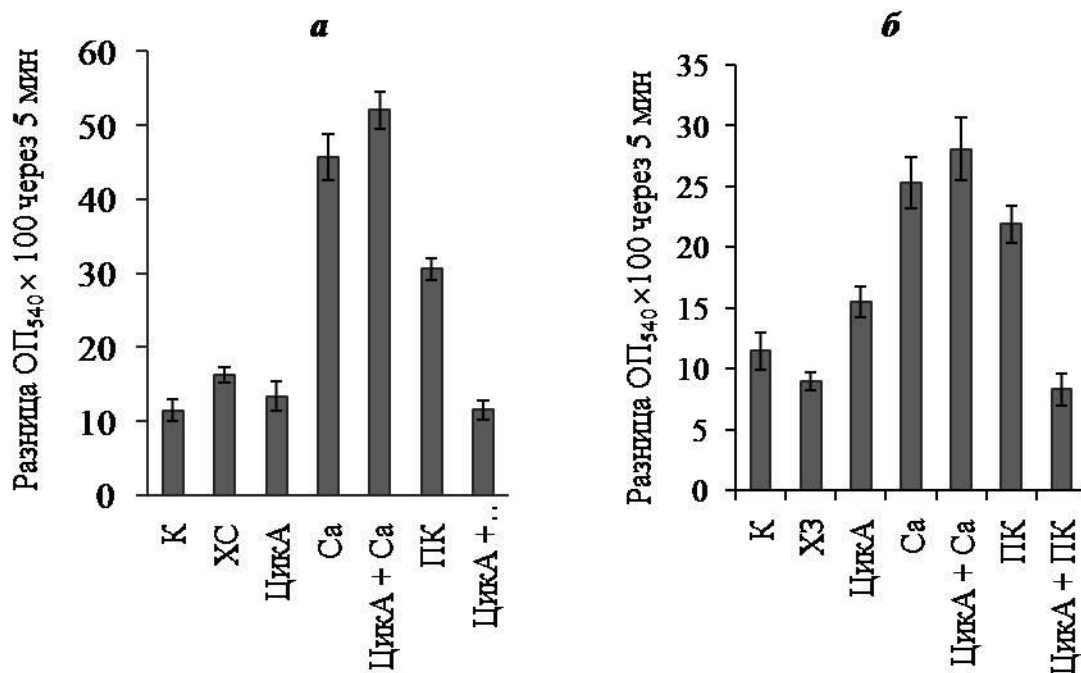


Рис. 19. Влияние циклоспорина А, ионов Ca^{2+} и пальмитиновой кислоты (16:0) на набухание митохондрий из холодострессированных (а) и закаленных (б) проростков озимой пшеницы.

Обозначения: как на рис. 16. К – митохондрии из контрольных проростков, ХС – митохондрии из проростков, подвергнутых холодовому стрессу ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 час), ХЗ – митохондрии из проростков, подвергнутых холодовому закаливанию ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 суток). $\text{M}\pm\text{S.D.}$ $n=3-8$.

На других растительных объектах также показан защитный эффект цикА, который заключался в снижении продукции H_2O_2 клетками, предотвращении гибели клеток, фрагментации ДНК и выхода цитохрома *c* из митохондрий, вызываемых фузикокином [Contran et al., 2007], снижении продукции H_2O_2 и предотвращении клеточной гибели, вызванных окислительным стрессом [Tiwarí et al., 2002], защите от потери митохондриального трансмембранного потенциала, снижении набухания митохондрий и гибели, вызванной метилжасмонатом [Zhang, Xing, 2008]. Выявленные нами эффекты циклоспорина А (снижение скорости дыхания, предотвращение набухания митохондрий и выхода из них цитохрома *c* под действием Ca^{2+} и пальмитиновой кислоты) позволяют предполагать, что функционирование РТР в митохондриях озимой пшеницы может быть важным событием при развитии ПКГ в результате естественного старения колеоптилей или первого листа этиолированных проростков озимой пшеницы.

2.5. Механизм разобщающего действия белкового комплекса с молекулярной массой 310 кДа – БХШ 310

Еще одной системой, способной вызывать снижение степени сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях, является цитоплазматический белок холодового шока с мол. массой 310 кДа, обозначенный как БХШ 310. БХШ 310 был выделен из проростков озимой ржи и было установлено, что в нативном состоянии белок имеет мол. массу 310 кДа и содержит два типа субъединиц с мол. массами 56 и 66 кДа [Колесниченко и др., 1996]. БХШ 310 конститутивно синтезируется в проростках злаков, а его

количественное содержание коррелирует с уровнем морозоустойчивости [Колесниченко и др., 1996; Мишарин и др., 1997]. Было обнаружено, что БХШ 310 вызывает частичное разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях озимой пшеницы [Побежимова и др., 1996; Voinikov et al., 1998], однако механизм его действия оставался неизвестным. Одна из задач нашего исследования состояла в том, чтобы выяснить, происходит ли вызываемое БХШ 310 разобщение по одному из уже известных механизмов или отличается от них, и, в таком случае, установить механизм разобщающего действия БХШ 310.

В ходе изучения выяснилось, что в цитоплазме озимой ржи существует две формы БХШ 310 – «конститутивно синтезируемая», связанная с нуклеиновой кислотой, и «стрессовая», не связанная с нуклеиновой кислотой [Колесниченко и др., 2002; Колесниченко и др., 2005]. Стрессовая форма белка обладает более сильной разобщающей активностью, по сравнению с конститутивно-синтезируемой [Pobezhimova et al., 2001], а ее разобщающий эффект выше при использовании малата в качестве субстрата [Grabelnych et al., 2001]. В наших экспериментах при окислении малата митохондриями озимой пшеницы в отсутствие БХШ 310 значение отношения АДФ/О было близко к теоретическому и составляло $2,82 \pm 0,07$, но через 90 мин инкубации с БХШ 310 оно снижалось до $2,04 \pm 0,10$ (представлено в диссертации). Используя стрессовую форму БХШ 310 и изучив возможность его функционирования посредством различных механизмов, мы установили, что разобщающий эффект БХШ 310 отличается от существующих механизмов разобщения [Войников и др., 2006; Kolesnichenko et al., 2002, 2005].

Для того, чтобы определить взаимодействие разобщающего белка БХШ310 с комплексами дыхательной цепи митохондрий, необходимо было исследовать влияние ингибиторов отдельных комплексов дыхательной цепи на функционирование БХШ 310.

Таблица 1

Влияние ингибиторов комплекса III ЭТЦ и альтернативной оксидазы на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 у митохондрий озимой пшеницы, изолированных из побегов контрольных проростков и проростков, подвергнутых холодному стрессу [Колесниченко и др., 2004]

Вариант опыта	Нмоль O ₂ / (мин · мг белка)	
	Контроль	Холодовой стресс
<i>10 мМ малат + 10 мМ глутамат</i>		
V ₄	32.05±3.15	46.09±2.87
V ₄ + АнтА + БГК	10.11±2.45	13.88±1.42
<i>8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат</i>		
V ₄	60.55±1.78	63.20±2.87
V ₄ + АнтА + БГК	3.87±2.77	4.54±1.42
<i>1 мМ НАДН</i>		
V ₄	96.39±5.59	83.60±6.11
V ₄ + АнтА + БГК	2.24±0.93	9.08±2.99

Из данных табл. 1 видно, что добавление антимицина А и БГК к митохондриям озимой пшеницы в состоянии 4, окисляющим как сукцинат, так и НАДН, вызывало почти полное ингибирование поглощения ими кислорода. В то

же время при окислении ими малата, являющегося субстратом комплекса I дыхательной цепи, как в митохондриях, выделенных из контрольных проростков, так и в митохондриях, выделенных из стрессированных проростков, после добавления ингибиторов сохранялось около 30% от дыхания в состоянии 4. Последующее добавление KCN полностью блокировало дыхание митохондрий независимо от субстрата окисления. Поскольку в белковом спектре двудольных отсутствуют субъединицы БХШ 310, то мы провели ингибиторный анализ в митохондриях гороха, инкубируя их с БХШ 310 (рис. 20, а).

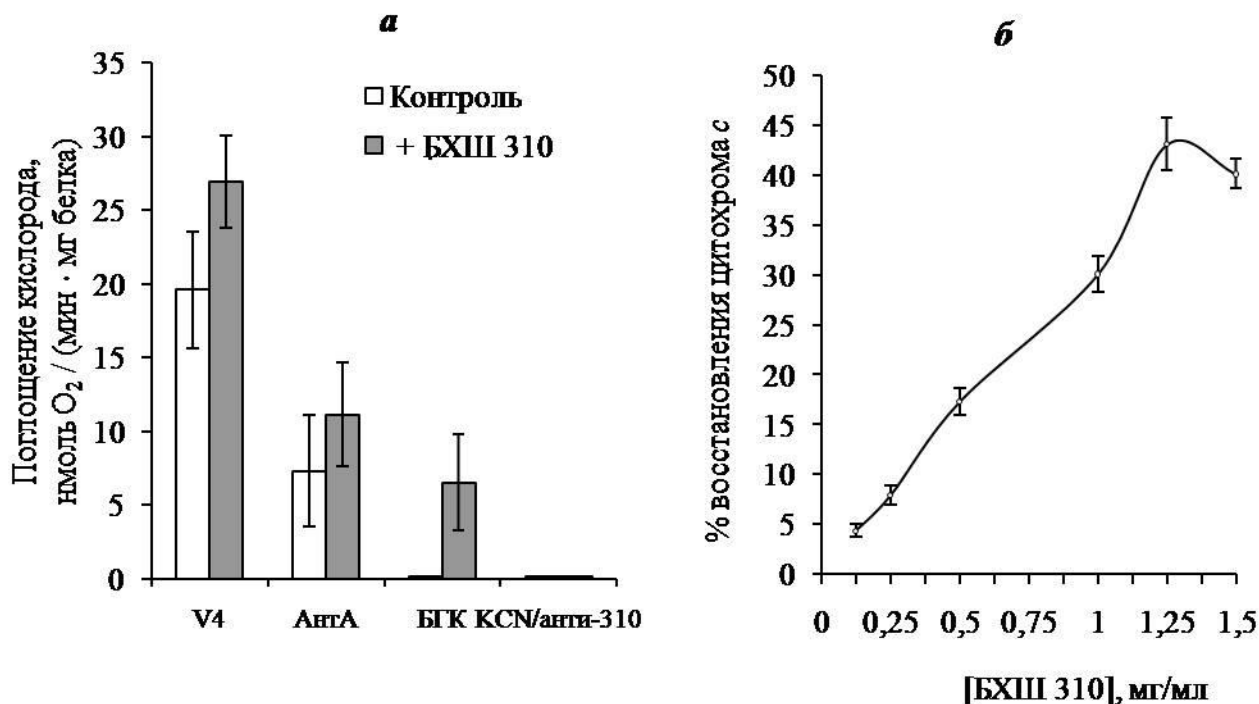


Рис. 20. Влияние ингибиторов дыхательной цепи на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 в митохондриях гороха, инкубируемых в отсутствие и присутствии БХШ 310 (а) и степень восстановления окисленного цитохрома с в зависимости от концентрации БХШ 310 при pH 6.0 (б).

а - АнтА - 20 мкМ антимицин А; БГК - 1 мМ БГК; KCN/анти-310 - 0,4 мМ KCN или 1 мг/мл антисыворотки против БХШ 310. Последовательность добавления ингибиторов слева направо. Субстрат окисления: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат. Концентрация БХШ 310 равна 0,5 мг/мг белка митохондрий. $M \pm S.D.$, $n=6-12$.

б - концентрация цитохрома с составляла 30 мкМ. Длина волны 550 нм. $M \pm S.D.$, $n=3$.

Эти факты указывают на то, что при функционировании комплекса I дыхательной цепи в митохондриях озимой пшеницы или в митохондриях гороха, инкубируемых с экзогенным БХШ 310, функционирует еще один путь переноса электронов, не связанный ни с активацией АО, ни с функционированием ЦП через комплекс III. Поскольку, как показано выше, наиболее значительное разобщающее действие БХШ 310 проявляется при окислении малата [Grabelnych et al., 2001b; Колесниченко и др., 2002], мы изучили влияние ингибиторов комплекса I, действие которых направлено на разные участки цепи переноса электронов в комплексе I: ротенон (действует на железосерные центры комплекса I дыхательной цепи) и реин (конкурентный ингибитор НАДН-ДГ, действует на участок дыхательной цепи между субстратом и ФМН), на разобщающий эффект

БХШ 310. Оказалось, что в присутствии ротенона добавление БХШ 310 вызывало некоторое увеличение скорости поглощения кислорода, в то время как в присутствии реина последующее добавление БХШ 310 не приводило к изменению скорости нефосфорилирующего дыхания, что позволило предположить, что в присутствии БХШ 310 электроны переносятся от комплекса I (с участка транспорта электронов между ФМН и железосерными центрами) на стрессовый белок БХШ 310, который ассоциирован с наружной митохондриальной мембраной (показано в диссертации). Основываясь на результатах ингибиторного анализа, можно предположить, что не ингибируемая антимицином А и БГК скорость поглощения кислорода в митохондриях озимой пшеницы при окислении малата зависит не только от транспорта электронов через комплекс I ЭТЦ, но и от транспорта электронов через комплекс IV, поскольку транспорт электронов полностью блокировался KCN. Поскольку эти результаты получены в присутствии в среде инкубации митохондрий антимицина А, то нами было выдвинуто предположение о существовании альтернативного пути переноса электронов между комплексами I и IV. Если это так, то БХШ 310 должен восстанавливать цитохром *c*. Действительно обнаружилось, что стрессовая форма БХШ 310 способна восстанавливать экзогенно добавленный окисленный цитохром *c*, способность данного белка восстанавливать окисленный цитохром *c* зависела от значения pH реакционной среды, при этом БХШ 310 был способен восстанавливать окисленный цитохром *c* в диапазоне значений pH 3,0-7,5 с максимумом при pH 6,0 [Колесниченко и др., 2004; Kolesnichenko et al., 2005]. При увеличении концентрации БХШ 310 его способность восстанавливать цитохром *c* возрастает (рис. 20, б).

Эксперименты по восстановлению цитохрома *c* стрессовым белком БХШ 310 *in vitro* были подтверждены *in organelle* [Колесниченко и др., 2004; Kolesnichenko et al., 2005]. Добавление цитохрома *c* к митохондриям, изолированным из побегов озимой пшеницы и гороха, не вызывало значительных изменений в скорости поглощения кислорода, что свидетельствует о целостности наружной мембраны митохондрий (табл. 2).

Таблица 2

Влияние БХШ 310 и цитохрома *c* на скорость поглощения кислорода в состоянии 4 митохондриями озимой пшеницы и гороха [Колесниченко и др., 2004]

Вариант опыта	Поглощение кислорода, нмоль O ₂ / (мин · мг белка)				
	V ₄	V _{цит c}	V _{БХШ 310}	V _{БХШ310/цит c}	V _{анти310}
Озимая пшеница	32.41±5.18	30.82±3.02	41.48±0.16	50.08±0.91	32.41±0.22
Горох	31.84±2.17	30.55±2.17	42.22±0.04	46.39±2.42	31.84±2.42

Примечание. Субстрат окисления: 10 mM малат + 10 mM глутамат. M±S.D., n=3. БХШ 310 (0,5 мг/мг белка митохондрий); цитохрома *c* (30 мкМ); антисыворотки против БХШ 310 (1 мг/мл).

Добавление БХШ 310 вызывало увеличение скорости нефосфорилирующего дыхания в митохондриях этих растений (на 28% у пшеницы и на 33% у гороха), а последующее добавление цитохрома *c* приводило к дальнейшему усилению поглощения кислорода митохондриями – на 21% у

пшеницы и на 10% у гороха (табл. 2). Добавление к митохондриям антисыворотки против БХШ 310 снижало скорость поглощения кислорода митохондриями озимой пшеницы и гороха до скорости дыхания в состоянии 4 до добавления белка (табл. 2). Полученные данные можно интерпретировать как трансмембранную утечку электронов с комплекса I дыхательной цепи через стрессовый белок БХШ 310 на экзогенно добавленный цитохром *c*. Функциями данного белка являются, так же как и в случае других энергорассеивающих систем, термогенерация и участие в антиокислительной защите клетки [Колесниченко и др., 2004].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании исследования механизмов, снижающих степень сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях, нами показано, что в митохондриях злаков разобщение окислительного фосфорилирования может происходить, по меньшей мере, с участием семи систем: антимицин А- и цианидрезистентной оксидазы, внешних и внутренних ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, СЖК, УСР-подобных белков, АТФ/АДФ-антипортера,; белкового комплекса с мол. массой 310 кДа, а также неспецифической митохондриальной поры, характеристики которых представлены в обзорах [Колесниченко и др., 2004; Грабельных, 2005; Грабельных и др., 2006]. Функционирование энергорассеивающих систем в митохондриях растений играет важную роль как при кратковременном холодовом воздействии, так и при длительной адаптации к холоду. Нами показано, что сохранение функциональной активности митохондрий при адаптации озимых злаков к низкой температуре связано с изменениями жирнокислотного состава, синтезом стрессовых белков дегидринов, сохранением (в побегах) или активацией (в культуре клеток) альтернативного пути дыхания, связанного с функционированием альтернативной оксидазы, а также высокой активностью «внешней» НАДН-дегидрогеназы.

Как известно, мембранные системы клетки представляют собой мишени первичного стрессового воздействия и первую линию защиты от них [Чиркова, 2002], от состава и соотношения липидов мембран, их жирнокислотного состава зависит вязкость мембран, определяющая структуру и функции мембранных белков и, таким образом, активность мембранно-связанных процессов [Тарчевский, 2001; Чиркова, 2002; Верещагин, 2007; Murata, Los, 1997; Theocharis et al., 2012]. В суспензионной культуре клеток озимой пшеницы при закаливании к холоду в 2 раза возрастало содержание α -линоленовой кислоты [Любушкина и др., 2013]. В митохондриях, изолированных из закаленных проростков озимой пшеницы, подвергнутых холодовому шоку, уровень α -линоленовой кислоты был выше, чем в митохондриях контрольных проростков и контрольных проростков, подвергнутых действию отрицательной температуры [Грабельных и др., 2011]. Полученные нами данные согласуются с ведущей ролью α -линоленовой кислоты в процессе криоадаптации растений [Верещагин, 2007] и указывают, что содержание α -линоленовой кислоты является маркером устойчивости

митохондриальных мембран к действию отрицательной температуры. С использованием ингибиторов транспорта электронов нами впервые показано, что митохондрии, изолированные из побегов проростков озимой пшеницы после холодового закаливания, меньше генерируют АФК в присутствии ингибитора комплекса III дыхательной цепи – антимицина А (рис. 8) [Грабельных и др., 2011]. Возможно, это связано с антиоксидантной способностью АО, сопряженной с накоплением транскриптов *AOX1c*, увеличением содержания белка АО в митохондриях и сохранением способности АО к транспорту электронов при действии закаливающих температур на растения. Участие *AOX1c* или других генов семейства *AOX* в процессе низкотемпературной адаптации показано на арабидопсисе и томатах [Armstrong et al., 2008; Zhu et al., 2012]. Нами показана высокая способность АО к транспорту электронов при окислении малата в митохондриях из побегов контрольных и прошедших первый этап закаливания проростков озимой пшеницы. У растений малат, возможно, является основным субстратом для митохондрий, а в его окислении участвуют два фермента: малатдегидрогеназа и НАД⁺-зависимый малик-энзим (МЭ) [Lambers et al., 2005]. Если в превращениях малата участвует малатдегидрогеназа, то конечными продуктами реакции являются оксалоацетат и НАДН, а если задействован МЭ, то - пируват, НАДН и СО₂. При этом при окислении малата достигается максимальная активность АО, по-видимому, связанная с активацией в этих условиях НАД⁺-МЭ. На первом этапе холодового закаливания на фоне общего падения скоростей дыхания при окислении малата и сукцината митохондриями ЦРД было высоким, и в этот период одновременно с индукцией экспрессии гена *AOX1c* при закаливании наблюдали усиление экспрессии генов *ATP6* и *NAD7*, продукты которых играют ведущую роль при функционировании АТФ-синтазы [Cappaldi, Aggeler, 2002; Zhang et al., 2006, 2008; Moghadam et al., 2012] и комплекса I [Pineau et al., 2005], соответственно. Сохранение энергетической активности митохондрий при закаливании этиолированных проростков озимой пшеницы видится в одновременной с индукцией экспрессии *ATP6* и *AOX1c* индукции гена *NAD7*, кодирующего субъединицу *NAD7* комплекса I ЭТЦ. Функционирование АО при окислении малата митохондриями этиолированных проростков пшеницы позволяет поддерживать $\Delta\psi$ на внутренней митохондриальной мембране за счет пункта сопряжения в комплексе I ЭТЦ [Абдрахимова и др., 2011; Pastore et al., 2001]. Экспрессия генов *NDA2* и *NDB2* выше в гетеротрофных тканях [Michalecka et al., 2003]. В работе А.Ф. Армстронга с соавт. [2008] выявлена ко-экспрессия *NDB2* и *UCP1* при длительном действии на растения арабидопсиса низкой температуры и увеличение в этих условиях альтернативного пути дыхания, что свидетельствует о возможной защитной роли «внешней» НАДН-дегидрогеназы при закаливании растений к холоду. В прорастающих семенах гороха при использовании экзогенного НАДН в качестве субстрата показана высокая окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий, которая коррелировала с низким содержанием продуктов ПОЛ и меньшим содержанием ненасыщенных жирных кислот в липидах митохондрий [Stupnikova et al., 2006].

В экспериментах по влиянию эндогенных СЖК на активность АО нами установлено, что элиминация СЖК с помощью БСА способствует повышению активности АО. Эти данные согласуются с данными F.E. Sluse с соавт. [1998] и A.M. Almeida с соавт. [1999], которые выявили механизм регуляции активности АО и рUCPs с помощью СЖК. Однако нами впервые показано, что этот механизм наиболее эффективно реализуется при окислении митохондриями малата. При окислении малата СЖК оказывают более значительное разобщающее действие на митохондрии озимой пшеницы, а в больших концентрациях они, возможно, вызывают инактивацию комплекса I. Впервые показано, что вклад UCP и АТФ/АДФ-антипортера в разобщение окислительного фосфорилирования, вызванного насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами, в митохондриях растений различается: в индуцированном ненасыщенными СЖК разобщении в большей степени участвуют рUCPs, а насыщенными – АТФ/АДФ-антипортер [Грабельных и др., 2009]. Важная роль данного процесса в защитно-приспособительных реакциях растений заключается в их участии в термогенезе, снижении генерации АФК путем «мягкого» разобщения и за счет открытия РТР.

Программируемая клеточная гибель в колеоптиле злаков, как нами установлено, осуществляется с участием митохондрий, при этом на начальном этапе развития ПКГ происходит снижение интактности внешней мембраны митохондрий и выход цитохрома *c* в цитоплазму, сопровождающийся значительным снижением степени контроля сопряжения процессов окисления и фосфорилирования [Корсукова и др., 2013a]. Выход цитохрома *c* из митохондрий сопровождается развитием клеточной гибели в суспензионной культуре озимой пшеницы, вызванной действием отрицательной температуры $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 ч) [Luybushkina et al., in press]. При этом, открытие классической митохондриальной поры, одним из функциональных компонентов которой, как предполагается, является АТФ/АДФ-антипортер, возможно, вносит вклад в развитие ПКГ. Эти данные основываются на установленном факте функционирования в митохондриях этиолированных проростков озимой пшеницы Ca^{2+} /пальмитат-зависимой, циклоспорин А-чувствительной митохондриальной поры [Павловская и др., 2007, 2010]. Согласно современным представлениям большую роль в индукции РТР играет липидное окружение мембран. Предполагается, что пероксидация кардиолипина цитохромом *c* начинает цепь событий, приводящих к выходу цитохрома *c* из митохондрий и запуску апоптоза у животных [Владимиров и др., 2006; Kagan et al., 2005; Nuttemann et al., 2011]. Повышение содержания ненасыщенных жирных кислот в митохондриях озимой пшеницы в процессе закаливания к холоду и активация в этих условиях энергорассеивающих систем могут объяснять снижение гибели клеток колеоптиля озимой пшеницы при окислительном стрессе [Корсукова и др., 2013a]. Влияние циклоспорина А описывается как «десенсбилизация» [Bernardi, 2013] митохондриальной РТР к ионам Ca^{2+} и Φ_{H} , т.е. в присутствии данного ингибитора митохондрии становятся резистентными к индукторам РТР. В нашей работе ионы Ca^{2+} проявляли разобщающий эффект, а цикА частично или полностью ингибировал вызванную

ионами Ca^{2+} стимуляцию скорости нефосфорилирующего дыхания в митохондриях озимой пшеницы, озимой ржи и кукурузы.

Независимо от действия СЖК и связанных с ними механизмов функционирует белковый комплекс БХШ 310, который позволяет обходить комплекс III дыхательной цепи митохондрий злаков, снижать эффективность окислительного фосфорилирования и генерацию АФК митохондриями [Колесниченко и др., 2004; Kolesnichenko et al., 2005] в начальный период охлаждения.

Присутствие многочисленных энергорассеивающих систем в митохондриях проростков озимых злаков, возможно, связано с особенностями жизненного цикла этих культур. На начальном этапе закаливания, когда затормаживаются ростовые процессы, снижаются энергетические затраты на рост и остается дыхание, направленное на поддержание структуры клеток и на обеспечение энергией биосинтезов при закаливании. При этом на фоне достаточной обеспеченности субстратом могут функционировать энергорассеивающие системы, чтобы не допустить избыточного образования АФК в митохондриях. В другом случае, при кратковременных заморозках повышение интенсивности дыхания, разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях и связанная с этим процессом термогенерация позволяют растениям за счет локального повышения температуры не допустить образования льда и повреждения клеток. Переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние у морозоустойчивых озимых злаков был установлен почти 30 лет назад [Войников, 1987; Vojnikov et al., 1984], и, как предполагалось, он связан с разобщающим действием СЖК, увеличение которых происходит в митохондриях при низкотемпературном стрессе. В настоящей работе впервые установлено, что свободные жирные кислоты при кратковременном холодовом стрессе могут активировать разобщающие белки, подобные UCP животных, а также АТФ/АДФ-антипортер и вызывать переход митохондрий в низкоэнергетическое состояние. По-видимому, эти факторы обеспечивают выживание проростков. Комплексный ответ на действие низкой температуры возможен при непосредственном взаимодействии энергорассеивающих систем митохондрий с сигнальными системами клеток растений, поставляющими сигнальные молекулы для участия в метаболических реакциях.

В заключение целесообразно представить обобщение полученных результатов в рамках основных направлений собственных исследований и с привлечением данных, имеющих в научной литературе. Схема участия энергорассеивающих систем в адаптации растений к низким температурам осуществляется по двум сценариям: первый включает последовательность реакций на кратковременное воздействие отрицательными температурами и будет зависеть от интенсивности и продолжительности действия низкой температуры, второй на длительное воздействие температурами из области закаливающихся. При ответе на кратковременное воздействие реализуется цепь событий: повышение уровня кальция в цитоплазме – повышение уровня кальция/повышение уровня АФК в митохондриях – активация фосфолипазы A_2 – накопление свободных

жирных кислот: 1) *при низком содержании ионов кальция/АФК/СЖК* – активация митохондриальных энергорассеивающих систем – «мягкое» разобщение окислительного фосфорилирования – термогенез/снижение образования АФК – выживание клеток; 2) *при высоком содержании ионов кальция/АФК/СЖК* – активация АТФ/АДФ-антипортера – открытие высокопроницаемой поры – набухание митохондрий – выход цитохрома *c* – нарушение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий – гибель клеток. При ответе на низкие закаливающие температуры последовательность реакций представляется следующей: повышение уровня кальция в цитоплазме – повышение уровня кальция/повышение уровня АФК в митохондриях – индукция альтернативной оксидазы/«внешней» НАДН-дегидрогеназы – снижение образования АФК/поддержание синтеза АТФ – успешное закаливание – выживание клеток при последующем холодовом шоке.

ВЫВОДЫ

1. Митохондрии являются основным источником генерации АФК в тканях этиолированных проростков озимых злаков при низкотемпературном стрессе. Уровень АФК определяет жирнокислотный состав митохондрий, интактность их мембран, содержание в митохондриях продуктов ПОЛ, окислительную и фосфорилирующую активность органелл, а весь комплекс этих параметров влияет на морозоустойчивость растений.

2. В начальный период действия закаливающей низкой положительной температуры происходит накопление транскриптов *AOX1c*, *NAD7* и *ATP6* в тканях этиолированных проростков озимой пшеницы и увеличение содержания в митохондриях альтернативной оксидазы и *UCP1/2*. Индукция синтеза альтернативной оксидазы и сохранение ее способности к транспорту электронов по дыхательной цепи в начальный период действия закаливающей температуры позволяет поддерживать высокий уровень синтеза АТФ при окислении митохондриями малата, а также снижать генерацию АФК митохондриями при последующем холодовом шоке.

3. Лауриновая (12:0), пальмитиновая (16:0), линолевая (18:2($\Delta^{9,12}$)) и линоленовая (18:3($\Delta^{9,12,15}$)) кислоты в микромолярных концентрациях обладают сильным разобщающим действием в митохондриях озимой пшеницы. Разобщающий эффект насыщенных жирных кислот связан, главным образом, с функционированием АТФ/АДФ-антипортера, а ненасыщенных - с активностью *UCP*-подобных белков. Предполагается, что функционирование АТФ/АДФ-антипортера и *UCP*-подобных белков происходит при низком содержании свободных жирных кислот в митохондриях, в то время как при их высоком содержании свободные жирные кислоты сами вызывают эффективное разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях, а также служат субстратом окисления для этих органелл.

4. Активация АТФ/АДФ-антипортера и *UCP*-подобных белков в митохондриях происходит при кратковременном холодовом стрессе, что отражает адаптивную реакцию озимых злаков на действие неповреждающей отрицательной температуры. В то же время холодовой шок, сопровождающийся частичной или

полной гибелью проростков, вызывает повреждение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, опосредованное накоплением АФК и снижением содержания цитохрома *c* в митохондриях.

5. Митохондрии из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы с наибольшей скоростью окисляют экзогенный НАДН, скорость окисления которого сохраняется на высоком уровне и при действии низких закаливающих температур, что компенсирует снижение скоростей окисления малата и сукцината.

6. Митохондрии вовлечены в процесс программируемой клеточной гибели в побегах этиолированных проростков злаков в естественных и индуцируемых внешними стимулами условиях. Для митохондрий злаков характерна регулируемая модель открытия неспецифической поры, зависимой от ионов Ca^{2+} и свободных жирных кислот и чувствительной к циклоспорину А. Холодовое закаливание проростков предотвращает окислительный стресс и развитие гибели клеток колеоптиля злаков. Функциональным компонентом поры, вероятно, является АТФ/АДФ-антипортер, активация которого вызывается пальмитиновой кислотой.

7. Механизм разобщающего действия белкового комплекса с мол. массой 310 кДа (БХШ 310) в митохондриях растений заключается в шунтировании переноса электронов по дыхательной цепи, таким образом, что электроны в обход убихинона и комплекса III через комплекс I поступают на ассоциированный с наружной мембраной митохондрий БХШ 310 и далее на цитохром *c* и комплекс IV. Такой *би-транс*-мембранный перенос электронов активируется в митохондриях злаков при кратковременном холодовом стрессе.

8. Полученные результаты и данные литературы указывают, что в механизмах регуляции энергорассеивающих систем в митохондриях растений принимают участие свободные жирные кислоты, ионы кальция и АФК, увеличение содержания которых сопряжено с изменением функциональной активности митохондрий.

9. Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет заключить, что наличие у растений систем, снижающих энергетическую эффективность дыхания митохондрий, цианидрезистентной оксидазы, ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, свободных жирных кислот, UCP-подобных белков, АТФ/АДФ-антипортера, белкового комплекса с мол. массой 310 кДа и Ca^{2+} /пальмитат-зависимой циклоспорин А-чувствительной неспецифической митохондриальной поры, и координация их функционирования посредством сигнальных молекул представляют собой важнейший компонент адаптивного механизма, обеспечивающего выживаемость растений при действии неблагоприятных низких температур. В тканях растений с гетеротрофным метаболизмом термогенез и антиокислительная защита клетки могут быть функциями энергорассеивающих систем митохондрий при действии низких температур.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Монографии и патенты

1. Стрессовый белок БХШ 310: характеристика и функции в растительной клетке / А.В. Колесниченко, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, В.В. Колесниченко, В.К. Войников. – Иркутск: Издательство института географии СО РАН, 2004. – 225 с.
2. Побежимова Т.П. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, **О.И. Грабельных**; отв. ред. Р.К. Салаяев. – М.: ООО «НПК Промэкобезопасность», 2004. – 98 с.
3. Пат. 2257907 Российская Федерация, МПК⁷ А 61 К 35/78, 9/64, А 61 Р 39/06. Способ получения биологически активного вещества для регуляции энергетического баланса / В.К. Войников, А.В. Колесниченко, Т.П. Побежимова, **О.И. Грабельных**, В.В. Колесниченко; Патентообладатель Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук. – № 2003129256/15; заявл. 30.09.03; опубл. 10.08.05, Бюл. № 22.

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

4. Стрессовый разобщающий белок БХШ 310 индуцирует перекисное окисление липидов в митохондриях при гипотермии / В.В. Зыкова, **О.И. Грабельных**, С.В. Владимирова, Н.А. Королева, А.В. Колесниченко, В.К. Войников // Доклады РАН. – 2000. – Т.372, №4. – С.562-564.
5. Plant stress-related uncoupling protein CSP 310 caused lipid peroxidation in winter wheat mitochondria under chilling stress / V.V. Zyкова, O.I. Grabelnych, A.I. Antipina, N.A. Koroleva, S.V. Vladimirova, A.V. Kolesnichenko, T.P. Pobezhimova, V.K. Voinikov // J. Thermal Biology. – 2000. – V.25, N5. – P.323-327.
6. The association of plant stress uncoupling protein CSP 310 with winter wheat mitochondria during hypothermia / A.V. Kolesnichenko, **O.I. Grabelnych**, T.P. Pobezhimova, V.K. Voinikov // J. Plant Physiology. - 2000. - V.156, N5-6. - P.805-807.
7. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы / Т.П. Побежимова, **О.И. Грабельных**, А.В. Колесниченко, О.Н. Сумина, В.К. Войников // Физиология растений. - 2001. - Т.48, №2. - С.238-244.
8. Белок холодового шока 310 кД разобщает окислительное фосфорилирование в растительных митохондриях / В.К. Войников, **О.И. Грабельных**, А.В. Колесниченко, Т.П. Побежимова // Физиология растений. - 2001. - Т.48, №1. - С.106-112.
9. Влияние различных термогенных систем митохондрий на температуру проростков озимой пшеницы во время холодового шока / В.К. Войников, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, А.М. Корзун, В.В. Турчанинова, А.В. Колесниченко // Доклады РАН. – 2001а. - Т.378, №5. - С.700-702.
10. Влияние стрессового белка БХШ 310 на активность цианидрезистентной альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы / **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, В.К. Войников // Вестник Башкирского университета. - 2001. - №2 (1). - С.26-28.
11. Стрессовый разобщающий белок БХШ 310 индуцирует термогенез в митохондриях пшеницы при гипотермии *in vitro* / В.К. Войников, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, А.М. Корзун, О.Н. Сумина, В.В. Турчанинова, А.В. Колесниченко // Доклады РАН. – 2001б. - Т.377, №4. - С.565-567.
12. An influence of antiserum against winter wheat stress uncoupling protein CSP 310, on energetic activity of some plant species mitochondria / A.V. Kolesnichenko, **O.I. Grabelnych**, O.N. Sumina, T.P. Pobezhimova, V.K. Voinikov // J. Immunoassay Immunochemistry. – 2001а. - V.22, N1. - P.75-83.
13. An influence of stress protein CSP 310 and antiserum against this protein on lipid peroxidation in cereal mitochondria / A.V. Kolesnichenko, **O.I. Grabelnych**, V.V. Tourchaninova, V.V. Zyкова, N.A. Koroleva, T.P. Pobezhimova, V.K. Voinikov // J. Immunoassay Immunochemistry. – 2001б. - V.22, N2. - P.113-126.

14. Complex I of in winter wheat mitochondria respiratory chain is the most sensitive to uncoupling action of plant stress related uncoupling protein CSP 310 / **O.I. Grabelnych**, Т.Р. Pobezhimova, А.В. Kolesnichenko, V.K. Voinikov // J. Thermal Biology. – 2001a. - V.26, N1. - P.47-53.
15. Influence of CSP 310 and CSP 310-like proteins from cereals on mitochondrial energetic activity and lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo* / А.В. Kolesnichenko, V.V. Zykova, **O.I. Grabelnych**, N.A. Koroleva, Т.Р. Pobezhimova, Yu.M. Konstantinov, V.K. Voinikov // BMC Plant Biology. – 2001c. - V.1, N1. - P.1-6.
16. Plant stress uncoupling protein CSP 310 caused thermogenesis in winter wheat mitochondria *in vitro* / V. Voinikov, **O. Grabelnych**, Т. Pobezhimova, А. Korzun, O. Sumina, V. Tourchaninova, А. Kolesnichenko // J. Plant Physiology. - 2001. - V.158, N6. - P.807-810.
17. Stress protein CSP 310 causes oxidation and phosphorylation uncoupling during low-temperature stress only in cereal but not dycotyledon mitochondria / **O.I. Grabelnych**, Т.Р. Pobezhimova, А.В. Kolesnichenko, V.K. Voinikov // J. Immunoassay Immunochemistry. – 2001b. - V.22, N3. - P.275-287.
18. The comparison of uncoupling activity of constitutently synthesized and stress-induced forms of winter rye stress uncoupling protein CSP 310 / Т.Р. Pobezhimova, **O.I. Grabelnych**, А.В. Kolesnichenko, V.K. Voinikov // J. Thermal Biology. - 2001. - V.26, N2. - P.95-101.
19. Влияние белка холодого шока 310 на перекисное окисление липидов и дыхательную активность митохондрий озимой пшеницы / В.В. Зыкова, **О.И. Грабельных**, В.В. Турчанинова, А.И. Антипина, Н.А. Королева, А.В. Колесниченко, Т.П. Побежимова, Ю.М. Константинов, В.К. Войников // Физиология растений. - 2002. - Т.49, №5. - С.703-710.
20. Stress-induced protein CSP 310: a third uncoupling system in plants / А.В. Kolesnichenko, Т.Р. Pobezhimova, **O.I. Grabelnych**, V.K. Voinikov // Planta. - 2002. - V.215. - P.279-286.
21. Механизм разобщающего действия стрессового белка БХШ 310 отличается от механизма действия известных разобщающих белков / А.В. Колесниченко, Т.П. Побежимова, **О.И. Грабельных**, В.К. Войников // Физиология растений. - 2003. - Т.50, №2. - С.251-259.
22. Difference between the temperature of non-hardened and hardened winter wheat seedling shoots during cold stress / А.В. Kolesnichenko, Т.Р. Pobezhimova, **O.I. Grabelnych**, V.V. Tourchaninova, А.М. Korzun, N.A. Koroleva, V.V. Zykova, V.K. Voinikov // J. Thermal Biology. - 2003a. - V.28, N3. - P.235-244.
23. Influence of stress protein CSP 310 and antiserum against this protein on oxygen uptake, lipid peroxidation and temperature of winter wheat seedling shoots during cold stress / А.В. Kolesnichenko, **O.I. Grabelnych**, V.V. Tourchaninova, V.V. Zykova, N.A. Koroleva, Т.Р. Pobezhimova, А.М. Korzun, V.K. Voinikov // J. Immunoassay Immunochemistry. – 2003b. - V.24, N1. - P.41-55.
24. The role of different plant seedling shoots mitochondrial uncoupling systems in thermogenesis during low-temperature stress / **O.I. Grabelnych**, А.В. Kolesnichenko, Т.Р. Pobezhimova, V.V. Tourchaninova, А.М. Korzun, N.A. Koroleva, V.V. Zykova, V.K. Voinikov // J. Thermal Biology. - 2003. - V.28, N8. - P. 571-580.
25. The distribution of electron transport between the main cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria during short-term cold stress and cold hardening / **O.I. Grabelnych**, O.N. Sumina, S.P. Funderat, Т.Р. Pobezhimova, V.K. Voinikov, А.В. Kolesnichenko // J. Thermal Biology. - 2004. - V.29, N3. - P. 165-175.
26. Природа лиганда, связанного с разобщающим белком БХШ 310 / А.В. Колесниченко, Е.Л. Таусон, В.В. Зыкова, Е.С. Клименко, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова // Физиология растений. - 2005. - Т.52, №2. - С.216-220.
27. Non-phosphorylating bypass of the plant mitochondrial respiratory chain by stress protein CSP310 / А.В. Kolesnichenko, **O.I. Grabelnych**, Т.Р. Pobezhimova, V.K. Voinikov // Planta. - 2005. - V.221. - P.113-122.
28. Механизмы и функции нефосфорилирующего транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий растений / **О.И. Грабельных**, А.В. Колесниченко, Т.П. Побежимова, В.В. Зыкова, В.К. Войников // Физиология растений. - 2006. - Т.53, №3. - С.468-480.

29. Функционирование митохондрий озимой пшеницы *in vitro* в присутствии ионов Ca^{2+} и стрессового разобщающего белка БХШ 310 / А.В. Колесниченко, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, В.В. Турчанинова, В.К. Войников // Физиология растений. - 2006. - Т.53, №3. - С.380-386.
30. Функционирование стрессового белка БХШ 310 связано с шунтированием транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы / В.К. Войников, А.В. Колесниченко, Т.П. Побежимова, **О.И. Грабельных** // Физиология растений. - 2006. - Т.53, №3. - С.371-379.
31. Циклоспорин А-чувствительная митохондриальная пора озимой пшеницы при низкотемпературном и окислительном стрессах / Н.С. Павловская, О.В. Савинова, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, Н.А. Королева, В.К. Войников // Доклады АН. - 2007. - Т.417, №2. - С.283-285.
32. Роль свободных жирных кислот в энергетическом метаболизме митохондрий проростков озимой пшеницы / **О.И. Грабельных**, Н.Ю. Пивоварова, Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, В.К. Войников // Физиология растений. - 2009. - Т.56, №3. - С.369-381.
33. Развитие программируемой клеточной гибели в суспензионной культуре клеток озимой пшеницы *Triticum aestivum* (L.) при действии низкой положительной и отрицательной температур / И.В. Любушкина, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, И.В. Федосеева, А.В. Степанов, Н.С. Павловская, А.В. Федяева, Н.А. Королева, В.К. Войников // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». - 2010. - Т.3, №8. - С.10–18.
34. Чувствительность дыхания и набухания митохондрий злаков к соединениям, изменяющим проницаемость мембран / Н.С. Павловская, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, Н.А. Королева, В.К. Войников // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2010. - №3(11). - С.119-132.
35. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании / **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, О.А. Боровик, И.В. Любушкина, В.К. Войников // Биологические мембраны. - 2011. - Т.28, №4. - С.274-283.
36. Роль активных форм кислорода и участие митохондрий в развитии программируемой клеточной гибели в колеоптилях озимой пшеницы / А.В. Корсукова, **О.И. Грабельных**, И.В. Любушкина, Т.П. Побежимова, Н.А. Королева, Н.С. Павловская, И.В. Федосеева, В.К. Войников // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2013а. - №2. **(принята к печати)**
37. Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death / I.V. Lyubushkina, **O.I. Grabelnych**, T.P. Pobezhimova, A.V. Stepanov, A.V. Fedyaeva, I.V. Fedoseeva, V.K. Voinikov // Protoplasma (in press). doi.10.1007/s00709-013-0562-3

Статьи в других рецензируемых журналах и материалах конференций

38. **Грабельных О.И.** Изучение митохондриальных термогенных систем / О.И. Грабельных // Материалы III конференции молодых ученых, посвященной М.А. Лаврентьеву Часть II. Науки о жизни, науки о Земле, экономические науки, гуманитарные науки. - Новосибирск: РИЦ "Прайс-курьер", 2003. - С.120-124.
39. Изучение влияния циклоспорина А и ионов Ca^{2+} на функционирование растительных митохондрий / **О.И. Грабельных**, Н.С. Павловская, Т.П. Побежимова, О.Н. Сумина, В.К. Войников, А.В. Колесниченко // Вестник Харьковского национального аграрного университета, Серия Биология. - 2004. - №2 (5). - С.33-38.
40. The study of mitochondrial systems, those regulates the coupling degree of oxidative phosphorylation, in winter wheat / **O.I. Grabelnych**, T.P. Pobezhimova, A.V. Kolesnichenko, O.N. Sumina, N.S. Pavlovskaya, N.Yu. Pivovarova, V.K. Voinikov // Abstracts of meeting "International Conference in Plant Mitochondria Biology" (28 May – 2 June 2005, Obernai, France). – 2005. - P37.

41. **Грабельных О.И.** Энергетические функции растительных митохондрий в стрессовых условиях / О.И. Грабельных // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. - 2005. - Т.1, №1. - С.37-54.
42. The importance of oxidative phosphorylation uncoupling systems function for surviving of winter wheat seedling shoots during short-term cold stress / V.V. Tourchaninova, A.V. Kolesnichenko, **O.I. Grabelnych**, T.P. Pobezhimova, A.M. Korzun, V.V. Kolesnichenko, V.K. Voinikov // Stress Physiology & Biochemistry. - 2005. - V.1, N.1. - P.21-29.
43. The role of fatty acid in oxidative phosphorylation uncoupling of winter wheat mitochondria and the participation of ADP/ATP-antiporter and the plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) in this process / **O.I. Grabelnych**, N.Yu. Pivovarova, T.P. Pobezhimova, A.V. Kolesnichenko, V.K. Voinikov // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. – 2006. - V.1757, I.5-6. Suppl. - P.368.
44. Проницаемость митохондриальных мембран растений в стрессовых условиях / **О.И. Грабельных**, Н.С. Павловская, Н.Ю. Пивоварова, О.В. Савинова // Материалы V конференции молодых ученых СО РАН, посвященной М.А. Лаврентьеву (Новосибирск, 20-22 ноября, 2007 г.). Часть II. Гуманитарные науки, науки о жизни, науки о земле, экономические науки. Новосиб. Гос. Ун-т, Новосибирск, 2007. - С.92-94.
45. Регуляция активности альтернативной оксидазы и разобщающих белков в проростках озимой пшеницы низкой положительной и отрицательной температурами / **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, Н.А. Королева, Н.С. Павловская, И.В. Любушкина, Т.Е. Путилина, В.К. Войников // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: Материалы Всеросс. научн. конф., 24–28 августа 2009 г. Иркутск: НЦ РВХ ВСНЦ СО РАН, 2009. - С.95-99.
46. Функционирование митохондрий в стареющем колеоптиле этиолированных проростков озимой пшеницы / **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, Н.А. Королева, Н.С. Павловская, И.В. Любушкина, И.В. Федосеева, Т.Е. Путилина, В.К. Войников // Там же. - С.100-104.
47. Участие цианидрезистентного дыхания в термогенерации и антиокислительной защите клетки в проростках озимой пшеницы при холодовом воздействии / **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, А.М. Корзун, С.А. Возненко, Н.А. Королева, О.А. Боровик, В.К. Войников // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2011. – Т.7, №4. – С.446-456.
48. Изменение жирнокислотного состава липидов митохондрий озимой пшеницы в процессе холодового закаливания и последующего действия отрицательной температуры / **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, К.А. Кириченко, О.А. Боровик, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, Н.А. Соколова, В.К. Войников // VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международная научная школа «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции». Материалы докладов (в двух частях). Ч.1. (Нижний Новгород, 4-10 июля 2011 г.). – Нижний Новгород, 2011. – С.197-198.
49. Устойчивость проростков озимой пшеницы к кратковременному действию отрицательной температуры может быть обусловлена активацией разобщающих белков и АТФ/АДФ антипортера / **О.И. Грабельных**, О.А. Боровик, Н.С. Павловская, Т.П. Побежимова, И.В. Любушкина, А.В. Корсукова, Е.Л. Таусон, В.К. Войников // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т.9, №4. – С.319-328.
50. Activities of alternative oxidase, uncoupling proteins and adenine nucleotide translocator in winter wheat mitochondria during cold hardening / **O. Grabelnych**, O. Borovik, I. Lyubushkina, T. Pobezhimova, V. Voinikov // FEBS J. – 2013. – V.280, Suppl. 1. – P.522.
51. Холодовое закаливание предотвращает индуцированную перекисью водорода программируемую клеточную гибель в колеоптилях кукурузы / А.В. Корсукова, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, Н.А. Королева, И.В. Федосеева, Н.С. Павловская, И.В. Любушкина, О.А. Боровик, А.В. Федяева, С.А. Возненко, Э.М. Ильюшнева, В.К. Войников // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2013б. – Т.9, №1. – С.246-257.

52. Роль изменений жирнокислотного состава клеток в процессе повышения морозоустойчивости суспензионной культуры озимой пшеницы / И.В. Любушкина, К.А. Кириченко, **О.И. Грабельных**, Т.П. Побежимова, А.В. Федяева, А.В. Степанов, В.К. Войников // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т.9, №4. – С.219-229.

Список сокращений

АО – альтернативная антимицин А и цианидрезистентная оксидаза
АП – альтернативный путь дыхания, связанный с функционированием АО
АФК – активные формы кислорода
БГК – бензгидроксамовая кислота
БСА – бычий сывороточный альбумин
Катр – карбоксиатрактилозид
КЦХФ - карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СЖК – свободные жирные кислоты
цикА – циклоспорин А
ЦО – цитохром *c* оксидаза
ЦП – цитохромный путь дыхания, связанный с функционированием ЦО
NDA – «внутренняя» ротенон-нечувствительная НАД(Ф)Н-дегидрогеназа
NDB – «внешняя» ротенон-нечувствительная НАД(Ф)Н-дегидрогеназа
РТР (Permeability Transition Pore) – высокопроницаемая митохондриальная пора
pUCP (plant Uncoupling protein) – растительный разобщающий белок